

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA

MICHELI ZAMINHAN

Desempenho e resposta hematológica de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de triptofano

Toledo

2013

MICHELI ZAMINHAN

Desempenho e resposta hematológica de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de triptofano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya
Co-orientador: Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo

Toledo

2013

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.
Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

Z24d Zaminhan, Micheli
Desempenho e resposta hematológica de tilápias do Nilo alimentadas com dietas com níveis crescentes de triptofano / Micheli Zaminhan. -- Toledo, PR : [s. n.], 2013. 105 f.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya
Coorientador: Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Campus de Toledo. Centro de Engenharias e Ciências Exatas.

1. Tilápia do Nilo (Peixe) – Alimentação e rações 2. Tilápia do Nilo (Peixe) – Desempenho 3. Aminoácidos na nutrição animal 4. Nutrição animal - Peixes 5. Hematologia I. Furuya, Wilson Massamitu, Orient. II. Boscolo, Wilson Rogério, Orient. III. T

CDD 20. ed. 639.3758

FOLHA DE APROVAÇÃO

MICHELI ZAMINHAN

Desempenho e resposta hematológica de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de triptofano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya
Universidade Estadual de Ponta Grossa (Presidente)

Prof. Dr. Altevir Signor
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Arcangelo Augusto Signor
Instituto Federal do Paraná

Aprovada em: 19 de fevereiro de 2013.

Local de defesa: Sala de treinamento GEMaQ /Campus de Toledo.

O sonho

*Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.*

*A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passaram por sua vida*

Clarice Lispector

Dedico

Ao meu pai Alderico Zaminhan por acreditar em mim.

A minha mãe Tereza Chinaider Zaminhan. Mãe está é uma conquista que dedico a você, por sempre confiar em mim e me apoiar, tenho muito orgulho de ser sua filha e tento retribuir da melhor forma que consigo. Você é minha fortaleza e inspiradora, apesar de toda a saudade que a distância tem nos causado, aqui está mais uma prova de que vale a pena. Te amo muito, e saiba que grande parte deste mérito é seu, que tanto me dá força e acredita no meu potencial.

Obrigada pai, obrigada mãe, por possibilitar o que eu sou hoje e por sempre acreditarem em mim.

Admiro cada um de vocês por serem íntegros, responsáveis, amorosos e muito trabalhadores, meu orgulho no qual eu me espelho.

“A beleza dos filhos são seus pais”

Prov. 17:6.

Ao meu querido irmão Marcelo Zaminhan, que tanto amo, e sempre será meu “maninho”, por mais longe que a distância possa nos levar que o amor sempre permaneça ...
Ao meu namorado Djeison Giovan Hassemmer, que sempre me incentiva, me ajuda, estando sempre ao meu lado compartilhando as tristezas e alegrias e sabendo sempre me dizer as palavras que eu preciso ouvir em alguns momentos da minha vida.

Obrigada meu amor, por me suportar nos meus momentos de desespero, que aguentou firme e forte do meu lado, obrigada pela compreensão. A toda felicidade que você me proporcionou a cada momento que estivemos juntos, você é minha alegria de vida, gostaria também de agradecer aos seus pais Neiva e Ivanir, pela paciência e compreensão durante muitos finais de semana.

“..... Ontem à noite pedi a um anjo que fosse proteger-te enquanto dormias. Pouco depois ele voltou e lhe perguntei por que tinha voltado. Um anjo não precisa que outro o proteja, respondeu-me.....”

Te amo meu amor!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, e por ter me conduzido nesta jornada e me dado forças para vencer as dificuldades e obstáculos. Que o vosso nome seja sempre bendito.

Aos meus pais Aldérico e Tereza por todo amor, carinho, educação, enfim por me tornarem o que sou hoje e por perdoarem a minha ausência em momentos tão importantes de suas vidas.

Ao meu orientador Wilson Massamitu Furuya, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela enorme paciência comigo e pelos ensinamentos. Ao orientador que é um exemplo de competência e profissionalismo. Agradeço pela preocupação e compreensão e por me direcionar durante todo esse tempo. Sempre com tantos compromissos e mesmo distante conseguiu me atender em todos os momentos. Muito obrigada professor!

Ao meu co-orientador Wilson Rogério Boscolo pelos ensinamentos, atenção e diplomacia em todos os momentos, contribuindo para realização deste experimento.

Ao colega de trabalho Dacley Hertes Neu, pela ajuda indispensável durante a realização dos experimentos, durante as análises estatísticas e por todas as dúvidas sanadas.

Ao colega de trabalho Edionei Maico Fries, pelo auxílio nas coletas de sangue e análises hematológicas, por sempre estar disposto a ajudar.

À Márcia Luzia Ferrarezi Maluf, por todos os ensinamentos, pela amizade e por sempre confiar em mim. Saiba que te admiro muito.

Ao meu namorado Djeison Giovan Hassemer, por toda atenção, paciência e auxílio durante os meus experimentos e andamento da dissertação.

As minhas colegas de apartamento, Joana Karin Finkler e Ariane Furtado de Lima, pela amizade e companheirismo.

Ao Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura – GEMAQ, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, pela disponibilidade das estruturas para realização do trabalho. Aos integrantes do Gemaq: Wilson Rogério Boscolo, Aldi Feiden, Altevir Signor, Fábio Bittencourt, Márcia Luzia Ferrarezi Maluf, Joana Finkler, Edionei, Dacley, Joana Rocha, Tibério, César, Vanessa, Juliana, Alis, Davidy, Jaina, João, Carol, Júnior, Diego, Jhonis, Jackeline e Thêmis. Que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Ao programa de Pós – Graduação de Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Ao assistente do programa Luiz Antonio Hesper por toda atenção demonstrada.

Aos professores, Wilson, Fábio e Altevir por toda a atenção e pelas valiosas contribuições para realização desta dissertação.

À Joacasta Machado Mileski, amiga que me conquistou com sua personalidade forte e ao mesmo tempo doce. Obrigada por todos os momentos que passamos juntas e pela sua compreensão comigo, durante a realização dessa dissertação.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida.

À Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda – Animal Nutrition, pela doação dos aminoácidos e realização das análises. Em especial ao Edgar Ishikawa e a Marianne Kutschenco, pela contribuição nas pesquisas.

À piscicultura Progresso pela doação dos peixes utilizados neste trabalho.

Às minhas tilápias que cooperaram muito para realização desta pesquisa. Meu respeito aos peixes que foram eutanasiados.

Desempenho e resposta hematológica de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de triptofano

RESUMO

O triptofano é um aminoácido essencial exigido em pequenas quantidades, quando comparados aos valores de metionina, lisina, treonina e arginina. No entanto, possui funções importantes no organismo animal. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do triptofano em dietas para juvenis e alevinos de tilápia do Nilo, por meio do desempenho produtivo, composição corporal, retenção de aminoácidos, perfil hematológico e bioquímico e, posteriormente avaliação do efeito do estímulo pelo calor sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos (experimento 2). Os peixes foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições nos dois estudos. Para o experimento 1 foram utilizadas 240 tilápias com peso médio de $38,20 \pm 0,09$ g, distribuídas em caixas de fibras de vidro com capacidade de 250 litros, sendo cada unidade composta por 12 peixes. Foram elaboradas cinco dietas com 243 g kg^{-1} de proteína digestível e 3142 de kcal kg^{-1} de energia digestível com níveis crescentes de triptofano (2,11; 2,65; 3,19; 3,74 e $4,21 \text{ g kg}^{-1}$). Para o experimento dois foram utilizados 600 alevinos de tilápia do Nilo com peso e comprimento médios de $3,39 \pm 0,02$ g e $5,07 \pm 0,01$ cm, respectivamente, distribuídos em 20 caixas de fibra de vidro com capacidade de 250 litros, sendo cada unidade composta por 30 peixes. Foram elaboradas cinco dietas com aproximadamente $271,3 \text{ g kg}^{-1}$ de proteína digestível e 3181 de kcal kg^{-1} de energia digestível com níveis crescentes de triptofano (2,33; 2,69; 3,17; 3,50 e $3,87 \text{ g kg}^{-1}$). Após 85 dias, foram realizadas as análises de desempenho produtivo, hematológicas e bioquímicas. Posteriormente, 10 peixes de cada unidade experimental foram transferidos para o laboratório onde permaneceram a uma temperatura de 35°C por sete dias. Após uma semana foram efetuadas as mesmas análises hematológicas e bioquímicas realizadas anteriormente ao desafio térmico. Os parâmetros hematológicos avaliados foram à contagem total de eritrócitos (Eri), taxa de hemoglobina (Hb), percentual de hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HM), contagem total de leucócitos (Leu), contagem total de trombócitos (Trom), percentual de linfócitos (Linf), neutrófilos (Neut) e monócitos (Mono), proteínas plasmáticas totais (PPT), glicose plasmática (Glic) e cortisol (Cort). Para o experimento 1, pode-se concluir que o nível

2,11 g kg⁻¹ de triptofano, correspondente a relação triptofano: lisina de 0,15:1, atende as exigências dietéticas para a o desempenho e saúde de alevinos de tilápia do Nilo. Contudo, a melhor uniformidade foi obtida para os peixes que receberam as dietas contendo 2,65 a 4,28 g kg⁻¹ de triptofano. No experimento dois, pode-se concluir que o nível 2,33 g kg⁻¹ da dieta correspondente à relação triptofano: lisina de 0,157: 1 foi o suficiente para atender as exigências dietéticas de higidez da tilápia do Nilo. O estímulo pelo calor não alterou o estado de saúde dos peixes.

Palavras-chave: Aquicultura. Hematologia. Tilápia. Triptofano.

Performance and haematological response of tilapia fed diets with increasing levels of tryptophan

ABSTRACT

Tryptophan is an essential amino acid required in small amounts compared to the amounts of methionine, lysine, threonine and arginine. However, it has important functions in the animal body. The aim of this study was to evaluate the effect of tryptophan in the diet of Nile tilapia juvenile and, through the productive performance, body composition, amino acids retention, biochemical and haematological profile and subsequently evaluate the effect of the heat stimulus on the hematological and biochemical parameters (experiment 2). In both experiments, fish were distributed in a completely randomized design with five treatments and four replications. For the first experiment, were used 240 tilapias with an average weight of 38.20 ± 0.09 g, distributed in glass fibers boxes with a capacity of 250 liters, each unit was consisted of 12 fish. Four diets were prepared with approximately 243 g kg^{-1} of digestible protein and $3142 \text{ kcal kg}^{-1}$ of digestible energy with increasing levels of tryptophan (2.11, 2.65, 3.19, 3.74 and 4.21 g kg^{-1}). For the second experiment, were used 600 Nile tilapia with average weight and length of 3.39 ± 0.02 g and 5.07 ± 0.01 cm, respectively, distributed in 20 glass fiber boxes with a capacity of 250 liters, being each unit consisted by 30 fish. Four diets were prepared with approximately 271.3 g kg^{-1} of digestible protein and $3181 \text{ kcal kg}^{-1}$ of digestible energy with increasing levels of tryptophan (2.11, 2.65, 3.19, 3.74 and 4.21 g kg^{-1}). After 85 days, there were analyzed the productive performance, hematological and biochemical parameters. Upon completion of these tests, for the third stage, 10 fish from each treatment were transferred to the laboratory where they were kept at a temperature of 35°C for seven days. After a week the same hematological and biochemical analyzes realized before the thermal challenge were performed. Hematological parameters were evaluated for erythrocyte count (Eri), hemoglobin (Hb), percentage of hematocrit (Ht), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (HM), total leukocyte count (Leu), total thrombocytes count (Trom), percentage of lymphocytes (Linf), neutrophils (Neut) and monocytes (Mono), total plasma protein (TPP), plasma glucose (Gluc) and cortisol (Cort). For experiment 1, the tryptophan level of 2.11 g kg^{-1} , corresponding to tryptophan: lysine ratio of 0.15:1, meets the dietary requirements for the health and productive performance of

Nile tilapia. However, the best uniformity was obtained for fish fed with diets containing 2.65 to 4.28 g kg⁻¹ of tryptophan. In experiment 2, the tryptophan level of 2.33 g kg⁻¹, corresponding to tryptophan: lysine ratio of 0.157:1 was enough to meet the dietary requirements of the species healthiness. The heat stimulus did not changed the state of fish health.

Keywords: *Aquaculture. Hematology. Nutrition. Tryptophan.*

Dissertação elaborada e formatada conforme as
normas da publicação científica *Aquaculture
Nutrition* Disponível em:
[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/
\(ISSN\)1365-2095/issues](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/
(ISSN)1365-2095/issues)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	14
1 INTRODUÇÃO GERAL	16
1.2 Objetivos.....	17
1.2.1 Objetivo geral	17
1.2.2 Objetivos específicos.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Espécie estudada.....	17
3 AMINOÁCIDOS PARA PEIXES	18
4 TRIPTOFANO	19
4.1 Exigência de triptofano para peixes	22
4.2 Estresse em peixes	23
4.2.1 Suplementação de triptofano em dietas para atenuação do estresse.....	24
5 HEMATOLOGIA DE PEIXES TELEÓSTEOS	28
5.1 Sangue	28
5.2 Formação das células sanguíneas	29
5.3 Eritrócitos	30
5.4 Hemoglobina	30
6 SISTEMA IMUNE DOS PEIXES	32
6.1 Imunidade inata	32
6.1.1 Imunidade adquirida	32
7 LEUCÓCITOS	33
7.1 Linfócitos.....	33
7.2 Neutrófilos	33
7.3 Monócitos	34
7.4 Eosinófilos.....	34
7.5 Basófilos	35
7.6 Célula granulocítica especial (CGE)	35
8 TROMBÓCITOS	35
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO I	
Desempenho e resposta hematológica de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de triptofano	54
Introdução.....	55
Material e métodos	57
Resultados.....	61
Discussão.....	65
Referências	70
CAPÍTULO II	
Triptofano em dietas para tilápia do Nilo: desempenho produtivo e respostas hematológicas e bioquímicas antes e após o estímulo pelo calor.....	78
Introdução.....	79
Material e métodos	80
Resultados.....	86
Discussão.....	93
Referências	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do triptofano.	20
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valores de exigências de triptofano para peixes.....	22
Tabela 2 Composição das dietas com níveis crescentes de triptofano (g kg ⁻¹).....	58
Tabela 3 Composição de aminoácidos das dietas experimentais (g kg ⁻¹ de matéria seca) ¹	59
Tabela 4 Desempenho de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de triptofano*.....	62
Tabela 5 Composição corporal (g.100 ⁻¹ g) dos peixes alimentados com dietas contendo níveis crescentes de triptofano*.....	62
Tabela 6 Composição proximal corporal de aminoácidos essenciais e não essenciais (g/ 16g N) de juvenis de tilápias alimentadas com dietas com níveis crescentes de triptofano.....	63
Tabela 7 Retenção corporal de aminoácidos essenciais e não essenciais de juvenis de tilápias alimentadas com dietas com níveis crescentes de triptofano*.....	64
Tabela 8 Valores médios de contagem total de eritrócitos (Erit), hematócrito (Hct), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).....	65
Tabela 9 Valores médios de leucócitos totais (Leuc tot), trombócitos totais (tromb tot), porcentagem de linfócitos (Linf), porcentagem de neutrófilos (Neutr), porcentagem de monócitos (Mono) e proteínas plasmáticas totais (PPT).....	65
Tabela 10 Composição das dietas com níveis crescentes de triptofano (g kg ⁻¹)*.....	82
Tabela 11 Composição de aminoácidos das dietas experimentais (g kg ⁻¹ de matéria seca) ¹ . .	83
Tabela 12 Desempenho produtivo de alevinos de tilápia alimentados com níveis crescentes de triptofano*.....	86
Tabela 13 Composição corporal (g.100 ⁻¹ g) dos peixes alimentados com dietas contendo níveis crescentes de triptofano*.....	87
Tabela 14 Composição proximal corporal de aminoácidos essenciais e não essenciais (g/ 16g N) de juvenis de tilápias alimentadas com dietas com níveis crescentes de triptofano*.....	87
Tabela 15 Retenção corporal de aminoácidos essenciais e não essenciais de juvenis de tilápias alimentadas com dietas com níveis crescentes de triptofano ¹	88
Tabela 16 Valores médios de contagem total de eritrócitos (Erit), taxa de hemoglobina (Hb), hematócrito (Hct), volume corpuscular médio (VCM), e concentração de hemoglobina corpuscular média (HCM), antes e após o estímulo pelo calor ¹	90

Tabela 17 Valores médios de leucócitos totais (Leuc tot), trombócitos totais (tromb tot), porcentagem de linfócitos (Linf), porcentagem de neutrófilos (Neutr), e porcentagem de monócitos (Mono) de tilápias antes e após o estímulo pelo calor.	91
Tabela 18 Médias de cortisol e glicose plasmáticas de tilápias, antes e após o estímulo pelo calor.	92

1 INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura é uma das atividades que mais cresce no mundo e no Brasil segue a mesma tendência. Em 2010 a produção aquícola nacional foi de 479.399 toneladas, representando um incremento de 15,3% em relação à produção de 2009. Comparando a produção atual com o montante produzido em 2008 que foi de 363.366 t, fica evidente o crescimento do setor no país, com um aumento de 31,2% na produção durante o triênio 2008 – 2010. A maior parcela da produção aquícola é oriunda da aquicultura continental, na qual se sobressai a piscicultura continental que representou 82,3% da produção total nacional (MPA, 2012).

Dentre as espécies mais cultivadas, a tilápia do Nilo merece destaque, pois é o peixe mais cultivado no Brasil e no mundo fica atrás apenas das carpas (FAO, 2012), sendo que a produção nacional foi de 155.450,8 toneladas em 2010 (MPA, 2012). Esse incremento produtivo é resultante de uma série de fatores, dentre eles o rápido crescimento, rusticidade ao manejo e devido às características organolépticas de sua carne. Embora a tilápia seja a espécie com maior pacote informativo no Brasil, o aumento da produtividade requer conhecimentos sobre suas exigências nutricionais e sobre seu estado de higidez.

Um dos setores que leva ao melhor entendimento da saúde animal é a avaliação hematológica. No entanto, apesar da variedade de fatores que podem interferir nos valores hematológicos dos animais, são escassas as informações disponíveis na literatura, principalmente relacionadas com fatores antinutricionais, sendo necessários estudos inerentes ao tema, de forma a esclarecer a influência que estes compostos exercem no perfil hematológico. O monitoramento do estado de saúde dos peixes é imprescindível para o manejo sanitário da produção, seja de grande ou pequeno porte (Satake et al., 2009).

No campo da nutrição, a proteína é considerada o nutriente mais caro na dieta dos peixes, sendo essencial ao metabolismo dos animais, uma vez que os peixes não apresentam uma exigência de proteína, mas sim de uma proporção adequada de aminoácidos essenciais e não essenciais que são utilizados para formação das proteínas musculares e corporais. Dentre os aminoácidos, o triptofano é considerado um aminoácido essencial, sendo necessária sua suplementação na dieta. Trata-se de um aminoácido exigido em pequenas quantidades quando comparado com a lisina, metionina e treonina. Suas funções são cruciais ao organismo, pois é utilizado na síntese proteica e também como um precursor da serotonina, um importante neuromediador associado ao humor, inibição a agressão, resposta ao estresse, e a regulação do apetite e do sono (Rossi & Tirapegui, 2004). Diante disso, muitos autores tem utilizado a

suplementação de triptofano nas dietas para controlar a agressividade (Winberg et al., 2001; Lepage et al., 2005; Hoglund et al., 2005), a diminuição do canibalismo e obtenção de lotes mais homogêneos (Hseu et al., 2003), reação ao estresse (Schjolden et al., 2006) e conseqüentemente, promover ótimo desempenho zootécnico aos animais.

Diante disso, durante a criação de peixes, se faz necessário o fornecimento de uma ração adequada, tendo em vista o conhecimento da exigência por aminoácidos, para assim, se obter um desempenho satisfatório e uma produção viável sem afetar o estado de higidez dos peixes.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o triptofano em dietas para alevinos e juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar a exigência de triptofano para alevinos e juvenis de tilápia do Nilo;
- Avaliar a composição centesimal e o desempenho produtivo;
- Determinar as respostas hematológicas e bioquímicas da tilápia do Nilo alimentada com dietas contendo diferentes níveis de triptofano;
- Verificar o efeito dos níveis de triptofano sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos antes e após o estímulo pelo calor.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Espécie estudada

As tilápias são originárias da África, constituem a ordem dos Perciformes, família *Ciclidae*, divididas em várias centenas de espécies (Lowe-Mcconnel, 1975). As pesquisas realizadas para criação destas espécies iniciaram no Congo Belga (atual Zaire), no começo do século XIX, sua criação foi intensificada no Quênia e sua expansão para outras partes do mundo ocorreu a partir da Malásia (Campo, 2008). Foi introduzida no Brasil em 1971, através do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) nos açudes do Nordeste, espalhando-se para todo o resto do Brasil (Proença & Bittencourt, 1994; Castagnolli, 1996).

A tilápia do Nilo é de grande importância para piscicultura mundial e sua produção cresce acentuadamente. Sendo a segunda espécie mais cultivada no mundo, ficando somente atrás das carpas (FAO, 2012). É uma espécie tropical cuja temperatura ideal para o desenvolvimento varia entre 25 e 30°C, tendo seu crescimento afetado abaixo de 15°C e não resistindo a temperaturas próximas de 9°C (Ono & Kubitzka, 2003; Cyrino & Conte, 2006). Na tilapicultura os machos crescem cerca de 30% a mais que as fêmeas, pois estas utilizam grande parte das suas reservas energéticas no processo de vitelogenese (Marengoni et al., 2010), não se alimentando durante o período de incubação dos ovos na boca (Beardmore et al., 2001).

É criada em diversos sistemas desde a criação extensiva em tanques escavados que recebe dejetos animais, em cultivos intensivos, “raceways” e tanques – rede (Boscolo et al., 2001). A produção da piscicultura atingiu cerca de 60% de crescimento apenas entre 2007 e 2009. Isoladamente a produção de tilápias aumentou 105% em apenas sete anos (2003-2009), (MPA, 2010), sendo que em 2010, teve uma produção de 155.450,8 toneladas (MPA, 2012). Isso porque a tilápia destaca-se como uma das espécies mais importantes devido à sua alta taxa de crescimento, adaptabilidade em diversas condições de criação, além de apresentar uma boa aceitação pelo consumidor (Kubitzka, 2000).

3 AMINOÁCIDOS PARA PEIXES

As proteínas são os principais constituintes orgânicos dos tecidos dos peixes, representando de 65 a 75% do total em relação ao peso seco (Wilson, 2002). São compostos orgânicos formados por cadeias de aminoácidos que às vezes podem estar associados a minerais como zinco, o cobre, ferro e enxofre. As propriedades físicas, químicas e biológicas das proteínas são determinadas pela sequência dos aminoácidos.

Os peixes consomem proteínas para obtenção de aminoácidos. A proteína é digerida ou hidrolisada e libera aminoácidos livres, que são absorvidas pelo trato intestinal e distribuídos pelo sangue para os órgãos e tecidos. Estes aminoácidos são utilizados pelos diversos tecidos para a síntese de novas proteínas. A ingestão regular de proteína ou aminoácidos é necessária porque os aminoácidos são utilizados continuamente pelo organismo, ou para construir novas proteínas, como durante o crescimento e reprodução, ou para substituir proteínas existentes na fase de manutenção. Muitos aminoácidos podem ser sintetizados pelo organismo em quantidades suficientes a partir de outros compostos nitrogenados e por isso são considerados não essenciais. Outros aminoácidos não podem ser sintetizados ou são em quantidades insuficientes, sendo

considerados aminoácidos essenciais, devendo ser suplementados na dieta, como: arginina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (Wilson, 2002).

Uma grande quantidade de aminoácidos ingeridos é deaminada e seus esqueletos carbônicos são usados como fonte de energia. Dentre os compostos nitrogenados formados a partir de aminoácidos destacam-se: purinas (glicina ou glutamina), poliaminas e componentes metílicos (arginina e metionina), catecolaminas (fenilalanina), hormônios da tireoide (tirosina), carnitina (lisina), creatina (arginina ou glicina), histamina (histidina), taurina (cistina) e serotonina (triptofano).

Em peixes a deficiência em aminoácidos essenciais causa redução na utilização da proteína e como consequência retarda o crescimento, reduz o ganho de peso e a eficiência alimentar, além disso, diminui a resistência dos peixes as doenças, pelo comprometimento dos mecanismos de resposta imunológica (Steffens, 1989; Wilson, 2002). Por outro lado, se muita proteína é fornecida na dieta, apenas uma parte é usada para sintetizar novas proteínas, sendo o restante convertido em energia.

4 TRIPTOFANO

O L-triptofano (Figura 1) é um aminoácido essencial, pois não pode ser produzido no organismo, tendo que ser obtido através da dieta, sendo recomendados 100 mg kg^{-1} de massa corporal por dia para humanos (Marklová et al., 2000). É também o aminoácido em menor concentração nas proteínas dietéticas: 1% nas proteínas de origem animal e 1,4% nas proteínas de origem vegetal (Rossi & Tirapegui, 2004). O triptofano possui um anel indólico ligado ao grupo metileno. A porção aromática serve como um marcador ultravioleta para a detecção deste aminoácido tanto de forma separada, ou incorporado em proteínas e enzimas, através de espectrofotometria ultravioleta.

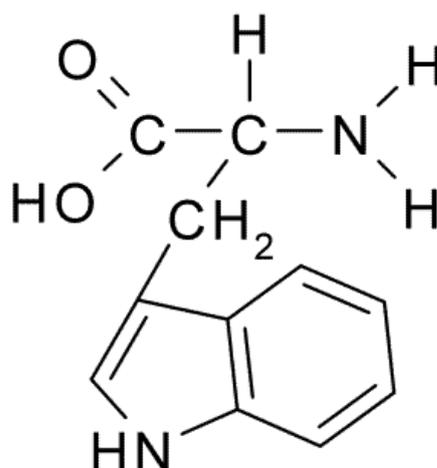


Figura 1: Fórmula estrutural do triptofano.
Fonte: Chemistry, 2012.

O triptofano além de ser o precursor da serotonina (5-HT) apresenta outras funções como: contribuição no crescimento normal e síntese protéica, influência no sono, comportamento, fadiga, ingestão alimentar, precursor da vitamina B3 (niacina) e é um dos aminoácidos que estimula a secreção de insulina e o hormônio do crescimento (Rossi & Tirapegui, 2004). O excesso de triptofano dietético, que não é utilizado para a síntese de proteínas, age como um suplemento terapêutico (Goihl, 2006). Podemos destacar a síntese da serotonina (5-HT) que é realizada por duas enzimas a triptofano-hidroxilase (TPH) que promove a hidroxilação do triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) e a descarboxilase de aminoácidos (L) aromáticos que converte o 5-HTP em serotonina, sendo que a TPH é específica para esta reação e controla a taxa de biossíntese desse neurotransmissor. Após ser produzida, a serotonina é mantida em vesículas dentro da terminação neuronal até ser liberada, quando o neurônio é ativado (Jorgensen, 2007), exercendo seus efeitos por meio da ativação de receptores serotoninérgicos.

A serotonina está relacionada a uma grande variedade de funções orgânicas, controlando desde atividades periféricas, como a motilidade gastrointestinal e a pressão sanguínea, até funções centrais, como os comportamentos de sono e vigília, percepção da dor, apetite e comportamentos emocionais e agressivos (Jacobs & Fornal et al., 1991). A serotonina é considerada o principal neurotransmissor envolvido no comportamento agressivo desde invertebrados até mamíferos (Edwards & Kravitz, 1997; Miczek et al., 2004). Apesar de seu mecanismo de ação não ter sido completamente elucidado, a função da serotonina parece ser conservada dentro do sub-filo vertebrata, desempenhando um papel inibitório na agressão desde peixes (Winberg et al., 2001;

Hseu et al., 2003; Perreault et al., 2003; Lepage et al., 2005; Lynn et al., 2007) até seres humanos (Berman et al., 1997; Coccaro et al., 1997).

O triptofano é precursor de 5-HT (serotonina), que por sua vez é precursor de melatonina. Se a atividade das enzimas aril-alkil-amina-N-acetil-transferase (AANAT) e hidroxindol-O-metil-transferase (HIOMT), responsáveis pela conversão da 5-HT em melatonina, forem suficientemente altas, os níveis elevados de Triptofano dietário poderiam resultar em níveis elevados de melatonina. A melatonina é considerada um sincronizador dos ritmos diários do ciclo claro/escuro na maioria dos vertebrados (Cassone, 1998; Falcón, 1999), incluindo peixes (Ekström & Meissl, 1997), em mamíferos a melatonina mostrou efeitos inibidores da secreção de glicocorticóide (Xu et al., 1995; Rao et al., 2001).

Nos mamíferos a maior parte do triptofano plasmático cerca de 80 a 90% é transportada ligada a albumina, sendo apenas uma pequena parte livre (Fernstrom & Wurtman, 1971). Ao contrário dos mamíferos, nos peixes aproximadamente 92% do triptofano circulam na forma livre (Rozas et al., 1990). Assim, a absorção do triptofano pelo cérebro é mais dependente do plasma em peixes do que em mamíferos. O triptofano é transportado da corrente sanguínea para o cérebro através de um carreador estereoespecífico e saturável, comum a tirosina e possivelmente a outros aminoácidos neutros semelhante ao que acontece em mamíferos (Fernstrom & Wurtman, 1971; Fernstrom, 1983; Aldegunde et al., 1998). Na barreira hemato-encefálica o triptofano livre compete com outros cinco aminoácidos neutros (leucina, isoleucina, valina, fenilalanina e tirosina) para seu transporte e síntese da serotonina 5-HT cerebral. Entre os aminoácidos competidores, o que possui a menor concentração plasmática é o triptofano (50 mM), sendo estimado que a razão entre triptofano e aminoácidos neutros é de 1:100 (Rossi & Tirapegui, 2004). Para aumento da síntese da serotonina 5-HT cerebral, é necessário um favorecimento da captação cerebral de triptofano livre, em detrimento dos seus competidores aminoácidos neutros. Os processos fisiológicos que provocam aumento desta razão são os que favoreceriam a síntese da serotonina 5-HT (Rossi & Tirapegui, 2005). Como vários aminoácidos neutros são precursores de neurotransmissores, a competição na barreira hemato-encefálica pode ter uma função na regulação da síntese destes (Wurtman et al., 1981).

Nos peixes, além do triptofano estar envolvido na incorporação das proteínas corporais, também está relacionado com importantes funções biológicas, sendo a maioria delas às vias metabólicas envolvidas no catabolismo. Como já comentado, este aminoácido é um precursor da serotonina, um importante neuromediador associado ao humor, inibição a agressão, à resposta ao estresse, e a regulação do apetite (Russo et al., 2003). Nesse sentido, muitos estudos vêm sendo feitos

com a complementação do triptofano na dieta dos peixes, de forma a melhorar o desempenho dos animais, reduzir o estresse, e como consequência manter a homeostase dos peixes.

4.1 Exigência de triptofano para peixes

Estudos realizados com por Murthy & Varghese (1997) observaram que a dieta contendo 11,3 g kg⁻¹ de triptofano da proteína, proporcionou uma melhor eficiência alimentar, taxa de crescimento específico e máxima sobrevivência para *Labeo rohita*. Para o catfish africano (*Clarias gariepinus*) Fagbenro & Nwana (1999) determinaram 11 g kg⁻¹ de triptofano da proteína para um melhor desempenho. Trabalhando com juvenis *Lates calcarifer* Coloso et al. (2004) demonstraram que os níveis de triptofano não afetaram a sobrevivência e determinaram 4,1 g kg⁻¹ de triptofano da proteína para melhor resposta para o crescimento e eficiência alimentar. Kim et al. (1987) determinaram 5,7 a 7,1 g kg⁻¹ de triptofano da proteína para truta arco-íris, demonstrando que estes níveis melhoraram a conversão alimentar e a retenção de nitrogênio. Ogino (1980) determinou 6,0 g kg⁻¹ do triptofano da proteína para carpa, para obtenção de um melhor desempenho. Santiago & Lovell (1988), forneceram rações purificadas e relataram que 10 g Kg⁻¹ de triptofano da proteína foi suficiente para o máximo ganho de peso para a tilápia do Nilo. A NRC (2011) relata valores de exigência de triptofano entre 0,5 a 1% da proteína para diversas espécies (tabela 1).

Tabela 1 Valores de exigências de triptofano para peixes.

Peixe	Exigência ^a	Com base em	Referências
Bagre do canal	0,5	Estudos de crescimento	Wilson et al. (1988)
Salmão Chinook	0,5	Estudos de crescimento	Halver (1965)
Salmão Chum	0,7	Estudos de crescimento	Arykama et al. (1965)
<i>Clarias</i> híbrido	0,6	Proteína ideal	Unprasert (1994)
Salmão coho	0,5	Estudos de crescimento	Halver (1965)
Carpa comum	0,8	Estudos de crescimento	Nose (1979)
Tilápia do Nilo	1,0	Estudos de crescimento	Santiago & Lovell (1988)
Truta arco – íris	0,5	Estudos de crescimento	Walton et al. (1984)

^a Valores expressos na porcentagem da proteína
Fonte: NRC, 2011.

Hseu et al. (2003) estudando larvas de *Epinephelus coioides*, afirmam que dietas contendo 11 g kg⁻¹ de triptofano da proteína proporcionam uma maior homogeneidade dos animais, diminuindo o canibalismo. Gaylord et al. (2005) testaram níveis de (10 a 14 g kg⁻¹) de triptofano

na dieta de *striped bass* híbridos (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) estimando níveis de (6 a 7 g kg⁻¹) de triptofano da proteína como ideais para melhorar o ganho de peso e sobrevivência. Esses autores observaram que os peixes alimentados com a dieta basal obtiveram uma sobrevivência de 40% enquanto que os alimentados com as dietas contendo triptofano apresentaram sobrevivência em torno de 100%. Em estudos com alevinos de *Labeo rohita* Abidi & Khan (2010) estimaram níveis de 9,0 a 9,5 g kg⁻¹ de triptofano da proteína para melhor crescimento e utilização eficiente dos alimentos. Coloso et al. (1992) trabalhando com juvenis de *Chanos chanos* analisaram a exigência de triptofano para essa espécie em torno de 6,0 g kg⁻¹ da proteína para um melhor desempenho. Esses autores relataram que dietas deficientes em triptofano causaram redução no crescimento e prejudicaram a conversão alimentar.

4.2 Estresse em peixes

Por ser extremamente dinâmico, o ambiente aquático está sujeito a diversas mudanças rápidas ou extremas como na concentração de oxigênio dissolvido, salinidade e pH. Os animais que habitam esse ambiente enfrentam essas e outras alterações que possam vir a causar estresse e diminuir a habilidade na manutenção da homeostase. Dessa forma, temos agentes estressores de natureza química, como por exemplo, alteração da concentração de oxigênio dissolvido, concentração elevada de amônia e nitrito que são decorrentes da degradação da matéria orgânica (Costa et al., 2004), presença de poluentes orgânicos e inorgânicos (Jorgensen et al., 2002) e, além disso, os de natureza física como: a alta densidade populacional, manuseio, confinamento, captura e transporte (Urbinati et al., 2004). Na piscicultura os agentes estressores têm sido causadores de perdas de lucros, pois afetam o metabolismo e conseqüentemente o crescimento dos animais.

Existem inúmeras maneiras de se definir o estresse, basicamente pode ser definido como um estímulo que promove alterações na homeostase, envolvendo o Sistema Nervoso Autônomo (Cannon, 1935). Segundo Mormède et al. (2007) o termo geral estresse é usado para descrever o desencadeamento de mecanismos de adaptação frente a fatores ambientais e a resposta a esses desafios. A definição de estresse gera muitas controvérsias, pois o que é estressante para uma pessoa ou animal nem sempre é estressante para outros membros da mesma espécie (Øverli et al., 2007). De acordo com Carmichael et al. (1984) Moyle & Cech, (1998) o estresse pode ser definido como uma série de respostas denominadas da Síndrome da Adaptação Geral (SAG), dividida em três etapas: primária, secundária e terciária.

A resposta neuroendócrina, ou primária é caracterizada quando um estímulo do sistema nervoso simpático atinge as células cromafins, no rim cefálico, por fibras oriundas do sistema nervoso simpático, liberando as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) que tem por função aumentar os batimentos do opérculo, estimular o fluxo de sangue pelas brânquias e aumentar a capacidade de transporte de oxigênio no sangue. Outro componente da resposta primária é a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é liberado pela hipófise e conduzido pela circulação até as células do tecido interrenal. Esse hormônio provoca a liberação do cortisol que possui ação mantenedora do estado supressor dos efeitos negativos. O cortisol também é um componente essencial na regulação osmótica em peixes (Wendelaar Bonga, 1997).

A resposta secundária inclui mudanças fisiológicas devido à liberação dos hormônios como aumento da pressão sanguínea, maior oxigenação e mobilização das reservas de energia. Nesta fase observa-se hiperglicemia que é causada pelo aumento das catecolaminas e mantida pelos altos valores de cortisol originados pela glicogenólise no fígado (Mommsen et al., 1999). A hiperglicemia tem o papel de proporcionar energia para os peixes na fuga ou enfrentamento de situações que podem ser consideradas adversas (Bonga, 1997).

Em decorrência dos fatores citados, a resposta terciária envolve todo o organismo animal, inclui a redução do crescimento, reprodução (Weil et al., 2001), reduz a resistência dos peixes a doenças devido à diminuição do número de leucócitos circulantes, ocorrendo como consequência linfocitopenia que é caracterizada pela redução do número de linfócitos e a neutrofilia que é causada pelo aumento dos neutrófilos circulantes (Mazeuau et al., 1977).

Devido ao fato do estresse causar muitos prejuízos aos produtores e também para o bem-estar dos peixes, alternativas devem ser buscadas para a redução desse quadro. Uma forma para minimizar o estresse pode ser o aumento da produção de serotonina por meio da suplementação dietária com triptofano, precursor da serotonina. Estudos que utilizam alterações nos níveis de triptofano na alimentação podem fornecer informações das modificações nos níveis de serotonina endógena (Young & Leyton, 2002).

4.2.1 Suplementação de triptofano em dietas para atenuação do estresse

Em diferentes espécies de animais tem sido demonstrado que o triptofano tem a capacidade de reduzir o comportamento agressivo (Lepage et al., 2005) e a resposta ao estresse (Adeola & Ball, 1992). Goihl (2006) observou que o triptofano também pode diminuir a conduta agressiva, e Adrien (2002) analisou que, em pacientes depressivos, há uma diminuição da concentração plasmática de triptofano, e uma redução da atividade serotoninérgica no cérebro. Adeola & Ball, (1992) avaliando o efeito do triptofano em suínos estressados relataram que suínos submetidos ao

estresse durante ao abate apresentaram concentração de serotonina 28% a menos quando comparados com suínos que estavam com baixo grau de estresse. Koopmans et al. (2006) observaram que suínos, cuja dieta foi suplementada com 0,5% de triptofano, apresentaram aumento da atividade serotoninérgica hipotalâmica, com consequências benéficas no trato gastrintestinal e diminuição do estresse. Em suínos, o efeito da resposta do triptofano sobre o estresse tem sido observado em casos de deficiência ou após a administração de grandes doses deste aminoácido (Koopmans et al., 2005; Guzik et al., 2006).

Redução na bicagem com adição de níveis crescentes de triptofano na dieta foi observado para galos em jejum (Shea Mench & Thomas 1990). Segundo Laycock & Ball (1990) houve redução no comportamento de histeria em matrizes de aves oito dias após ingerirem ração suplementada 5 g kg⁻¹ de triptofano. Van Hierden et al. (2002), observaram que aves com níveis elevados de serotonina no cérebro apresentaram menor propensão à bicagem e foram mais eficientes no acesso e utilização de comedouros e bebedouros. Shea et al. (1991), relataram que o triptofano teve efeitos mais significativos sobre a agressão em frangos dominantes do que nos frangos subordinados, sugerindo que o triptofano pode ser convertido em 5 HT (serotonina) e por sua vez pode suprimir o comportamento agressivo dos animais dominantes. A diminuição da agressão por dominantes permitiu aos subordinados obter maior acesso a alimentação.

O estresse induzido por bicadas foi também avaliado por Van Hierden et al. (2004) em frangas da linhagem White Leghorn alimentadas com dietas com e sem triptofano antes da retirada de sangue. Os resultados comprovaram que a dieta com triptofano promoveu aumento significativo dos níveis de corticosterona nas aves com baixa incidência de bicadas. Além disso, as aves com alta incidência de bicadas ficaram mais ativas com o fornecimento do triptofano.

Estudos realizados com codornas japonesas demonstraram que os níveis de triptofano testados não afetaram o desempenho e os parâmetros fisiológicos utilizados na avaliação do estresse como relação heterófilo/linfócitos e concentração plasmática de corticosterona (Rizzo et al., 2008). Esses autores relataram que os resultados obtidos não diferiram significativamente entre as aves que receberam a dieta controle e aquela com níveis reduzidos de triptofano. Segundo Gross & Siegel (1983), a concentração de corticosterona no plasma é utilizada como parâmetro para medir o estresse em frangos.

Em experimento realizado por Ohtani et al. (1989) com galinhas poedeiras no período de 25 e 42 semanas, não foram observadas diferenças significativas entre os efeitos dos níveis de triptofano, todavia, neste mesmo experimento, as poedeiras que receberam os maiores níveis de triptofano apresentaram aumento na produção de ovos no período de 53 a 82 semanas de idade. Peganova et al. (2003) e Antar et al. (2004) trabalhando com galinhas poedeiras, não encontraram

efeito significativo dos níveis de triptofano para massa de ovos. Entretanto, Russell & Harms (1999) também trabalhando com galinhas poedeiras, observou que o aumento dos níveis de triptofano nas dietas elevou a massa de ovos.

Laranja Jr et al. (2010) avaliaram o efeito da suplementação do triptofano na dieta do caranguejo *Scylla serrata*, e observaram que a suplementação com 0,5-1% de triptofano aumentou significativamente a circulação de serotonina e suprimiu significativamente o comportamento agonístico (comportamento de luta), aumentando assim a sobrevivência. Contudo, os níveis mais elevados de triptofano na dieta podem afetar o crescimento do caranguejo, estes autores observaram que a suplementação de triptofano resultou em um aumento significativo da concentração da serotonina na hemolinfa, que foi claramente observado após a luta, sugerindo que a serotonina desempenha um papel importante na supressão do comportamento agonístico do caranguejo durante os encontros agressivos. Esses autores determinaram $7,2 \text{ g kg}^{-1}$ de triptofano da proteína para o caranguejo *Scylla serrata*. Estudos relacionados com outros crustáceos como com o *Peneaus monodon* Millamena et al. (1999) determinaram $5,0 \text{ g kg}^{-1}$ de triptofano da proteína, enquanto Akiyama et al. (1991) recomendam $8,0 \text{ g kg}^{-1}$ de triptofano da proteína para o camarão.

Uma série de estudos tem demonstrado que a suplementação alimentar com triptofano eleva a atividade serotoninérgica cerebral em peixes. Tejpal et al. (2009), em estudo avaliando a suplementação de triptofano sobre o estresse da alta densidade em alevinos de *Cirrhinus mrigala*, observaram que a suplementação dietética com triptofano reduz o estresse nesta espécie. Nesse experimento, a adição de triptofano na alimentação dos peixes em alta densidade melhorou os parâmetros de crescimento, diminuiu as concentrações de cortisol no sangue, bem como a glicose (o que indica que o triptofano contribuiu para atenuar o estresse).

O fornecimento de dietas suplementadas com triptofano para truta arco-íris reduziu o número de ataques entre os peixes, mostrando a existência de uma relação entre este aminoácido e a redução da agressividade (Lepage et al., 2005). A inibição do comportamento agressivo dos peixes pode estar relacionada com a redução da reatividade do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal, indicada pelos níveis pós- estresse mais baixos do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisol (Winberg et al., 2001; Lepage et al., 2002; Lepage et al., 2003). Estudos preliminares realizados com larvas de matrinxã (*Brycon amazonicus*) também indicaram um efeito do triptofano na redução do canibalismo e aumento da sobrevivência da espécie durante a fase inicial de vida (Hoshiba, 2007), de acordo com esse autor o enriquecimento da ração com triptofano pode ser uma alternativa viável para a criação de matrinxã, aumentando a sobrevivência das larvas, diminuindo o canibalismo e gerando maior produtividade.

Höglund et al. (2005) em dois experimentos com juvenis de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), demonstraram que em um estudo comportamental, os peixes alimentados com dietas contendo 28 g kg^{-1} de triptofano por três dias apresentaram uma diminuição significativa nos atos agressivos, o número médio de agressões também foi significativamente menor em relação ao grupo controle que não receberam dietas suplementadas com triptofano. No segundo estudo, esses mesmos autores avaliaram o efeito da suplementação do triptofano (28 g kg^{-1}) sobre a atividade da serotonina (5 HT) cerebral e observaram que os peixes alimentados com triptofano apresentaram valores mais elevados de serotonina em relação ao grupo controle. Em conclusão, estes estudos demonstraram que os juvenis de bacalhau do Atlântico são altamente agressivos e que a suplementação de triptofano na alimentação afeta os sistemas centrais da serotonina (5 HT) e reduz o comportamento agressivo.

De acordo com Hseu et al. (2003) juvenis de garoupa alimentadas com dietas suplementadas com triptofano apresentaram maior homogeneidade entre os lotes e menor canibalismo. No entanto, estes autores também observaram que os peixes alimentados com dietas suplementadas com triptofano apresentaram menores taxas de crescimento, sugerindo que isso poderia estar relacionado com um aumento na atividade serotoninérgica cerebral, e uma diminuição da agressão e apetite.

Winberg et al. (2001) relataram que a suplementação dietética com triptofano na alimentação de truta arco-íris por sete dias resultou na inibição do comportamento agressivo, enquanto que em três dias de alimentação com triptofano não foi observado nenhum efeito sobre o comportamento agressivo. Estes mesmos autores sugerem que a ingestão elevada de triptofano em peixes, resulta no aumento da liberação da 5 HT (serotonina) sináptica. Os mecanismos pelos quais a serotonina exerce inibição no comportamento agressivo ainda não são completamente compreendidos. A ausência de efeito do tratamento com triptofano por um curto prazo (três dias) sugere que outros mecanismos, além do aumento da produção de serotonina, possam estar envolvidos. A ativação da atividade serotoninérgica cerebral a longo e curto prazo parece ter efeitos distintos no comportamento agressivo, sendo que somente a ativação à longo prazo tem efeito inibitório (Winberg et al., 2001).

Segundo Lepage et al. (2003) truta arco-íris alimentadas com dietas suplementadas com triptofano por sete dias apresentaram uma diminuição nos níveis de cortisol plasmático, porém, os peixes alimentados com dietas suplementadas com triptofano por três dias não apresentaram efeito sobre o cortisol plasmático, apesar de o cortisol ter sido ligeiramente mais elevado em comparação com os peixes alimentados com a ração controle. Relataram ainda, que após 28 dias a ingestão elevada de triptofano não apresentou efeito sobre o cortisol plasmático.

De acordo com Lepage et al. (2002), a suplementação da ração de truta arco-íris (*O. mykiss*) com triptofano, por sete dias, impediu o aumento dos níveis de cortisol induzidos por um agente estressor. Sendo assim, a influência da serotonina sobre o eixo HPI parece ser contexto dependente, apresentando diferentes efeitos dependendo das condições dos animais. Em outro estudo com a mesma espécie, a suplementação da ração com triptofano promoveu diminuição do número de ataques entre os peixes, corroborando a participação do triptofano na redução da agressividade dos peixes (Lepage et al., 2005), estes autores testaram a hipótese de que elevadas concentrações de triptofano dietário elevam as concentrações plasmáticas de melatonina e que esse aumento é causado por produção e secreção aumentadas do hormônio pelo trato gastrointestinal. A alimentação dos peixes com dieta suplementada com triptofano elevou os níveis de melatonina durante o dia e reduziu os níveis de cortisol pós-estresse, sugerindo a existência de um mecanismo para a melatonina na mediação dos efeitos de níveis aumentados de triptofano sobre a dinâmica do cortisol pós-estresse e no comportamento agressivo da truta.

Trabalhando com juvenis de matrinxã Wolkers (2010) observou que a suplementação alimentar com triptofano promoveu modificações comportamentais seletivas em juvenis de matrinxã confrontados com intrusos intraespecíficos, alterando a estratégia comportamental agressiva da espécie. Os matrinxãs alimentados com triptofano por sete dias apresentam diminuição de comportamentos de agressão direta, aumento de comportamentos relacionados à ameaça e da latência para os ataques contra o intruso. Além disso, o efeito do triptofano sobre o comportamento dos peixes é restrito às fases iniciais da luta. Essas alterações comportamentais causadas pelo tratamento com triptofano estão relacionadas à ação inibitória da serotonina na agressão e à diminuição na motivação para a briga, em função da diminuição da ativação dopaminérgica durante a luta.

5 HEMATOLOGIA DE PEIXES TELEÓSTEOS

5.1 Sangue

As primeiras observações das células vermelhas do sangue foram feitas por Jan Swammerdam em 1658 (Hajdu, 2003). O tamanho e a forma das células vermelhas foram descritas por Antoni Van Leeuwenhoek em 1665, observando curiosamente eritrócitos do sangue de peixes. Esse mesmo autor descreveu a cor avermelhada das células, ele afirmava que a cor era evidente quando algumas células se agregavam, podendo concluir que a cor do sangue derivava

das células do qual era composto (Harris, 2000). Assim, um dos primeiros registros morfológicos de células incluindo a primeira observação de núcleo foi realizado em sangue de peixe (Ranzani – Paiva & Lizama, 2004). Como representavam menos de 1% das células do sangue, neste primeiro momento os leucócitos não foram observados. A primeira descrição dessas células se deu simultaneamente 1843 por dois pesquisadores que observaram que doenças alteravam o número e a morfologia dessas células (Hajdu, 2003). Nessa mesma época foi observado que no pus existiam leucócitos.

O sangue é definido como um tecido de matriz extracelular fluida denominada plasma e elementos celulares livres, que transita pelo organismo através do sistema circulatório. Também é responsável pela manutenção da homeostase, por ser o principal meio de transporte de substâncias pelo organismo como: oxigênio, gás carbônico, nutrientes, metabólitos, hormônios e outros mediadores bioquímicos, resíduos metabólicos a serem eliminados, dentre outros. Além disso, o sangue é um dos principais responsáveis pela defesa do organismo, devido ao transporte de células de defesa, anticorpos e outros componentes que podem atuar de forma direta ou indireta neste processo (Jain et al., 2000; Junqueira & Carneiro, 1999).

Com o surgimento do microscópio foi possível observar e estudar as células do sangue. Esse estudo das células sanguíneas é conhecido como hematologia, que é uma ferramenta fundamental para diagnósticos de doenças infecciosas, leucemias e estresse (Garcia - Navarro & Pachally, 2005). De acordo com Paes et al. (2000), o hemograma é um exame complementar que fornece ao profissional da área de produção animal informações sobre o estado de saúde dos animais. Assim, diversos pesquisadores das mais variadas regiões do mundo, têm se preocupado em estabelecer valores referenciais para a contagem total de eritrócitos e outros constituintes sanguíneos. Portanto sua aplicação em pesquisa animal é bem aceita e considerada como procedimento de rotina em métodos de diagnósticos (Ranzani-Paiva & Silva-Souza, 2004).

5.2 Formação das células sanguíneas

Como os peixes são desprovidos de medula óssea, e linfonodos, o tecido linfóide e mileóide estão geralmente associados ao mesmo órgão. Nos peixes teleósteos, o órgão responsável pela hematopoiese, é a porção cefálica do rim, que além de produzir anticorpos, promove a interação imunoendócrina, que tem importância para ambos os sistemas (Weyts et al., 1999). A hematopoiese pode ser realizada no estroma esplênico e nos espaços periportais hepáticos, na submucosa intestinal, e no timo (Matushima & Mariano, 1996). Em *Ocorhynchus mykiss* o principal órgão responsável pela hematopoiese é o rim cefálico (Forero, 1995). No

Carassius auratus (Cyprinidae, Cypriformes), o principal sítio de formação de eritrócitos é o rim cefálico (Houston et al., 1996).

Nos últimos anos, inúmeras teorias foram propostas sobre a origem e o desenvolvimento das células sanguíneas nos órgãos hematopoiéticos. Duthie (1939) *apud* Tavares-Dias (2004) propôs que uma célula pluripotente denominada grande hemoblasto linfóide originária os granulócitos por transformação direta. Após divisão mitótica formaria os pequenos hemoblastos linfóides, os quais originariam os eritrócitos, trombócitos e linfócitos.

Posteriormente, Catton (1951) *apud* Tavares-Dias (2004) introduziu a teoria difilética para formação das células do sangue, ele considerou que o grande hemoblasto linfóide, derivado da transformação de células reticulares, seria o precursor dos granulócitos enquanto os pequenos hemoblastos linfóides originados de células endoteliais seriam os precursores dos eritrócitos, linfócitos e trombócitos.

5.3 Eritrócitos

Nos mamíferos os eritrócitos são anucleados, bicôncavos e com formato de disco esférico. Nos peixes, répteis, aves e anfíbios os eritrócitos apresentam núcleo e geralmente são ovais. Sendo as células mais numerosas no sangue. O núcleo central acompanha o formato da célula, apresentando cromatina compacta sem nucléolos.

Os eritrócitos contêm o pigmento respiratório, a hemoglobina, que tem por função transportar o oxigênio e parte do gás carbônico no sangue. Qualquer deficiência nos eritrócitos pode ser traduzida por uma falta de oxigênio nos tecidos. A forma do eritrócito e sua extrema plasticidade favorecem sua circulação nos capilares e, assim, qualquer modificação na forma acarretará perturbação circulatória e favorecerá sua destruição (Ranzani-Paiva; Takemoto; Lizama, 2004).

5.4 Hemoglobina

A hemoglobina é uma proteína conjugada composta por quatro grupamentos proteicos, a globina, e por um grupamento heme, cujo principal composto químico é o ferro (Garcia-Navarro & Pachaly, 1994). Nos peixes ela costuma ocorrer sob formas múltiplas. Várias hipóteses têm sido lançadas para explicar tal fenômeno. A principal dela é que cada fração hemoglobínica teria

propriedades funcionais específicas e a regulação da sua síntese poderia conferir ao animal maior chance de sobrevivência em ambientes variáveis. Diversas espécies da bacia amazônica, entre elas o tamoatá (*Hoplosternum littorale*), o jaraqui - de - escama - grossa (*Semaprochilodus insignis*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*), foram estudadas sob esse aspecto, comprovando-se que cada fração hemoglobínica pode possuir propriedades funcionais distintas (Baldisseroto, 2002).

6 SISTEMA IMUNE DOS PEIXES

Os principais componentes do sistema imune dos peixes são as células brancas do sangue, os leucócitos, produzidos, principalmente, no rim cefálico, timo e baço (Hrubec et al., 2000; Tort et al., 2003). O sistema imune é dividido em duas partes que se complementam: o sistema imune inato (não específico) e o adquirido (específico) (Roitt et al., 1998). O sistema imune inato é considerado como a primeira linha de defesa, incluindo barreiras físicas (pele e muco) e componentes celulares e moleculares (macrófagos, células *killer* e fatores solúveis de imunidade, como lisozima, proteínas do sistema complemento, peptídeos antimicrobianos, entre outros). Já o sistema específico é composto por macrófagos e, especialmente, as células dendríticas agem como “células apresentadoras de antígenos”, apresentando antígenos aos linfócitos T.

6.1 Imunidade inata (não específica)

Apesar de essenciais para evitar as infecções, as barreiras físicas não conseguem ser completamente eficientes sozinhas. Com persistência e tempo um microrganismo eventualmente conseguirá eliminar as barreiras físicas. Contudo, os animais nem sempre estão doentes, provavelmente porque a maioria das tentativas de infecções microbianas são bloqueadas antes mesmo que possa resultar em doença. Essa é a função do sistema imune inato. Essa segunda barreira de defesa consiste em mecanismos celulares e químicos de resposta rápida. Os peixes não possuem medula óssea e linfonodos, sendo o timo, rim cefálico, baço e tecidos associados com o intestino, seus tecidos linfóides. A primeira linha de defesa do corpo é a imunidade inata, natural ou não específica. É definida como um conjunto de mecanismos que protege o organismo contra infecções, sem uma prévia exposição ao agente causador (Bols et al., 2001). Os leucócitos incluem parte da resposta inata, que após quimiotaxia e diapedese até o foco lesado, possuem a capacidade de reconhecer os patógenos, fagocitá-los e degradá-los. A fagocitose inicia com o englobamento do patógeno por meio dos pseudópodos, internalização com formação de fagossoma, fagolisossoma com início de eventos microbicidas e degradação (Roitt et al., 1998).

6.1.1 Imunidade adquirida (específica)

As funções da resposta imune específica é o reconhecimento do agente invasor como corpo estranho por células do sistema imune, culminando com a formação de anticorpos e memória imunológica. A imunidade específica refere-se à proteção que existe num organismo hospedeiro

quando este sofreu prévia exposição a determinados agentes, sendo que pode ser mediada por anticorpos (imunidade humoral) ou por células (Secombes, 1996).

Apesar da distinção na classificação desses dois sistemas de defesa, deve-se entender que sempre que um agente patogênico ataca o organismo, este se defende mediante a interação da maioria dos elementos que compõem o sistema imune, onde vários fatores de cada sistema podem agir separadamente ou em combinação (Fernandez et al., 2002).

7 LEUCÓCITOS

Em meados de 1800 as fundamentações de hematologia foram estabelecidas (Hajdu, 2003). Mas somente em 1879, Paul Ehrlich desenvolveu corantes para diferenciar células em tecidos e os aplicou em extensões sanguíneas, iniciando a classificação dos diferentes tipos de leucócitos (Mitchell, 2009). Os leucócitos são definidos como corpúsculos incolores e sua principal função é a defesa do organismo contra a ação de bactérias ou corpos estranhos que penetram nos tecidos (Junqueira & Carneiro, 2004).

Os linfócitos, monócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos, são os leucócitos observados na circulação de peixes (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

7.1 Linfócitos

Os linfócitos são as células mais numerosas na circulação sanguínea em diversas espécies de teleósteos, incluindo a tilápia do Nilo. São células predominantemente arredondadas, o núcleo ocupa quase toda a célula e o citoplasma apresenta projeções que conferem um contorno irregular e coloração basofílica (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Os linfócitos estão implicados na resposta imunitária adquirida e podem dividir-se em dois grupos funcionais, os linfócitos T responsáveis pela imunidade celular, e os linfócitos B responsáveis pela produção de imunoglobulinas e outros mediadores celulares (Samour & Pendl, 2009; Pendl, 2011).

7.2 Neutrófilos

Nos peixes teleósteos os neutrófilos são células arredondadas, o citoplasma possui granulações acidófilas muito finas. O núcleo apresenta forma de bastonete, pode ser segmentado e, em geral, excêntrico, sendo a cromatina nuclear pouco compacta e sem nucléolo visível. Possui grande quantidade de grânulos com dimensões reduzidas, com ou sem estrutura cristalóide interna.

O núcleo é oval, eventualmente forma lobos incompletos (Tavares-Dias & Moraes, 2004). São as primeiras células envolvidas nos estágios iniciais de inflamação nos peixes (Manning, 1994).

7.3 Monócitos

Os monócitos são considerados células grandes (Ranzani-Paiva et al. 2003). O núcleo pode ser oval ou arredondado, às vezes edentado ou em forma de U ou rim. São células parcialmente diferenciadas, apresentam moderada propriedade fagocítica. Sob condições apropriadas, saem do sistema vascular e completam sua maturação, tornando-se macrófagos maduros, nos tecidos (Morrow & Pulsford, 1980). São também responsáveis pela interação antígenos-imunoglobulina específica, e pela apresentação de antígenos aos linfócitos (Campbell, 2006).

7.4 Eosinófilos

Os eosinófilos são células arredondadas, com tamanho variado, que geralmente muda de acordo com a quantidade e o tamanho dos grânulos no citoplasma, apresentam granulações específicas no citoplasma que são esféricas de contorno nítido de cor laranja - avermelhado ou avermelhado. Muitas vezes estão ausentes no sangue periférico dos peixes teleósteos, sendo mais abundante no tecido hematopoiético, submucosa intestinal, líquido peritoneal, mesentério e brânquias (Ranzani-Paiva, 1995).

7.5 Basófilos

Os basófilos são raramente encontrados na corrente sanguínea de peixes. A função dos basófilos nos peixes ainda não está definida, parece estar relacionada com processos alérgicos, pois apresentam histamina em seus grânulos. Ainda não se tem conhecimento da função do basófilo nos peixes (Ranzani-Paiva, 1995).

7.6 Célula granulocítica especial (CGE)

As células granulocíticas especiais (CGE) são células grandes com contorno regular bem definido e núcleo pequeno, de formato excêntrico, arredondado ou ligeiramente alongado. O citoplasma, abundante, é rico em granulações claras, transparentes e grosseiras, que se espalham homogeneamente (Ranzani-Paiva & Silva-Souza, 2004). Essas células são encontradas apenas em extensões sanguíneas de peixes e suas funções ainda não estão bem definidas.

8 TROMBÓCITOS

Os trombócitos são células equivalentes às plaquetas em mamíferos, porém são estruturalmente distintos. São células predominantemente elípticas, com núcleo fusiforme e hipercoreado (Ranzani-Paiva & Silva-Souza, 2004). A função e a ocorrência de trombócitos ainda não estão bem definidas, acredita-se que a funcionalidade desta célula em peixes, pode estar envolvida no processo de coagulação do sangue e também ligada a processos inflamatórios (Martins et al. 2006).

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abidi, S.F., Khan, M. (2010) Dietary Tryptophan Requirement of Fingerling Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), Based on Growth and Body Composition. Journal of the World aquaculture society, v. 41, p. 700-709.

Acerete, L., Balasch, J. C., Espinosa, E., Josa, A., Tort, L. (2004) Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) subjected to stress by transport and handling. Aquaculture, v. 237, p. 167-178.

Adeola, O., Ball, R.O. (1992) Hypothalamic neurotransmitter concentrations and meat quality in stressed pigs offered excess dietary tryptophan and tyrosine. Journal Animal Science, v.70, p. 1888–1894.

Adrien, J. (2002) Neurobiological bases for the relation between sleep and depression. Sleep Medicine Reviews, v. 6, p. 341-351.

Akiyama, D.M. Dominy, W.G. Lawrence, A.L. (1991) Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry revised. Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop, Thailand and Indonesia, American Soybean Association, Singapore, p. 80–98.

Aldegunde, M., Garcia, J., Soengas, J.L., Rozas, G. (1998) Uptake of tryptophan into brain of Antar, R.S., Harms, R.H., Shivazad, M. (2004) Performance of commercial laying hens when six percent corn oil is added to the diet at various ages and with different levels of tryptophan and protein. Poultry Science, v.83, p.447-455.

Arends, R.J., Mancera, J.M., Munoz, J.L., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G. (1999). The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. Journal Endocrinology, v. 163, p. 149-157.

Baldisserotto, B. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria: Editora da UFSM, 2002. 212p.

Barros, K.M., Manhães-De-Castro R, Lopes-De-Souza S., Matos, R. J., Deiró, T.C., Cabral-Filho, J.E., Cannon, F. (2006) A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutritional Neuroscience*, v. 9, p. 99-104.

Barton BA, Iwama GK. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the responses and effects of corticosteroids. *Annual Review of fish Diseases*, v.1, p.3-26.

Beardmore, J.A., Mair, G.C., Lewis, R.I. (2001) Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture*, v.197, p.283-301.

Berman, M. (1997) The serotonin hypothesis of aggression revised. *Clinical Psychology Review*. n. 6, p. 651-655.

Biggio, G., Fadda, F., Fanni, P., Tagliamonte, A., Gessa, G.L. (1974) Rapid depletion of serum tryptophan, brain tryptophan, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid by tryptophan-free diet. *Life Sciences*, v.14, p.1321-1329.

Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C, Lee, L.E.J. (2001) Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, v.25. p. 853- 873.

Boscolo, W.R., Hayashi, C., Soares, C.M., Furuya, W.M., Meurer, F. (2001) Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases iniciais e de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa v. 30, n.5, p. 1391-1396.

Campbell T.W. (2006) Hematology of birds. In M.A. Thrall, D.C. Baker, T.W. Campbell, D. DeNicola, M.J. Fettman, E.D. Lassen, A. Rebar & G. Weiser (Eds). *Veterinary hematology and clinical chemistry*. (pp. 225-258). Iowa: Blackwell Publishing.

Campo, L.F.C. LA TILAPIA ROJA: una evolucion de 26 años, de la incertidumbre al exito. México, 2008. 147p.

Cannon, W. (1935) Stress and strains of homeostasis. *American Journal of the Medical Sciences*, v. 189, p. 1 – 14.

Carmichael, G.J., Tomasso., J.R., Simco, B.A., Davis, K.B. (1984) Confinement and water quality induce stress in largemouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 113, p. 767 – 777.

Cassone, V. M. (1998) Melatonin's role in vertebrate circadian rhythms. *Chronobiology International*, v.15, p.457–473.

Castagnolli, N. (1992) *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal. FUNEP, 189p.

Castagnolli, N. (1996) *Aqüicultura para o ano 2000*. Brasília: CNPq, 95p.

Coccaro, E.F., Kavoussi, J., Hauger, R.L. (1997) Serotonin function and antiaggressive response to fluoxetine: a pilot study. *Biologic Psychiatry*, v. 42, p. 546-552.

Coloso, R. M., Murillo-Gurrea, D. P., Borlongan, I. G., Catacutan, M. R. (2004) Tryptophan requirement of juvenile Asian sea bass *Lates calcarifer*. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 20, p. 43–47.

Coloso, R. M., Tiro, L. B., Benitez. L. V. (1992) Requirement for tryptophan by milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 10, p. 35–41.

Costa, O.F.T., Ferreira, D.J.S., Mendonça, F.L.P., Fernandes, M.N. (2004) Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae) to short – term exposure to nitrite. *Aquaculture*, v. 232, p.627 – 636.

Cyrino, J.E.; Conte, L.; Tilapicultura em Gaiolas: produção e economia. In: José Eurico Possebon Cyrino e Elisabeth Criscuolo Urbinati (Eds.). *AquaCiência 2004: Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura*. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, cap.12, p.151-171, 2006.

Deiró, T.C., Manhães-de-Castro R, Cabral-Filho, J.E., Barreto-Medeiros J.M., Souza, S.L., Marinho, S.M., Castro, F.M., Toscano, A.E., Jesus-Deiró, R.A., Barros, K.M. (2006) Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. *Physiology & Behavior*, v. 87, p. 338-44.

Denapoli, J. S.; Dodman, N. H.; Shuster, L. William M. R.; Phdkathy L. G. (2000) Effect of dietary protein content and tryptophan supplementation on dominance aggression, territorial aggression, and hyperactivity in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.217, p. 504–508.

Edwards, D.H., Kravitz, E. A. (1997) Serotonin, social status and aggression. *Current Opinion in Ekström, P.; Meissl, H. (1997) The pineal organ of teleost fishes. Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v.7, p.199–284.

Fagbenro, o. A.; Nwanna, L. C. (1999) Dietary Tryptophan Requirement of the African Catfish, *Clarias gariepinus*. *Journal of Applied Aquaculture*, v. 9, n. 1, p. 65 – 72.

Falcón J. Cellular circadian clocks in the pineal. (1999) *Progress in Neurobiology*, v.58, p.121–162.

FAO. Organización De Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, 2012. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf> Acesso em 28 out. 2012.

Fernandez, A.B., DE Blas, I.; Ruiz, I. (2002) El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. Revista AcuaTIC. Zaragoza, v.16, p. 1-15.

Fernstrom, J.D. (1983) Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. *Physiological Reviews*. v. 63, p. 484-546.

Fernstrom, J.D. (2000) Can nutrient supplements modify brain function? *American Journal Clinical Nutrition*, v. 71, p. 1669-73.

Fernstrom, J.D., Wurtman, R.J. (1971) Brain serotonin content: physiological dependence on plasma tryptophan levels. *Science*, v.173, p.149-152.

Forero, A.R. (1995) Determinación de algunos aspectos hematológicos de *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae). *Revista de Biología Tropical*, v. 43, p.283-288.

Gallagher, D.W. & Aghajantan, G.K. (1976) Inhibition of ring of raphe nucleus by tryptophan and 5-hydroxytryptophan blockade by inhibiting serotonin synthesis with Ro-4-4602. *Neuropharmacol*, v. 15, p. 149-156.

Garcia-Navarro, C.E.K., Pachaly, J.R. (2005) *Manual de Hematología Veterinária*, 2 ed. São Paulo: Editora Varela.

Gaylord, t. G., Rawles, s. D., Davis, k. B. (2005) Dietary tryptophan requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Aquaculture Nutrition*, v. 11, p. 367-374.

Goihl, J. (2006) Tryptophan can lower aggressive behavior. *Feedstuffs*, v. 78, n. 9, p. 12-22.

Gross, W.B.; Siegel, H.S. (1983) Evaluation of the heterophil/ lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Disease*, v.27, p.972-979.

Guzik, A.C., Matthews, J.O., Kerr, B.J., Bidner, T.D., Southern, L.L., (2006) Dietary tryptophan effects on plasma and salivary cortisol and meat quality in pigs. *Journal Animal Science*, v. 84, 2251–2259.

Hajdu, S. I. 2003. A note from history: The discovery of blood cells. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, v.33, p. 237 – 238.

Harris, H. (2000) *The Birth of the Cell*. 1^a ed. Yale: Yale University Press. 212p.

Höglund, E., Bakke, M.J., Øverli, Ø., Winberg, S., Nilsson, G.E. (2005) Suppression of aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by L-tryptophan supplementation. *Aquaculture*, v. 249, p. 525–531.

Hoshiba, M. A. Enriquecimento da alimentação das larvas de matrinxã (*Brycon amazonicus*) com aminoácidos. Influência no crescimento inicial e sobrevivência das larvas. 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado em zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2007.

Houston, A.H., Roberts, W.C., Kennington, J.A. (1996) Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish *Carassius auratus* L. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.15, p. 481-489.

Hrubec, T. C., Cardinale, J. L., Smith, S. A. (2000) Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis Hybrid*). *Veterinary Clinical Pathology*, v. 29, p. 7 – 12.

Hseu, J.R., Lu, F.I., Su, H.M., Wang, L.S., Tsai, C.L., Hwang, P.P. (2003) Effect of exogenous tryptophan on cannibalism, survival and growth in juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, v. 218, p. 251–263.

Iwama, G. K., Vijayan, M. M.; Morgan, J. D. (1999) The stress response in fish. In: Saksena, D. N. (Ed.) Ichthyology: recent research advances. Enfield: Science, p. 47-57.

Jacobs, B.L.; Fornal, C. A. (1991) Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. *Pharmacological Reviews*, v.43, p.

Jain, N.C., Feldman, B. F. & Zinkl, J.G. (2000) *Schalm's Veterinary Hematology*. 5. Ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 538p.

Jorgensem.E.H., Vijayan, M. M., Aluru, N., Maule, A. G. (2002) Fasting modifies Aroclor 1254 impact on plasma cortisol, glucose, and lactate responses to a handling disturbance in Arctic charr. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.132, p. 235 – 245.

Jorgensen, H.S. Studies on the neuroendocrine role of serotonin. (2007) *Danish Medical Bulletin*, v.54, p. 266-288.

Junqueira, L.C., Carneiro, J. (1999) *Histologia Básica*. 9. Ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan S.A., 427 p.

Kapezinski, F., Busnello, J., Abreu, M.R., Carrão, A. D. (1998) Aspectos da fisiologia do triptofano. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 25, p. 158-65.

Kim, K., Kayes, T.B. & Amundson, C.H. (1987) Effects of dietary tryptophan levels on growth, feed/gain, carcass composition and liver glutamate dehydrogenase activity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemical and Physiology*, v.88, p. 737–741.

Koopmans, S.J., Guzik, A.C., Van der Meulen, J., Dekker, R., Kogut, J., Kerr, B.J., Southern, L.L. (2006) Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling piglets. *Journal of Animal Science*, v. 84, p. 963-969.

Koopmans, S.J., Ruis, M., Dekker, R., van Diepen, H., Korte, M., Mroz, Z. (2005) Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs. *Physiology & Behavior*, v. 85, p. 469 – 478.

Kubitza, F. (2000) *Tilápia: tecnologia e produção comercial*. Jundiaí: Divisão de Biblioteca e Documentação da USP, 285p.

Laranja JR, J.L., Quintio, E.T., Catacutan, M.R., Coloso, R. M. (2010) Effects of dietary L-tryptophan on the agonistic behavior, growth and survival of juvenile mud crab *Scylla serrata*. *Aquaculture*, v. 310, p. 84–90.

Laycock, S. R., Ball, R. O. (1990) Alleviation of hysteria in laying hens with dietary tryptophan. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Ottawa, v. 54, n. 2, p. 291-295.

Lepage, O., Larson, E.T., Mayer, I., Winberg, S. (2005) Serotonin, but not melatonin, plays a role in shaping dominant-subordinate relationships and aggression in rainbow trout. *Hormones and Behavior*, v. 48, p. 233–242.

Lepage, O., Tottmar, O., Winberg, S. (2002) Elevated dietary L tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal Experimental Biology*, v. 206, p. 3589–3599.

Lepage, O., Vilchez, I. M., Pottinger, T. G., Winberg, S. (2002) Timecourse of the effect of dietary l-tryptophan on plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology*, v.206, p.3589–3599.

Lepage, O.; Larson, E. T.; Mayer, I.; Winberg, S. (2005) Tryptophan affects both gastrointestinal melatonin production and interrenal activity in stressed and nonstressed rainbow trout. *Hormones and Behavior*, v. 38, p. 264–271.

Lima, L.C., Ribeiro, L.P., Malison., J.A., Barry., T.P, Held., J.A. (2006) Effects of temperature on performance characteristics and the cortisol stress response of *surubim Pseudoplatystoma sp.* *Journal World Aquaculture Society*, v.37, p. 89-95.

Lopes, S. T. A., Biondo, A. W., Santos, A. P. (2007) Manual de patologia clínica veterinária. 3. ed. Santa Maria: UFSM, 107 p.

Lowe-Mcconnel. (1975) Fish communities in Tropical Freshwaters. Longman Inc., New York, Longman, 283 p.

Lynn, S.E., Egar, J.M., Walker, B.G., Sperry, T.S., Ramenofsky, M. (2007) Fish on Prozac: a simple, noninvasive physiology laboratory investigating the mechanisms of aggressive behavior in *Betta splendens*. *Advances in Physiology Education*, v.31, p. 358-363.

Manning, M.J. (1994) Fishes. In: Turner (Ed.), *Immunology*. Chichester: John Wiley and Sons, p.69-100.

Marengoni, N.G., Bueno, G.W. Avaliação do desenvolvimento da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Linhagem Chitralada) em tanques rede de pequeno volume. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 14, 18-12out. 2005, Fortaleza. Resumo Expandido. Fortaleza. Associação dos Engenheiros de Pesca do Estado do Ceará, p.1286-1298, 2005.

Marklová, E., Makovic'ková, H., Krákorova, I. (2000) Screening for defects in tryptophan metabolism. *Journal of Chromatography A*, v. 870, p. 289-293.

Martins, M.L., Moraes, F. R. de; Fujimoto, R. Y., Onaka, E. M., Bozzo, F. R.; Moraes, J. R. E. de. (2006) Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: characidae) cultured in Brazil. *Boletim Instituto da Pesca*, São Paulo, v. 32, p. 31-39.

Matushima, E.R., Mariano, M. (1996) Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageen in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.33, p. 5-10.

Mazeud, M.M., Mazeud, F., Donaldson, E.M. (1997) Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 106, p.201- 212.

Miczek, K.A., Faccidomo, S., De Almeida, R.M.M., Bannai, M., Fish, E.W., Debold, J.F. (2004) Escalates aggressive behavior. New Pharmacotherapeutic approaches and opportunities. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1036, p. 336-355.

Millamena, O.M. Teruel, M.B., Kanazawa, A., Teshima, S. (1999) Quantitative dietary requirements of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon*, for histidine, isoleucine, leucine, phenylalanine and tryptophan . Aquaculture, v.179, p. 169–179.

Ministério Da Pesca E Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010. Brasília, 2012. Disponível em < <http://www.mpa.gov.br/index.php/topicos/300-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010> > Acesso em 10 out 2012.

Mitchell, D. Blood Staining: A Brief History. 2009. Disponível em:

http://healthfieldmedicare.suite101.com/article.cmf/blood_staining_a_brief_history#ixzz0Br3yhvJP

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W. (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Fish Biology and Fisheries, v. 9, p. 211- 268.

Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., Van Reenen, C. G., Richard, S., Veissier, I. (2002) Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. Physiology & Behavior, v. 92, p. 317-339.

Morrow, W. J. W., Pulsford, A. (1980) Identification of peripheral blood leucocytes of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) by electron microscopy. Journal Fish Biology, Huntingdon, v. 17, p. 461-47.

Moyle, P.B. Cech, J.J. Jr. (1996) Fishes: An Introduction to Ichthyology. Prentice-Hall: Upper Saddle River, 590pp.

Murthy, H. S., Varghese, T. J. 1996. Quantitative dietary requirement of threonine for the growth of the Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Journal of Aquaculture in the Tropics*, v. 11, p.1-7.

National Research Council. (2011) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. Washington, DC: The National Academies Press.

Ogino, C. (1980) Requirements of carp and rainbow trout for essential amino acids. *Bulletin of the Japan Society for the Science of Fish*, v.46, p. 171-174.

Ohtani, H., Saitoh, S., Ohkawara, H., Akiba, Y., Takahashi, k., Horiguchi, M., K, Goto. (1989) Production performance of laying hens fed L-tryptophan. *Poultry Science*, v.68, p.323-326.

Oldendorf, W.H. & Szabo, J. (1976) Amino acids assignment to one of three blood-brain Barrier amino acid carriers. *American Journal Physiology*, v. 230, p. 94-98.

Ono, E. A., Kubitza, F. (2003) *Cultivo de peixes em tanques-rede*. 3ªed. Jundiaí: Eduardo A. Ono, 112p.

Øverli, Ø., Sørensen, C., Pulman, K. G. T., Pottinger, T. G., Korzan, W., Summers, C. H., Nilsson, G. E. (2007) Evolutionary background for stress-coping styles: Relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 31, p. 396-412.

Paes, P. R.; Barioni, G.; Fontequê, J. R. (2000) Comparação dos valores hematológicos entre caprinos fêmeas da raça Parda Alpina de diferentes faixas etárias. *Veterinária Notícias*, v. 6, p. 43-49.

Parent, A. (1984) Functional anatomy and evolution of monoaminergic systems. *American Zoology*, v.24, p.783-790.

Peganova, S., Hirche, F., Eder, K. (2003) Requirement of tryptophan in relation to the supply of large neutral amino acids in laying hens. *Poultry Science*, v.82, p.815-822.

Pendl, H. (2011). Avian and reptilian haematology. In J. Samour & A. Montesinos (Eds), *Proceedings of the 11th European Association of Avian Veterinarians Conference and 1st Scientific European Collage of Zoological Medicine Meeting, Madrid, 26th – 30th April 2011*, pp.550-564.

Perreault, H.A.N., Semsar, K., Godwin, J. (2003) Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. *Physiology & Behavior*. v. 79, p. 719-724.

Philippart, J. C.; Ruwet, J. C. (1982) Ecology and distribution of tilapias. In: Pullin, R. S. V.; Lowe-Mcconnell, R. H. (Ed.). *The biology and culture of tilapias. ICLARM Conference, 7., 1982. Manila. Proceedings Manila: [S.n.], p. 15-60.*

Pickering, A.D. Stress responses and disease resistance in farmed fish. In: *Aqua Nor, 87, conference 3: Fish Disease – a threat to international fish farming industry. Trondheim : Norske Fiskeoppdretteres Forening, 1987. p. 35-49.*

Pickering, A.D., Pottinger , T.G. (1989). Stress response and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 7, p. 253-258.

Portz, L. Utilização de diferentes fontes protéicas em dietas formuladas pelo conceito de proteína ideal para o “Black Bass” (*Micropterus salmoides*). 111f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2001.

Pottinger , T.G. (1998). Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in angler’s keepnets. *Journal Fish Biology*, v. 53, p. 728-742.

Pottinger TG, Carrick T. (1999) A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. *Aquaculture*, v.175, p. 351-363.

Proença, C.E.M.; Bittencourt, P.R.L. *Manual de Piscicultura Tropical*. Brasília: Ibama, 1994.196p.

Puizillout, J.J., Gaudin-Chazal, G., Daszuta, A., Seyfritz, N., Ternaux, J.P. (1979) Release of endogenous serotonin from "encephale isole" cats. II. Correlations with raphe neuronal activity and sleep and wakefulness. *Journal Physiology*, v. 75, p. 531-537.

Ranzani-Paiva, M. J. T. (1995) Células sangüíneas e contagem diferencial dos leucócitos de tainha, *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarinolagunar de Cananéia, SP (Lat. 25°00'S – Long. 47°55'W). *Boletim do Instituto da Pesca*, v. 22, p. 23-40.

Ranzani-Paiva, M. J. T., Rodrigues, E. L., Veiga, M. L., Eiras, A. C., Campos, B. E. S. (2003) Differential leukocyte counts in "dourado", *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840, from the Mogi-Guaçu River, Pirassununga, SP. *Braz. Journal Biology*, v. 63, p. 517-525.

Ranzani-Paiva, M.J., Silva-Souza. A.T. (2004) Hematologia de peixes brasileiros. In: Ranzani-Paiva, M.J.; Takemoto, R. M.; Lizama, M.A.P. (Eds.). *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Varela, p.89-120.

Rao, N.V.A.; Raza, B., Prasad, J. K., Razi, S.S.; Gottardo, L., Ahmad, M.F., Nussdorfer, G.G. (2001) Melatonin decreases glucocorticoid blood concentration in the rat and palm squirrel, acting directly on the adrenal gland. *Biomedical Research*, v.22, p.115–117.

Rizzo, P. V., Guandolini, G.C., Amoroso, L., Malheiros, R.Z., Moraes, V.M. (2008) Triptofano na alimentação de codornas japonesas nas fases de recria e postura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, p. 1017-1022.

Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (1998). *Immunology*. 5° ed. London, Mosby. 423p.

Rossi, L.; Tirapegui, J. (2004) Implicações do sistema serotoninérgico no exercício físico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 48, n. 2, p. 227-233.

Rossi, L.; Tirapegui, J. (2005) Serotonina e neuromodulação alimentar. *Revista Nutrição em Pauta*. n.72, p. 38-40.

Rotllant, J., Pavlidis, M., Kentouri, M., Abad, M.E., Tort, L. (1997) Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture*, v. 156, p. 279-290.

Rozas, G., Rey, P., Andrés, M.D., Rebolledo, E., Aldegunde, M. (1990) Distribution of 5-hydroxytryptamine and related compounds in various brain regions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 8, p. 501-506.

Russel, G.B., Harms, R.H. (1999) Tryptophan requirement of the commercial hen. *Poultry Science*, v.78, p.1283-1285.

Russo, S.B., Kema, I.P., Fokkema, M.R., Boon, J.C., Willeemse, P.H., De Vries, E.G., Den Boer, J.A., Korf, J. (2003) Tryptophan as a link between psychopathology and somatic states. *Psychosomatic Medicine*, v.4, p.65-71.

Samour, J. & Pendl, H. (2009). The value of hematology in avian clinical practice. In A.Martel, T. Bailey, J. Chitty, N. Harcourt-Brown, J.M. Hatt, & M.Jones (Eds), *Proceedings of the 10th European Association of Avian Veterinarians Conference and 8th Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting*, Antwerp, 17th – 21st March 2009, pp. 283-289.

Santiago, B.C. & Lovell, R.T. (1988) Amino Acid Requirements for Growth of Nile Tilapia. *Journal Nutrition*, p. 1539-1546.

Satake, F., Pádua, S. B. & Ishikawa, M. M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: Tavares-Dias, M. (Org.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 330-345.

Satake, F.; M. M. Ishikawa; H. Hisano; S. B. Pádua; M. Tavares-dias. (2009) Relação peso-comprimento, fator de condição e parâmetros hematológicos de Dourado *Salminus brasiliensis* cultivado em condições experimentais. Embrapa Agropecuária Oeste Dourado, MS, v. 1, p. 1- 24.

Savory, C. J., Man, J. S., Macleod, M. G. (1999) Incidence of pecking damage in growing bantams in relation to food form, group size, stocking density, dietary tryptophan concentration and dietary protein source. British Poultry Science, London, v. 40, n. 3, p. 579-584.

Schjolden, J., Pulman, K.G.T., Pottinger, T.G., Tottmar, O., Winberg, S. (2006) Serotonergic characteristics of rainbow trout divergent in stress responsiveness. Physiology & Behavior, v. 87, p.938–947.

Secombes, C.J. (1996) The Nonspecific Immune System: Celular Defensas. In: Iwama, G., Nakanishi, T. The Fish Immune System. London: Academic Press, p.63-105.

Shea, M. M., L.W. Douglass, and J. A. Mench. (1991) The interaction of dominance status and supplemental tryptophan on aggression in *Gallus domesticus* males. Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.38, p. 587–591.

Shea, M.M.; Mench, J.A.; Thomas, O.P. (1990) The effect of dietary tryptophan on aggressive behavior in developing broiler breeder males. Poultry Science, v.69, p.1664-1669.

Steffens, W. (1989) Principles of fish nutrition. Chichester: Ellis Harwood, 384p.

Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., (2004) Hematologia de Peixes Teleósteos. Ribeirão Preto: M., Tavares-Dias, 144p.

Tejpal ,C.S., PAL, A.K., Sahu, N.P., Kumar, J.A., Muthappa, N.A., Vidy, S., Rajan, M.G. (2009) Dietary supplementation of L-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerlings. *Aquaculture*, v.293, p. 272–277.

Tort, L., Balasch, J. C., Mackenzie, S. (2003) Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Imunología*, v. 22, p. 277-286.

Tort, L., Sunyer, J.O., Gómez, E., Molinero, A. (1996). Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Spaurus aurata*. *Veterinary Immunology. Immunopathology*, v. 51, p. 179-188.

Urbinati, E.C., Abreu, J.S., Camargo, A.C.S. Ladines, M.A. (2004) Loading and transport stress in juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*) at various densities. *Aquaculture*, v. 229, p. 389–400.

Van Hierden, Y. M., Korte, S. M., Ruesink, E. W., Van Reenen, C. G., Engel, B., Korte-Bouws, G. A., Koolhaas, J. M., Blokhuis, H. J. (2002) Adrenocortical reactivity and central serotonin and dopamine turnover in young chicks from a high and low feather-pecking line of laying hens. *Physiology & Behavior*, Lelystad, v. 75, n. 5, p. 653-659.

Van Hierden, Y.M., Koolhaas, J.M., Korte, S.M. (2004) Chronic increase of dietary L-tryptophan decreases gentle feather pecking behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, v.89, p.71-84.

Wedemeyer, G. A., Mcleay, D. J. (1981). Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: Pickering A.D. (Ed), *Stress and fish*. Academic Press, p. 247-275.

Weil L, Barry T, Malison J. (2001) Fast growth in rainbow trout is correlated with a rapid decrease in post-stress cortisol concentrations. *Aquaculture*, v.193, p. 373-380.

Wendelaar Bonga, S.E. (1997) The Stress Response in Fish. *Physiological Reviews*, v. 77, p. 591-625.

Wendemeyer, G.A. Physiology of fish in intensive culture systems. Chapman & Hall, New York, 1996.

Weyts, F.A.A., Cohen, N., Flink, G., Verburg –Van K Emenade, B.M.L. (1999) Interactions between the immune system and the hypo thalamo8pituitary8interrenal axis in fish. *Fish & Shellfish Immunology*. v.9, p.1820.

Wilson, R.P. Amino Acids and Proteins. IN: Halver, J.E. (Ed.) *Fish nutrition*. New York: Elsevier Science, 2002. p.143-179.

Wilson, R.P. Amino acids and proteins. In: Halver, J.H. (Ed.) *Fish nutrition*. San Diego: Academic Press. 1989. p.112-153.

Winberg, S., Øverli, Ø., Lepage, O. (2001) Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. *The Journal of Experimental Biology* 204, 3867–3876.

Wolkers, C.P.B. *Controle neuroendócrino do comportamento agressivo de juvenis de matrinhã (Brycon amazonicus)*. 2010. 115 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Centro de Aquicultura Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

Wurtman, R.J., Hefti, F., Melamed, E. (1981) Precursor control of neurotransmitter synthesis. *Pharmacological Reviews*, v. 32, p. 315-335.

Xu, F.; LI, J. C.; Ma, K. C.; Wang M. Effects of melatonin on hypothalamic gamma-aminobutyric acid, aspartic acid, glutamic acid, beta-endorphin and serotonin levels in mice. (1995) *Biological Signals*, v.4, p.225–231.

Young, S.N. – The effect of tryptophan availability on mood and behavior. In: Kochen, W. & Steinhart, H. (eds.) – *Progress in Tryptophan and Serotonin Research*. Berlin, Walter de Gruyter, 1994, p. 37-64.

Young, S.N., Leyton, M. (2002) The role of serotonin in human mood and social interaction. Insight from altered tryptophan levels. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 71, p. 857-865.

CAPÍTULO I

Desempenho e resposta hematológica de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de triptofano

Resumo: O triptofano é um aminoácido essencial exigido em pequenas quantidades na dieta, no entanto apresenta funções importantes ao organismo. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o desempenho e a resposta hematológica de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de triptofano. Foram utilizadas 240 tilápias com peso médio de $38,20 \pm 0,09$ g, distribuídas em caixas circulares de 250 litros, sendo cada unidade composta por 12 peixes. O delineamento foi inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e quatro repetições. Foram elaboradas cinco dietas com 243 g kg^{-1} de proteína digestível e $3142 \text{ kcal kg}^{-1}$ de energia digestível com níveis crescentes de triptofano (2,11; 2,65; 3,19; 3,74 e $4,21 \text{ g kg}^{-1}$). Após esse período foi avaliado o desempenho produtivo dos animais através do peso final, comprimento final, sobrevivência, ganho de peso, conversão alimentar, taxa de eficiência proteica, taxa de retenção proteica, uniformidade, índice hepatossomático e gordura visceral. Para composição corporal dos peixes foram avaliadas a umidade, extrato etéreo, proteína bruta e matéria mineral. Para composição dos aminoácidos foi avaliado a composição corporal ($\text{g } 16\text{g N}$) e a retenção de aminoácidos. Os parâmetros hematológicos avaliados foram à contagem total de eritrócitos (Eri), taxa de hemoglobina, percentual de hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, contagem total de leucócitos, contagem total de trombócitos, percentual de linfócitos, neutrófilos e monócitos, e proteínas plasmáticas totais. A uniformidade foi significativamente influenciada pelos níveis de triptofano na dieta, assim como a retenção de nitrogênio para fenilalanina, leucina, glicina e serina. Para os parâmetros hematológicos foram observadas diferenças significativas para contagem total de eritrócitos e volume corpuscular médio. Pode-se concluir que o nível $2,11 \text{ g kg}^{-1}$ de triptofano, correspondente a relação triptofano: lisina de 0,15:1, atende as exigências dietéticas para a o desempenho e saúde de juvenis de tilápia do Nilo. Contudo, a melhor uniformidade foi obtida para os peixes que receberam as dietas contendo 2,65 a $4,28 \text{ g kg}^{-1}$ de triptofano.

Palavras chave: Aquicultura, aminoácidos, higidez, hematologia, nutrição.

Performance and haematological response of juvenile Nile tilapia fed diets with increasing levels of tryptophan

Abstract: Tryptophan is an essential amino acid required in the diet in small amounts, however has important functions in the organism. The aim of this study was to determine the tryptophan requirement in the diets of Nile tilapia juveniles through productive performance, corporal composition and hematologic profile. Were used 240 tilapias with average weight of 38.20 ± 0.09 g, distributed in 250 liters circular boxes, being each unit composed by 12 fish. The design was completely randomly with five treatments and four replications. Was elaborated five diet containing 242.85 g kg^{-1} of digestible protein, 3141.00 of the digestible energy and four diets where the tryptophan was included in increasing levels: 0.05; 1.0; 1.5 e 2.0 g kg^{-1} in substitution of glutamic acid. After this period we evaluated the productive performance of the animals through the final weight, length, survival, weight gain, feed conversion, protein efficiency ratio, protein retention rate, uniformity, hepatosomatic index and visceral fat. For body composition of fish were evaluated moisture, ether extract, crude protein and ash. For the amino acid composition was evaluated body composition (g 16g N) and retention of amino acids. Hematologic parameters were evaluated for erythrocyte count, hemoglobin, percentage of hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, total leukocyte count total count of thrombocytes, percentage of lymphocytes, neutrophils and monocytes, and total plasma protein. The uniformity was significantly influenced by the level of tryptophan in the diet, like nitrogen retention to phenylalanine, leucine, glycine and serine. For hematological parameters were significant differences in erythrocyte count and mean corpuscular volume. It can be concluded that the level 2.11 g kg^{-1} of tryptophan, corresponding to tryptophan: lysine ratio of 0.15:1, meets the dietary requirements for the health and performance of Nile tilapia juvenile. However, the best uniformity was obtained for fish fed diets containing 2.65 to 4.28 g kg^{-1} of tryptophan.

Keywords: Aquaculture, amino acid, hematology, nutrition.

Introdução

O território brasileiro apresenta recursos hídricos abundantes e uma rica diversidade de espécies de peixes, com excelente potencial para o desenvolvimento da aquicultura. Os peixes teleósteos são representados por uma enorme variedade de espécies e é crescente o interesse da pesquisa com aquelas que apresentam alto potencial para a piscicultura, como as tilápias, que

continuam sendo o segundo grupo de peixes mais cultivado no mundo, ficando somente atrás das carpas (FAO 2012). No Brasil, a tilápia é a espécie mais cultivada, com produção de 155.450,8 toneladas em 2010 (MPA 2012). Isso porque, além de apresentar características zootécnicas interessantes como rusticidade, crescimento rápido e facilidade de adaptação (Beyruth *et al.* 2004), tem carne de ótima qualidade, branca e com textura firme, com boa aceitação no mercado consumidor (Souza 2002).

Na piscicultura intensiva a alimentação é responsável pela maior parte dos custos sendo a proteína o nutriente mais oneroso e usado em maior quantidade na dieta de peixes, ela é essencial ao metabolismo animal, pois dela são extraídos os aminoácidos para formação das proteínas musculares e manutenção do organismo (Piedras *et al.* 2006). Os peixes, como outros animais, não apresentam exigência verdadeira de proteína, mas sim de uma mistura equilibrada de aminoácidos essenciais e não essenciais que devem estar presentes em proporções adequadas e que podem ser obtidas pela combinação de ingredientes ou pela suplementação com aminoácidos industriais. Deficiências ou excessos de aminoácidos acarretam problemas para o organismo do animal e para o ambiente aquático (Wilson 2002).

As pesquisas científicas vêm agregando conhecimento em diferentes áreas com o intuito de auxiliar o entendimento sobre nutrição e saúde. A área de hematologia tem contribuído no entendimento da nutrição com a finalidade de promover novas estratégias para minimizar os efeitos do estresse e aumentar a resistência imune dos peixes, permitindo que os mesmos mantenham a homeostase, necessário nas diferentes e inevitáveis situações adversas em que são expostos nos atuais sistemas intensivos de produção.

Nesse sentido muitos estudos vêm sendo realizados avaliando o efeito do triptofano, sobre a redução de estresse e conseqüentemente a manutenção da homeostase nos peixes. O triptofano é um aminoácido essencial exigido em pequenas quantidades quando comparados aos valores de metionina, lisina, treonina e arginina (NRC 2011), entretanto, possui funções importantes ao organismo animal atuando como precursor da serotonina, um neurotransmissor importante no funcionamento do organismo, e praticamente nenhuma função fisiológica e comportamental está livre do seu efeito direto ou indireto (Alee *et al.* 2008). Diante disso, muitos autores tem utilizado a suplementação de triptofano nas dietas para controlar a agressividade (Winberg *et al.* 2001; Lepage *et al.* 2005; Hoglund *et al.* 2005), a diminuição do canibalismo e obtenção de lotes mais homogêneos (Hseu *et al.* 2003), reação ao estresse (Schjolden *et al.* 2006) e conseqüentemente, promover ótimo desempenho zootécnico aos animais.

Devido ao crescimento na aquicultura, pesquisas sobre as exigências das espécies de peixes cultivadas tem grande importância na busca por avanços tecnológicos que sirvam de base

para o crescimento e fortalecimento da aquicultura, uma vez que mudanças nesse setor de produção podem agregar melhorias no desempenho e saúde dos peixes. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o desempenho e a resposta hematológica de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de triptofano.

Material e métodos

Procedimentos experimentais

Foram elaboradas cinco dietas com 243 g kg⁻¹ de proteína digestível e 3142 de kcal kg⁻¹ de energia digestível com níveis crescentes de triptofano (2,11; 2,65; 3,19; 3,74 e 4,21 g kg⁻¹) conforme Tabela 2. Os ingredientes selecionados foram moídos individualmente em moedor tipo martelo com peneira de malha 0,5 mm. Posteriormente as rações foram extrusadas para terem diâmetros de aproximadamente 3,0 mm. O arraçoamento foi realizado quatro vezes ao dia (8h, 11h, 14h e 17h00) até a saciedade aparente dos peixes. A composição dos aminoácidos essenciais e não essenciais encontram-se na Tabela 3. As análises foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC: *High-Performance Liquid Chromatography*) no Laboratório da Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda. – *Animal Nutrition*, São Paulo, Brasil.

Tabela 2 Composição das dietas com níveis crescentes de triptofano (g kg^{-1}).

Ingredientes	Dietas				
	2,11	2,65	3,19	3,74	4,28
Milho, grão	507,50	507,50	507,50	507,50	507,50
Soja, farelo 45%	260,0	260,0	260,0	260,0	260,0
Vísceras, farinha de aves	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Trigo, farelo	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Milho, gluten 60%	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Fosfato bicálcico	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Óleo de soja	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Suplem. min. vitamínico ¹	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
L- ácido glutâmico	28,0	27,50	27,00	26,50	26,00
L-alanina	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
L- lisina	6,20	6,20	6,20	6,20	6,20
L- treonina	4,60	4,60	4,60	4,60	4,60
DL – metionina	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
L-triptofano	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
Sal comum	3,10	3,10	3,10	3,10	3,10
Antifúngico	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Vitamina C	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
Cloreto de colina	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62
Antioxidante	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

¹Níveis de garantia por kg do produto - Premix (DSM-Roche®): Vit. A, 24.000 UI; Vit. D3, 6.000 UI; Vit. E, 300 mg; Vit. K3, 30 mg; Vit. B1, 40 mg; Vit. B2, 40 mg; Vit. B6, 35 mg; Vit. B12, 80 mg; Ác. fólico, 12 mg; Pantotenato Ca, 100 mg; Vit. C, 600 mg; Biotina, 2 mg; Colina, 1.000 mg; Niacina, 8730 mg; Ferro, 200 mg; Cobre, 35 mg; Manganês, 100 mg; Zinco, 240 mg; Iodo, 1,6 mg; Cobalto, 0,8 mg.

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

	Dietas				
	2,11	2,65	3,19	3,74	4,28
Matéria seca ²	921,4	927,6	929,1	939,3	915,0
Energia digestível (kcal kg ⁻¹) ³	3141,98	3141,98	3141,98	3141,98	3141,98
Proteína digestível ³	242,85	242,85	242,85	242,85	242,85
Gordura ³	36,57	36,57	36,57	36,57	36,57
Fibra bruta	32,34	32,34	32,34	32,34	32,34
Cálcio	83,57	83,57	83,57	83,57	83,57
Fósforo disponível ³	62,95	62,95	62,95	62,95	62,95
Aminoácido essencial²					
Arginina	10,6	9,82	9,61	10,39	10,74
Histidina	4,68	4,31	4,17	4,35	4,56
Fenilalanina	9,53	8,78	8,34	8,95	9,50
Isoleucina	6,63	6,11	6,00	6,69	7,41
Leucina	18,31	16,87	16,00	17,26	18,42
Lisina	13,75	12,67	9,95	11,05	10,04
Metionina + cistina	9,31	8,58	7,96	8,34	9,50
Treonina	12,69	11,69	13,49	13,89	14,33
Triptofano	2,11	2,65	3,19	3,74	4,28
Valina	7,97	7,34	7,26	7,96	8,59
Aminoácido não essencial²					
Alanina	35,48	32,96	30,00	31,35	34,09
Ácido aspártico	15,68	14,45	13,86	14,78	16,48
Ácido glutâmico	67,08	61,81	57,14	59,81	63,79
Cistina	2,22	2,05	1,86	2,07	2,94
Glicina	9,59	8,84	7,99	8,80	8,73
Tirosina	6,52	6,01	6,13	6,57	7,11
Serina	9,93	9,15	8,37	9,02	9,70

¹Valores médios de análises realizadas em duplicata

²Valores determinados no Laboratório da Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos, Ltda., São Paulo, Brasil

³Com base em valores descritos por Furuya et al. (2010) e Rostagno et al. (2011).

O experimento foi conduzido no período de fevereiro a março de 2012 no Laboratório de Aquicultura do Grupo de Estudos em Manejo na Aquicultura – GEMaQ, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Uniãoeste, *Campus* Toledo, Paraná por um período de 45 dias. Foram utilizadas 240 tilápias com peso médio de $38,20 \pm 0,09$ g, distribuídas em caixas circulares de 250 litros, sendo cada unidade composta por 12 peixes. A aeração do sistema foi mantida por meio de soprador ($5,97 \pm 0,28$ mg L⁻¹) e a temperatura controlada com a utilização de termostato digital ($28,22 \pm 0,88$ °C). Os parâmetros físicos e químicos, como: oxigênio dissolvido (mg L⁻¹), condutividade elétrica (μ S cm⁻¹) e pH foram monitorados semanalmente com o aparelho YSI Professional Plus Multiparameter Water Quality Meter. Ao final do experimento, os peixes foram mantidos em jejum por 24h, para esvaziamento do trato gastrointestinal; posteriormente, para

coleta de sangue, foram anestesiados com benzocaína (100 mg L⁻¹ de água) em seguida foram submetidos à eutanásia com benzocaína (250 mg L⁻¹), para realização dos parâmetros zootécnicos e centesimais seguindo protocolo de (Gomes *et al.* 2001).

Para o desempenho produtivo, foram avaliados os parâmetros de ganho de peso (g) [(peso final) – (peso inicial)]; conversão alimentar [(consumo de ração)/(ganho de peso)]; sobrevivência (%) [(número de animais final ÷ número de animais inicial) × 100]; índice hepatossomático [(peso do fígado/peso final) × 100]; taxa de eficiência proteica [ganho de peso/(consumo de ração × % da proteína da dieta) × 100]; uniformidade = [(quantidade de peixes com peso corporal dentro da média ± desvio padrão/número total de peixes) × 100]; e Retenção de aminoácidos: $100 \times [(peso\ final \times\ conteúdo\ de\ aminoácido) - (peso\ inicial \times\ conteúdo\ de\ aminoácido)] / aminoácido\ consumido$.

Análises laboratoriais

No sangue total foram realizadas as análises de contagem total de eritrócitos com utilização de câmara de Neubauer, taxa de hemoglobina realizada por meio da metodologia descrita por Collier (1944), percentual de hematócrito seguindo a metodologia de Goldenfarb *et al.* (1971), e os índices hematimétricos como (volume corpuscular médio), (hemoglobina corpuscular média) e (hemoglobina corpuscular média), de acordo com Wintrobe (1934): Volume corpuscular médio (fL) = [(hematócrito × 10)]/eritrócitos; hemoglobina corpuscular média (pg) = [(hemoglobina × 10)]/eritrócitos e concentração de hemoglobina corpuscular média (gdL⁻¹) = [(hemoglobina × 100)]/ hematócrito.

Foram feitas extensões sanguíneas em lâminas de vidro com extremidades foscas, secas ao ar e coradas pelo método de (Rosenfeld 1947). A leitura foi realizada em microscópio óptico com aumento de 100x, utilizando óleo de imersão. A contagem total de leucócitos e trombócitos foram realizadas pelo método indireto (Martins *et al.* 2004): Leucócitos totais (μL) = [(número de leucócitos contados na extensão × número de eritrócitos em câmara de Neubauer)/2000]; e Trombócitos totais (μL) = [(número de trombócitos contados na extensão × número de eritrócitos em câmara de Neubauer)/ 2000].

A contagem do diferencial de leucócitos consistiu em determinar a proporção existente entre as distintas variedades de leucócitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. Em microscópio de luz comum, com objetiva de imersão 100 vezes foram contados 100 leucócitos. A contagem foi feita no corpo da extensão, percorrendo-se todo o material,

movimentando-se a lâmina em “zig-zag”. O número de cada elemento foi expresso em porcentagem.

O plasma foi obtido pela centrifugação do sangue total, a 3000 RPM por 10 minutos. No plasma foram determinados os níveis de proteínas plasmáticas totais pela metodologia enzimática - colorimétrica (kit Analisa[®]).

As análises centesimais de matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Alimento do Grupo de Estudos e Manejo na Aquicultura – Gemaq/Unioeste, Toledo, Paraná. As análises foram realizadas de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (2000).

Análises estatísticas

Foi utilizado um modelo inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As diferenças entre as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), utilizando o pacote estatístico SPSS (10.0) para Windows. Os dados discrepantes foram identificados ($P < 0,05$) pelo teste de Dixon (Sachs 1968) e eliminado para cálculos posteriores. Os dados também foram analisados por meio de regressão *broken-line* ($Y = a + bX$) de acordo com Zeiton *et al.* (1967).

Resultados

Durante o período experimental a temperatura da água, o pH, condutividade elétrica, e o oxigênio dissolvido apresentaram valores médios de $28,22 \pm 0,88$ °C; $7,84 \pm 0,02$; $102,89 \pm 0,12$ $\mu\text{S cm}^{-1}$; $5,97 \pm 0,28$ mg L^{-1} respectivamente. Estes valores estão dentro dos limites recomendados por Boyd (1990), para peixes de águas tropicais. O ganho de peso, conversão alimentar, taxa de eficiência protéica, gordura visceral, índice hepatossomático, uniformidade e sobrevivência estão apresentados na Tabela 4. Foi observada diferença significativa para a uniformidade pelo teste de Tukey, sendo que as dietas suplementadas com triptofano apresentaram uma maior uniformidade entre os lotes em relação à dieta controle. Porém, não foram observadas diferenças significativas para os outros parâmetros analisados.

Tabela 4 Desempenho de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de triptofano*.

	Dietas				
	2,11	2,65	3,19	3,74	4,28
Ganho de peso (g)	76,99±6,72	72,26±2,17	82,72±7,72	71,55±9,35	83,29±7,05
CA	1,07±0,07	1,06±0,21	0,88±0,14	1,08±0,10	0,89±0,19
TEP	2,54±0,18	2,53±0,08	3,23±0,48	2,78±0,71	3,16±0,65
Sobrevivência (%)	97,92±4,16	100,00	92,67±8,33	93,75±7,97	93,75±7,97
Gordura visceral (%)	3,26±0,41	2,80±0,57	4,37±1,26	2,64±0,59	4,31±0,93
IHS	1,79±0,19	1,70±0,48	2,28±0,18	1,28±0,21	1,92±0,55
Uniformidade (%)	62,50±8,34b	66,67±0,00a	70,55±4,19a	64,25±3,17a	66,67±2,60a

CA=Conversão alimentar; TEP=taxa de eficiência proteica; IHS= índice hepatossomático.

*Valores são médias ± desvio padrão de quatro repetições. Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($P > 0.05$).

Os valores médios de composição corporal como: umidade, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral dos peixes alimentados com dietas contendo níveis crescentes de triptofano estão representados na Tabela 5. O aumento nos níveis de triptofano não interferiu significativamente ($P > 0,05$) sobre a composição corporal dos peixes. Pode-se observar que todos os valores estão próximos entre os tratamentos.

Tabela 5 Composição corporal (g.100-1 g) dos peixes alimentados com dietas contendo níveis crescentes de triptofano*.

	Dietas				
	2,11	2,65	3,19	3,74	4,28
Umidade	70,71±1,53	69,60±0,96	69,54±1,83	69,29±0,90	69,16±1,34
Proteína bruta	13,97±0,83	15,05±1,07	14,38±1,61	14,64±0,66	14,62±1,69
Extrato-etéreo	10,95±0,52	11,43±1,07	11,85±0,69	11,18±0,35	11,35±0,18
Matéria mineral	4,04±0,11	4,63±0,51	4,84±0,71	4,33±0,17	4,69±0,21

*Os valores são médias ± desvio padrão de duas repetições.

Os efeitos dos diferentes níveis de triptofano sobre a composição corporal de aminoácidos dos peixes estão apresentados na Tabela 6, não foram observadas diferenças significativas $P > 0,05$ sobre a composição.

Tabela 6 Composição proximal corporal de aminoácidos essenciais e não essenciais (g/ 16g N) de juvenis de tilápias alimentadas com dietas com níveis crescentes de triptofano.

	Dietas				
	2,11	2,65	3,19	3,74	4,28
Aminoácido essencial					
Arginina	5,18±0,92	5,12±0,39	5,70±0,39	5,17±0,31	5,31±0,50
Histidina	1,78±0,23	1,68±0,17	1,77±0,10	1,65±0,09	1,73±0,16
Fenilalanina	3,30±0,43	3,27±0,27	3,34±0,16	3,12±0,16	3,23±0,28
Isoleucina	3,19±0,38	3,11±0,20	3,24±0,18	3,01±0,23	3,07±0,16
Leucina	5,79±0,73	5,71±0,40	5,89±0,31	5,52±0,38	5,71±0,41
Lisina	5,49±0,94	5,28±0,58	5,90±0,46	5,06±0,37	5,55±0,86
Metionina	1,56±0,35	2,00±0,09	2,02±0,08	1,84±0,12	1,99±0,16
Metionina+cistina	2,49±0,45	2,44±0,10	2,55±0,09	2,34±0,15	2,53±0,20
Treonina	3,60±0,50	3,54±0,24	3,78±0,21	3,43±0,20	3,58±0,33
Triptofano	0,71±0,06	0,64±0,50	0,89±0,06	0,77±0,07	0,82±0,08
Valina	3,69±0,43	3,63±0,26	3,89±0,23	3,58±0,22	3,63±0,24
Aminoácido não essencial					
Alanina	6,15±0,96	6,05±0,35	6,30±0,44	5,81±0,44	6,13±0,57
Ácido aspártico	7,33±1,02	7,25±0,42	7,96±0,43	6,93±0,39	7,33±0,60
Ácido glutâmico	11,87±1,60	11,65±0,75	12,09±0,63	11,09±0,85	11,65±0,97
Cistina	0,53±0,11	0,44±0,08	0,53±0,09	0,50±0,06	0,55±0,05
Glicina	8,34±1,51	8,55±0,56	9,21±0,65	8,34±0,73	8,86±1,17
Tirosina	2,51±0,33	2,43±0,24	2,53±0,18	2,30±0,13	2,39±0,22
Serina	3,41±0,54	3,39±0,20	3,58±0,24	3,24±0,18	3,49±0,34

*Os valores são médias ± desvio padrão de duas repetições.

Para retenção de aminoácidos, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) para fenilalanina, leucina, glicina e serina, pelo teste de Tukey (Tabela 7). Para a fenilalanina e serina os peixes que receberam a dieta com 4,28 g kg⁻¹ de triptofano da matéria seca obtiveram maior retenção de aminoácidos em relação aos peixes que receberam a dieta com 2,11 g kg⁻¹ de triptofano da matéria seca. Contudo, não foi observado diferenças das tilápias alimentadas com as dietas contendo 2,65, 3,19 e 3,74 g kg⁻¹ de triptofano da matéria seca. Para retenção de leucina, os peixes que consumiram a dieta contendo 4,28 g kg⁻¹ de triptofano da matéria seca, obtiveram maior retenção de aminoácidos do que os peixes alimentados com as dietas contendo 2,11, 3,19 e 3,74 g kg⁻¹ de triptofano da matéria seca. Porém não diferiu dos peixes alimentados com a dieta contendo 2,65 g kg⁻¹ de triptofano da matéria seca. Para retenção de glicina as tilápias que foram alimentadas com as dietas contendo 4,28 e 3,19 g kg⁻¹ de triptofano da matéria seca obtiveram maior retenção de glicina do que os peixes alimentados com as dietas contendo 2,11 e 3,74 g kg⁻¹ de triptofano da matéria seca, porém, não foi observada diferença dos peixes alimentados com as dietas contendo 2,65 g kg⁻¹ de triptofano da matéria seca.

Tabela 7 Retenção corporal de aminoácidos essenciais e não essenciais de juvenis de tilápias alimentadas com dietas com níveis crescentes de triptofano*.

	Dietas				
	2,11	2,65	3,19	3,74	4,28
Aminoácido essencial					
Arginina	35,39±5,06	41,91±1,23	56,18±11,03	61,57±16,79	45,94±10,18
Histidina	32,35±2,47	19,73±10,43	44,59±8,52	26,28±9,93	45,91±14,61
Fenilalanina	27,94±1,73a	31,33±1,63ab	43,34±8,04ab	38,08±6,48ab	44,34±10,71b
Isoleucina	35,63±1,64	37,43±7,16	66,16±4,97	33,91±9,35	42,06±15,15
Leucina	25,83±1,30a	44,73±13,79ab	39,86±7,22a	25,78±6,97a	65,65±15,82b
Lisina	41,60±6,23	41,75±9,68	63,77±10,69	35,58±14,22	54,25±5,25
Metionina	23,46±3,54	81,16±5,76	42,90±16,53	35,76±22,33	32,23±6,73
Metionina + cistina	22,23±3,34	22,77±0,91	33,87±11,78	21,37±6,95	28,29±5,96
Treonina	22,25±1,98	24,21±1,68	39,45±7,72	20,84±6,25	40,87±19,48
Triptofano	26,61±4,88	44,12±5,44	45,83±7,13	20,64±8,54	21,99±3,16
Valina	34,82±1,92	42,88±3,11	58,91±10,49	36,02±10,42	43,95±10,10
Aminoácido não essencial					
Alanina	14,89±1,63	15,59±0,48	22,97±3,84	30,16±17,06	18,70±3,24
Ácido aspártico	37,59±3,04	42,08±1,05	59,28±10,42	61,57±8,57	45,94±8,96
Ácido glutâmico	18,72±1,49	15,99±1,15	23,14±4,23	15,05±4,04	19,22±3,56
Cistina	18,39±5,14	14,09±5,67	28,17±9,19	17,54±7,78	18,16±3,54
Glicina	71,46±11,23a	83,69±5,98abc	129,79±20,60c	78,63±19,49ab	129,44±37,08c
Tirosina	32,11±3,08	42,04±11,40	45,32±7,36	36,95±13,38	44,39±12,44
Serina	29,22±3,39a	32,01±1,34ab	47,83±7,76ab	52,86±24,62ab	59,81±11,28b

* Valores são médias ± desvio padrão de quatro repetições. Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os dados da contagem total de eritrócitos, percentual de hematócrito, taxa de hemoglobina, volume corpuscular média, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média estão apresentados na Tabela 7. Foram observadas diferenças significativas para contagem total de eritrócitos e para o volume corpuscular médio.

Tabela 8 Valores médios de contagem total de eritrócitos (Erit), hematócrito (Hct), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

	Dietas				
	2,11	2,65	3,19	3,74	4,28
Erit $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$	1,94 \pm 0,15b	2,04 \pm 0,16ab	1,92 \pm 0,18b	2,26 \pm 0,34a	1,99 \pm 0,20b
Hct %	38,83 \pm 3,56	37,35 \pm 4,13	37,89 \pm 2,61	35,67 \pm 2,60	35,75 \pm 3,54
Hb g dL ⁻¹	9,11 \pm 1,38	8,84 \pm 1,36	8,62 \pm 1,05	8,81 \pm 1,09	9,15 \pm 1,26
VCM μL^{-1}	200,80 \pm 22,55a	185,46 \pm 21,88ab	199,24 \pm 25,76a	161,87 \pm 29,15b	181,43 \pm 22,59ab
HCM %	47,38 \pm 8,21	43,48 \pm 7,42	45,27 \pm 7,85	40,16 \pm 9,21	46,21 \pm 6,94
CHCM g dL ⁻¹	23,61 \pm 3,21	23,76 \pm 5,06	22,72 \pm 2,14	24,76 \pm 2,83	25,63 \pm 3,55

*Os valores são médias \pm desvio padrão de duas repetições.

Os valores médios de trombócitos totais, percentual de linfócitos, percentual de neutrófilos, percentual de monócitos e proteínas plasmáticas totais de peixes alimentados com dietas contendo níveis crescentes de triptofano, não sofreram diferenças significativas $P > 0,05$ e estão representados na Tabela 9. Com exceção da contagem total de leucócitos $P < 0,05$.

Tabela 9 Valores médios de leucócitos totais (Leuc tot), trombócitos totais (tromb tot), porcentagem de linfócitos (Linf), porcentagem de neutrófilos (Neutr), porcentagem de monócitos (Mono) e proteínas plasmáticas totais (PPT).

	Dietas				
	2,11	2,65	3,19	3,74	4,28
Leuc μL^{-1}	20297 \pm 4143a	21285 \pm 5599a	37620 \pm 18155b	24102 \pm 11208ab	24180 \pm 8915ab
Tromb μL^{-1}	37393 \pm 24057	28996 \pm 12706	49986 \pm 18420	41814 \pm 14673	48943 \pm 22608
Linf %	79,75 \pm 11,60	8,84 \pm 1,36	8,62 \pm 1,05	8,81 \pm 1,09	9,15 \pm 1,26
Neutr %	12,12 \pm 10,76	18,37 \pm 5,31	11,67 \pm 7,36	9,87 \pm 3,72	16,37 \pm 8,33
Mono %	7,62 \pm 5,75	12,87 \pm 3,75	10,17 \pm 7,70	9,25 \pm 6,01	6,87 \pm 2,79
PPT g dL ⁻¹	2,96 \pm 0,39	3,07 \pm 0,49	3,30 \pm 0,54	3,20 \pm 0,47	2,98 \pm 0,39

*Os valores são médias \pm desvio padrão de duas repetições.

Discussão

A maioria dos estudos realizados é voltada à avaliação do efeito do triptofano sobre a redução do estresse dos indivíduos, devido ao fato desse aminoácido ser um precursor da serotonina, um neurotransmissor indoleamina que está ligado a vários padrões comportamentais. Nesse sentido, Hseu *et al.* (2003) em trabalhos com *Epinephelus coioides*, afirmam que dietas contendo 11 g kg⁻¹ de triptofano da proteína proporcionam uma maior homogeneidade dos animais, diminuindo o canibalismo. Tejpal *et al.* (2009), em estudo avaliando a suplementação de triptofano sobre o estresse da alta densidade em alevinos de *Cirrhinus mrigala*, observaram que a

suplementação dietética em um nível mínimo de $7,7 \text{ g kg}^{-1}$ de triptofano da proteína reduz o estresse nesta espécie. Höglund *et al.* (2005) em dois estudos com juvenis de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), demonstraram que em um estudo comportamental os peixes alimentados com dietas contendo 28 g kg^{-1} de triptofano por três dias apresentaram uma diminuição significativa nos atos agressivos, o número médio de agressões também foi significativamente menor em relação ao grupo controle que não receberam dietas suplementadas com triptofano. No segundo estudo, esses mesmos autores avaliaram o efeito da suplementação do triptofano 28 g kg^{-1} sobre a atividade da serotonina (5 HT) cerebral e observaram que os peixes alimentados com triptofano apresentaram valores mais elevados de serotonina em relação ao grupo controle. Em conclusão estes estudos demonstraram que os juvenis de bacalhau do Atlântico são altamente agressivos e que a suplementação de triptofano na alimentação afeta os sistemas centrais da serotonina (5 HT) e reduz o comportamento agressivo.

Analisando os resultados do desempenho produtivo, dos peixes do presente trabalho, pode-se observar que para o ganho de peso, conversão alimentar, taxa de eficiência proteica, índice hepatossomático, gordura visceral e sobrevivência não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$), porém os níveis de suplementação de triptofano em relação à dieta basal proporcionaram uma maior uniformidade ($P < 0,05$) entre os peixes. O triptofano é um precursor da serotonina, um importante neuromediador associado ao humor, inibição a agressão, à resposta ao estresse e a regulação do apetite (Rossi & Tirapegui 2004). Ainda que não tenha sido observado efeito do triptofano sobre desempenho produtivo e sobrevivência, indicando que a dieta não suplementada com triptofano atendeu as exigências para o crescimento, conversão alimentar e sobrevivência, contudo este nível não foi o suficiente para uma adequada uniformidade do lote, que foi obtida no presente trabalho com os peixes que receberam as dietas contendo $2,65$ a $4,28 \text{ g kg}^{-1}$ de triptofano. A uniformidade no lote é um fator importante na criação de peixes, pois facilita a alimentação, captura, comercialização e processamento do pescado (Saoud *et al.* 2008).

Para o catfish africano (*Clarias gariepinus*) Fagbenro & Nwanna (1999) determinaram (11 g kg^{-1}) de triptofano da proteína para um melhor desempenho. Trabalhando com juvenis *Lates calcarifer* Coloso *et al.* (2004) demonstraram que os níveis de triptofano não afetaram a sobrevivência e determinaram $4,1 \text{ g kg}^{-1}$ de triptofano da proteína para melhor resposta para o crescimento e eficiência alimentar.

Gaylord *et al.* (2005) testaram níveis de (10 a 14 g kg^{-1}) de triptofano na dieta de *striped bass* híbridos (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) estimando níveis de (6 a 7 g Kg^{-1}) de triptofano da proteína como ideais para melhorar o ganho de peso e sobrevivência. Em estudos com alevinos de *Labeo rohita* Abidi & Khan (2010) determinaram níveis de $9,0$ a $9,5 \text{ g kg}^{-1}$ de triptofano da

proteína para melhor crescimento e utilização eficiente dos alimentos. Por outro lado, Saaavedra *et al.* (2009), observaram que a suplementação de triptofano para larvas de *Diplodus sargus*, reduziu o ganho de peso e não preveniu o aparecimento de deformidades ósseas. Em salmonídeos foi observada escoliose em dietas com deficiência de triptofano (Akima *et al.* 1986). De acordo com Gaylord *et al.* (2005), a utilização da proteína é drasticamente comprometida se o triptofano não estiver suficientemente disponível em conjunto com outros aminoácidos essenciais na dieta para manter as funções fisiológicas normais.

A exigência de triptofano descrita pelo NRC (2011) para tilápia do Nilo foi baseado no experimento realizado por Santiago & Lovell (1988), que forneceram rações purificadas e relataram que 10 g kg⁻¹ de triptofano da proteína foi suficiente para o máximo ganho de peso dos peixes. No presente experimento, com o uso de rações práticas, a tilápia do Nilo apresentou um desempenho satisfatório com nível ligeiramente inferior, 8,8 g kg⁻¹ de triptofano da proteína. De acordo com (Griffin *et al.* 1992), as rações purificadas tem reconhecidamente menor aceitabilidade pelos peixes, por serem menos palatáveis que as rações práticas, o que ocasiona menores ganhos de peso e eficiência alimentar, fato que pode ter influenciado a exigência do aminoácido avaliado.

No presente estudo os níveis de triptofano suplementados nas dietas não provocaram alterações sobre os parâmetros de umidade, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral nos peixes. Assim como não influenciaram a composição corporal dos aminoácidos (g/16 g N). Contudo, foram observadas diferenças para retenção de aminoácidos para fenilalanina, leucina, glicina e serina.

Os resultados da contagem total de eritrócitos encontradas neste estudo estão dentro da faixa considerada normal para a espécie, estes valores são próximos aos obtidos por Araújo *et al.* (2011), que trabalharam com dietas contendo óleos vegetais para tilápia do Nilo, onde obtiveram médias de 1,95 a 2,27 × 10³ µL⁻¹ de sangue, e ainda por (Jerônimo *et al.* 2011) avaliando a influência sazonal sobre os parâmetros hematológicos de tilápia do Nilo, relataram 1,30 a 2,54 × 10³ µL⁻¹ de eritrócitos no sangue. Quanto à taxa de hemoglobina, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, estando os resultados descritos neste estudo próximos aos obtidos por Hubrec *et al.* (2000), que apresentaram médias de 7,0 a 9,8 g dL⁻¹ ao avaliarem intervalos de referencia para tilápias e por Tavares–Dias & Faustino (1998) que observaram resultados de 5,4 a 12,7 g dL⁻¹. De acordo com Feldman (2000) a concentração de hemoglobina em peixes é mais baixa quando comparada com mamíferos, apresentando uma variação 5 a 10 g dL⁻¹.

No presente trabalho, todos os valores encontrados entre os tratamentos são considerados normais para as espécies em estado de higidez (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Comparando o percentual de hematócrito da presente pesquisa com os verificados na literatura com a mesma espécie, constata-se que são concordantes com os valores encontrados por Feldman (2000) que avaliou as amplitudes de variação dos parâmetros sanguíneos de tilápia do Nilo e relatou médias de 27% a 47%, sendo estes valores considerados normais para a espécie. Possivelmente, os resultados de normalidade das variáveis hematológicas dos peixes utilizados no presente trabalho ocorreram pelo fato do triptofano não atuar diretamente na produção de células sanguíneas, indicando que todas as rações encontravam-se adequadamente balanceadas em aminoácidos para o atendimento das exigências da espécie considerando-se o estágio de desenvolvimento.

Valores de 9760 e 154700 de leucócitos μL^{-1} de sangue são considerados normais para a espécie (Allen 1993; Allen 1994; Feldman *et al.* 2000). Foram observadas diferenças significativas na contagem total de leucócitos, porém esses valores estão dentro dos limites considerados normais para a tilápia, sendo que as diferenças significativas foram ocasionadas por variações fisiológicas normais nos peixes ou por fatores ainda não estudados e não pela suplementação de triptofano nas rações. Os peixes também não apresentaram quadro de leucocitose, que é o aumento na contagem total de leucócitos excedente ao limite superior tolerada pela espécie, ou leucopenia, que é a diminuição da produção de células brancas. Geralmente é observado quadro de leucopenia acompanhada de linfocitopenia e leucocitose quando ocorre efeito de estresse em peixes (Pickford *et al.* 1971), como relatado por Barton & Iwana (1991), Falcon *et al.* (2008) e Signor (2007). Assim, pode-se inferir que os peixes permaneceram em condições experimentais e manejo apropriado e que todas as dietas forneceram níveis de triptofano que atenderam as exigências em termos de desempenho e saúde da espécie.

Os tipos celulares de leucócitos circulantes mais abundantes encontrados neste trabalho foram os linfócitos, sendo essas células as mais numerosas na circulação sanguínea em diversas espécies de teleósteos (Ranzini-Paiva & Silva-Souza 2004), incluindo a tilápia. Estes resultados corroboram com os encontrados por Ugwem *et al.* (2011), avaliando respostas hematológicas de tilápias depois da aclimação em cativeiro. E ainda por Falcon *et al.* (2008) avaliando o leucograma de tilápias arraçadas com dietas suplementadas com níveis de vitamina c e lipídios, antes de serem submetidas ao estresse por baixa temperatura. A imunidade inata, que corresponde a primeira linha de defesa, é composta por neutrófilos e macrófagos (Tizard 2002). Quando ocorre invasão por patógenos nos organismo dos animais, as células que aparecem em maior porcentagem são os neutrófilos, pois estes atuam no combate das infecções, portanto a caracterização e a identificação deste parâmetro são importantes na avaliação das alterações do

estado fisiológico dos peixes (Ranzani-Paiva *et al.* 2004). Deste modo, pode-se inferir novamente, que os peixes permaneceram sadios e que a adição de triptofano na dieta, não causou alterações no diferencial de leucócitos, ainda, o percentual de linfócitos mais elevado entre todos os tratamentos, refletiu um estado de higidez entre os animais.

Para a contagem total de trombócitos, o número médio de trombócitos em teleósteos de água doce pode variar de 2.000 a 68.400 μL^{-1} de sangue (Tavares-Dias & Moraes 2004). Resultados semelhantes ao deste trabalho foram reportados por esses mesmos autores, cujos valores encontrados foram 21366,10 a 48902,50 μL^{-1} de trombócitos. Hubrec *et al.* (2000) relataram valores de 25100 a 85200 μL^{-1} de trombócitos para tilápias.

A proteína plasmática total é um parâmetro sanguíneo que reflete o estado nutricional, balanço hormonal, hídrico e higidez do animal (Feldman 2000). As proteínas plasmáticas são compostas por albuminas, globulinas e fibrinogênio, as quais por meio de diminuição de sua concentração podem indicar alteração hepática ou que a ração não é balanceada. Portanto, ela pode ser utilizada para avaliar a condição de saúde dos peixes. A concentração de proteínas plasmáticas totais neste estudo variou de 2,96 a 3,30 g dL^{-1} , esses valores são considerados normais para tilápias saudáveis, de acordo com Chen *et al.* (2003) e Mauel *et al.* (2007) as médias de proteínas plasmáticas totais, variam de 3,0 a 7,7 g dL^{-1} . Portanto, no presente trabalho, pode-se sugerir que as dietas com diferentes níveis de triptofano não causaram alterações sobre a resposta hematológica e bioquímica dos peixes.

No presente trabalho, observou-se que o nível 2,11 g kg^{-1} de triptofano da dieta, correspondente a relação triptofano: lisina de 0,15:1, atende as exigências dietéticas para o desempenho e saúde de juvenis de tilápia do Nilo. Contudo, a melhor uniformidade foi obtida para os peixes que receberam as dietas contendo 2,65 a 4,28 g kg^{-1} de triptofano.

Referências

Abidi, S.F., Khan, M. (2010) Dietary Tryptophan Requirement of Fingerling Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), Based on Growth and Body Composition. *J. World. Aquacult. Soc.*, v. 41, p. 700-709.

Alee, S.J., Markham, M.R., Salazar, V.L. & Stoddard, P.K. (2008) Opposing actions of 5-HT1A and 5-HT2-like serotonin receptors on modulations of the electric signal waveform in the electric fish *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. *Horm. Behav.*, **53**, 481-488.

Allen, P. (1993) Determination of haematological parameters of *Oreochromis aureus* (Steindachner) and the effects of heparin on these. *Comp.Bioch.Physiol.*, 106, 355-358.

Allen, P. (1994) Evaluation of technique for sampling blood from small fishes. *Comp. Bioch. Physiol.*, **107**, 413-418.

AOAC. (2000) Association of Official Analytical Chemists. Oficial methods of analysis of association of official analytical chemists. 17^{ed}. Arlington: **1, 2**.

Akiyama, T., T. Murai, & K. Mori.(1986) Role of tryptophan metabolism in inhibition of spinal deformity of chum salmon fry caused by tryptophan deficiency. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **52**, 1255–1259.

Azevedo, T.M.P., Martins, M.L., Yamashita, M.M., Francisco, C. J. & Campos, B.E.S. (2003) Differential leucocyte counts in dourado, *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840, from the Mogi-Guaçu River, Pirassununga, SP. *Braz. J. Biol.*, **63**, 517-525.

Barton, B.A. & Iwama, G.K. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of cortivosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.*, **1**, 3-26.

Beyruth, Z., Mainardes-Pinto, C. S. R., Fusco, S. M., Faria, F. C., Silva, A. L. (2004) Utilização de alimentos naturais por *Oreochromis niloticus* em tanques de terra com arraçoamento. *B. Inst. Pesca.*, **30**, 9 - 24.

Boyd, C. (1990) *Water quality in ponds for aquaculture*. London: Birmingham Publishing Co, 482p.

Casillas, E. & Smith, L.S. (1997) Effect of stress on blood on coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdeneri*). *J. Fish Biology.*, **10**, 481-491.

Centeno, L., Silva-Acuña, R., Barrios, R. Lugo, R.S., Matute, C. & Pérez, J.L. (2007) Hematological characteristics of cachama (*Colossoma macropomum*) in three phases of the growth in Delta Amacuro, Venezuela. *Zootec. Trop.*, **25**, 237-243.

Chen, C.Y., Wooster, G.A., Getchell, R.G., Bowser, P.R. & Timmons, M.B. (2003) Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. *Aquaculture*, **218**, 89-102.

Collier, H.B. (1944) *The standardization of blood haemoglobin determinations*. Can. Med. Ass.J., **50**, 550-552.

Coloso, R. M., Murillo-Gurrea, D. P., Borlongan, I. G., Catacutan, M. R. (2004) Tryptophan requirement of juvenile Asian sea bass *Lates calcarifer*. *J. Appl. Ichthyol*, **20**, 43-47.

Cyrino, J.E.P., Bicudo, A.J.A., Sado, R.Y., Borghesi, R. & Dairiki, J.K. (2002) A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *R. Bras. Zootec.*, **39**, 68-87.

El-Sayed, A.F.M. (2006) *Tilapia culture*. 1.ed. Cambridge: CABI Publishing, 277p.

Eder, K., Peganova, S., Kluge, H., 2001. Studies on the tryptophan requirement of piglets. *Arch. Tierernahr.*, **55**, 281-297.

Fagbenro, O. A. & Nwanna, L. C. (1999) Dietary Tryptophan Requirement of the African Catfish, *Clarias gariepinus*. *J. Appl. Aquaculture*, **9**, 65 – 72.

Falcon, D.R., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Solarte, W.V.N. & Guimarães, I.G. (2008) Leucograma da tilápia-do-Nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetidas a estresse por baixa temperatura. *Ciênc. Anim. Bras.*, **9**, 543-551.

FAO. Organización De Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, 2012. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf> Acesso em 28 out. 2012.

Feldman, B.F. (2000) *Schalm's Veterinary Hematology*. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams and Wilkins. 5.ed. 1221p.

Floc'h, Le. N., Seve, B. (2007) Biological roles of tryptophan and its metabolism: Potential implications for pig feeding. *Livest. Sci.*, **112**, 23-32.

Furuya, W.M. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. (2010) Toledo: GFM, 100p.

Gardner, G.R. & Yevich, P.P. (1969) Studies of the blood morphology of three stuarine Cyprinodontiform fishes. *J.Fish. Res. Board Can.*, **26**, 433-447.

Gaylord, T.G.; Rawles, S.D.; Davis, K. B. (2005) Dietary tryptophan requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops x M. saxatilis*). *Aquac. Nutr.*, **11**, 367-374.

Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E. & Brosius, E. (1971) Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *Am. J. Clin. Pathol.*, **56**, 35-39.

Gomes, L.C., ChipparI-Gomes, A.R., Lopes, N.P., Roubach, R. & Araujo-Lima, C.A.R. M. (2001) Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *J. World Aquacult. Soc.*, **32**, 426-431.

Griffin, M.E., Brown, P.B. & Grant, A.L. (1992) The dietary lysine requirement of juvenile hybrid striped bass. *J. Nutr.*, **22**, 1332-1337.

Höglund, E., Balm, P. H. M. & Winberg, S. (2002) Stimulatory and inhibitory effects of 5-HT1A receptors on adrenocorticotrophic hormone and cortisol secretion in a teleost fish, the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Neur. Letters*, **324**, 193–196.

Höglund, E., Bakke, M.J., Øverli, Ø., Winberg, S. & Nilsson, G.E.(2005) Suppression of aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by L-tryptophan supplementation. *Aquaculture*, **249**, 525–531.

Hrubec, T.C., Cardinale, J.L.; Smith, S.A. (2000) Haematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.*, **29**, 7 – 12.

Hseu, J.R., Lu, F.I., Su, H.M., Wang, L.S., Tsai, C.L. & Hwang, P.P. (2003) Effect of exogenous tryptophan on cannibalism, survival and growth in juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, **218**, 251–263.

Jerônimo, G.T., Laffitte, L.V., Speck, G.M. & Martins, M.L. (2011) Seasonal influence on the hematological parameters in cultured Nile tilapia from southern Brazil. *Braz. J. Biol.*, **71**, 719-725.

Lepage, O., Larson, E.T., Mayer, I., Winberg, S. (2005) Serotonin, but not melatonin, plays a role in shaping dominant-subordinate relationships and aggression in rainbow trout. *Horm. Behav.*, **48**, 233–242.

Martins, M.L., Pilarsky, F., Onaka, M.E., Nomura, T.D. Fenerick, J., Ribeiro, K., Makoto, D., Myiazaki, Y., Castro, P.M. & Malheiros, E. B. (2004) Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus*, submetidas aos estímulos único e consecutivos de estresse de captura. *B. Inst. Pesca.*, **30**, 71-80.

Mauel, M.J., Miller, D.L. & Merrill, A.L. (2007) Hematologic and plasma biochemical values of health hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* x *Oreochromis nilotica*) maintained in a recirculating system. *J. Zoo and Wildlife Medicine.*, **38**, 420-424.

Murthy, H.S. & Varghese, T.J. (1997) Dietary Tryptophan Requirement for the Growth of Rohu, *Labeo rohita*. *J. Appl. Aquacult.*, **7**, 71-79.

Ministério Da Pesca E Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010. Brasília, 2012. Disponível em < <http://www.mpa.gov.br/index.php/topicos/300-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010> > Acesso em 10 out 2012.

National Research Council. (2011) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. Washington, DC: The National Academies Press.

Ortega, V.A., Renner, K.J. & Bernier, N.J. (2005) Appetite-suppressing effects of ammonia exposure in rainbow trout associated with regional and temporal activation of brain monoaminergic and CRF systems. *J. Exp. Biol.*, **208**, 1855–1866.

Pickford, G.E., Srivastava, A.K., Slicher, A.M. & Pang, P.K.T. (1971) The stress response in the abundance of circulating leucocytes in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.*, **177**, 89-96.

Piedras, S.R.N., Pouey, J.L.O. F. & Rutz, F. (2004) Efeito de diferentes níveis de proteína bruta e de energia digestível na dieta sobre o desempenho de alevinos de peixe-rei. *Rev. Bras. Agroec.*, **10**, 97-101.

Ranzani-Paiva, M. J. P. & Silva-Souza, A. T. (2004) Co-infestation of gills by different parasite groups in the mullet *Mugil platanus* Günther, 1880 (*Osteichthyes, Mugilidae*): effects on relative condition factor. *Braz J. Biol.*, **64**, 677-682.

Ranzani-Paiva, M.J., Silva-Souza, A.T. (2004) Hematologia de peixes brasileiros. In: Ranzani-Paiva, M.J.; Takemoto, R. M.; Lizama, M.A.P. (Eds.). *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Varela, p.89-120.

Ribeiro, W.R. (1978) *Contribuição ao estudo de hematologia de peixes. Morfologia e citoquímica das células do sangue e dos tecidos hematopoéticos do mandi amarelo, Pimelodus maculatus Lacepede, 1803*. Ribeirão Preto (SP): USP, 1978. 110p. (Tese de doutorado em Ciências. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP).

Rossi, L.; Tirapegui, J. (2004) Implicações do sistema serotoninérgico no exercício físico. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, **48**, 227-233.

Rostagno, H.S. (2011) *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais* / editor: Horacio Santiago Rostagno. – 3. ed. – Viçosa, MG: UFV, DZO, 252p.

Rosenfeld, G. (1947) Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan.*, **20**, 329-334.

Santiago, B.C. & Lovell, R.T. (1988) Amino Acid Requirements for Growth of Nile Tilapia. *J. Nutr.*, 1539-1546.

Saavedra, M., Barr, Y., Pousão-Ferreira, P., Helland, S., Yúfera, M., Dinis, M.T. & Conceição, L.E.C. (2009) Supplementation of tryptophan and lysine in *Diplodus sargus* larval diet: effects on growth and skeletal deformities. *Aquac. Res.*, **40**, 1191-1201.

Saoud, I. P., Ghanawi J. & Lebbos N. (2008) Effects of stocking density on the survival, growth, size variation and condition index of juvenile rabbitfish *Siganus rivulatus*. *Aquacult. Internat.* **16**, 109–116.

Schjolden, J., Pulma, K.G., Pottinger, T.G., Tottmar, O. & Winberg, S. (2006) Serotonergic characteristics of rainbow trout divergent in stress responsiveness. *Physiol. Behav.*, **87**, 938–947.

Sebastiao, F.A., Nomura, D., Sakabe, R. & Pilarski, F. (2011) Hematology and productive performance of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) naturally infected with *Flavobacterium columnare*. *Braz. J. Microbiol.* [online], **42**, 282-289.

Shabihul, F.A. & Khan, M.A. (2010) Dietary Tryptophan Requirement of Fingerling Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), Based on Growth and Body Composition. *J. World Aquacult. Soc.* **41**, 700-709.

Signor, A. *Desempenho produtivo e resistência ao estresse pelo frio da tilápia do Nilo alimentada com dietas suplementadas com levedura autolizada e zinco*. 2007. 113 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Centro de Aquicultura Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

Souza, M.L.R. (2002) Comparação de seis métodos de filetagem, em relação ao rendimento de filé e de subprodutos do processamento da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.*, Viçosa, **31**, 1076-1084.

Tavares-Dias, M. & Faustino, C.D. (1998) Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. *Ars. Vet. Jaboticabal*, **14**, 254-263.

Tavares-Dias, M., Martins, M.L. & Kronka, S.N. (1999) Evaluation of the hematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) with *Argulus* sp. (Crustacea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. *R. Bras. Zoo.*, **16**, 553-555.

Tavares-Dias, M., Frascá-Scorvo, C.M.D., Novato, P.F.C. & Moraes, F.R. (2000) Hematological characteristics of hybrid Florida red tilápia, *Oreochromis uropolis hornorum* x *O. mossambicus* under intensive rearing. In: Proceeding of the 5TH International Symposium on Tilapia Aquaculture, R.J., Anais, 533-541.

Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R., (2004) *Hematologia de Peixes Teleósteos*. Ribeirão Preto: M., Tavares-Dias, 144p.

Tejpal, C.S., PAL, A.K., Sahu, N.P., Kumar, J.A., Muthappa, N.A., Vidy, S. & Rajan, M.G. (2009) Dietary supplementation of L-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerlings. *Aquaculture*, **293**, 272-277.

Tizard, I.R. *Imunologia veterinária: uma introdução*. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. 120 p.

Ueda, I.K., Egami, M.I., Sasso, W. S. & Matushima, E.R. (2001) Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis* (Tilapia) *niloticus*. (Linnaeus, 1758) (*Cichlidae*, Teleostei) - Part II. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, **38**, 273-277.

Ugwem, G.U., Akinrotimi, O.A. & Eseimokumo, F. (2011) Hematological responses of wild Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after acclimation to captivity. *J. J. Biol. Sciences*, **4**, 225 – 230.

Wagner, P.M., Ribeiro, R.P., Moreira, H.L.M., Vargas, L. & Povh, J.A. (2004) Avaliação do desempenho produtivo de linhagens de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em diferentes fases de criação. *Acta Sci. Anim. Sci.*, **26**, 187-196.

Wilson, R.P. (2002) *Amino acids and Proteins*: In: Fish nutrition .Third edition, Ed: J.E.Halver, Elsevier *Science*. p.143–179.

Winberg, S. & Nilsson, G.E. (1993) Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106**, 597–614.

Winberg, S., Øverli, Ø. & Lepage, O. (2001) Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. *J. Exp. Biol.*, **204**, 3867–3876.

Wintrobe, M.M. (1934) Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Hematologica*, Leipzig, **51**, 32-49.

Zeitoun, I.H., Ullrey, D.E., Magee, W.T., Gill, J.L. & Bergen, W.G. (1976) Quantifying nutrient requirements of fish. *J. Fish. Res. Board Can.*, **33**, 167–172.

CAPÍTULO II

Triptofano em dietas para tilápia do Nilo: desempenho produtivo e respostas hematológicas e bioquímicas antes e após o estímulo pelo calor

Resumo: Dentre os aminoácidos o triptofano é essencial e deve ser fornecido na dieta, uma vez que sua síntese não pode ser realizada pelo animal. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito dos níveis de triptofano sobre o desempenho produtivo e parâmetros hematológicos antes e após o estímulo pelo calor. Foram utilizados 600 alevinos de tilápia do Nilo $3,39 \pm 0,02$ g e $5,07 \pm 0,01$ cm, respectivamente, distribuídos em 20 caixas de fibra de vidro com capacidade de 250 litros, sendo cada unidade composta por 30 peixes. O delineamento foi inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e quatro repetições. Foram elaboradas cinco dietas com $271,3$ g kg^{-1} de proteína digestível e 3181 de kcal kg^{-1} de energia digestível com níveis crescentes de triptofano ($2,33$; $2,69$; $3,17$; $3,50$ e $3,87$ g kg^{-1}). Após o período de 85 dias foram efetuadas as análises de desempenho produtivo, hematológicas e bioquímicas. Ao término destas análises e para verificar o estímulo causado pelo aumento da temperatura, os peixes foram transferidos de aquários, sendo distribuídos 10 peixes por unidade experimental, permanecendo a uma temperatura de 35°C por sete dias. Após esse período foram feitas as mesmas análises hematológicas e bioquímicas antes do desafio. Não foram observadas diferenças significativas para os parâmetros do desempenho produtivo. A retenção de aminoácidos foi significativa para histidina e para o triptofano. O estímulo pelo calor provocou aumento significativo para o volume corpuscular médio, assim como teve influência sobre a glicose e o cortisol plasmático. Pode-se concluir que o nível $2,33$ g kg^{-1} da dieta correspondente à relação triptofano: lisina de $0,157: 1$ foi o suficiente para atender as exigências dietéticas e de higidez da espécie. O estímulo pelo calor não alterou o estado de saúde dos peixes.

Palavras chave: Hematologia, nutrição, tilápia do Nilo, triptofano.

Tryptophan in the diets of Nile tilapia: productive performance and hematological and biochemical responses before and after heat stimulation

Abstract: Among the amino acids tryptophan is essential and must be provided in the diet, since its synthesis can not be carried by the animal. This study aimed to evaluate the effect of tryptophan levels on productive performance and blood parameters before and after heat

stimulation. Were used 600 Nile tilapia with mean average weight and length of 3.39 ± 0.02 g and 5.07 ± 0.01 cm, respectively, distributed in 20 glass fiber boxes with a capacity of 250 liters, with each unit consisted by 30 fish. The design was completely randomized with five treatments and four replications. Four diets were prepared with approximately 271.3 g kg^{-1} of digestible protein and $3181 \text{ kcal kg}^{-1}$ of digestible energy with increasing levels of tryptophan (2.11, 2.65, 3.19, 3.74 and 4, 21 g kg⁻¹). After the period of 85 days the productive performance, hematological and biochemical analyzes were performed.. At the end of these analyzes fish were transferred to the laboratory, and 10 fish per experimental unit were distributed, remaining at a temperature of 35°C for seven days. After this period were made the same hematological and biochemical analyzes performed before challenge. No significant differences were observed for productive performance. The amino acids retention was significant for histidine and tryptophan. The heat stimulus caused a significant increase in the mean corpuscular volume, and had influence on glucose and plasma cortisol. It can be concluded that the level of 2.33 g kg^{-1} diet corresponding to tryptophan: lysine ratio of 0.157: 1 was enough to meet the dietary requirements of the species and healthiness. The heat stimulus did not alter the state of fish health.

Keywords: *Hematology, Nile tilapia, nutrition, tryptophan.*

Introdução

A tilápia do Nilo é de grande importância para piscicultura mundial e sua produção cresce acentuadamente, sendo a segunda espécie mais cultivada do mundo, ficando somente atrás das carpas (FAO 2012). Destaca-se na piscicultura brasileira, dentre outros fatores, pela disponibilidade de alevinos, domínio das técnicas reprodutivas, bem como alta prolificidade, além disso, apresenta fácil adaptação aos distintos ambientes de criação, pelos índices zootécnicos e pela aceitação de sua carne no mercado consumidor (Beyruth *et al.* 2004).

Apesar de várias pesquisas já terem sido desenvolvidas com essa espécie, as suas exigências nutricionais ainda não foram totalmente esclarecidas. A nutrição tem como objetivo determinar as exigências nas diferentes fases de desenvolvimento dos peixes. Nutriente, como a proteína é essencial ao desenvolvimento dos animais, sendo que os aminoácidos devem estar em proporções adequadas de forma a atender as necessidades nutricionais dos peixes, visando melhor desempenho e manutenção do estado sanitário.

Dentre os aminoácidos o triptofano é essencial e deve ser fornecido na dieta, uma vez que sua síntese não pode ser realizada pelo animal. Além do triptofano participar da síntese proteica, desempenha importante papel sobre as funções biológicas. Também atua como um precursor da serotonina (5 – hidroxitriptamina, 5HT), um neurotransmissor indoleamina que esta ligada a vários padrões de comportamento, incluindo a agressividade (Winberg & Nilsson 1993), estresse (Schjolden *et al.* 2006), alimentação (Ortega *et al.* 2005), e dominância social (Lepage *et al.* 2005). A suplementação de triptofano para controlar a agressão já foi observada em algumas espécies de peixes como a truta arco-íris (Winberg *et al.* 2001), garoupa (*Epinephelus marginatus*), (Hseu *et al.* 2003) e bacalhau do Atlântico (*Gadus Morhus*), (Höglund *et al.* 2005).

Atualmente uma ferramenta que esta sendo muito empregada na piscicultura é a hematologia, que tem como função avaliar o estado de higidez dos animais. O sangue é um tecido líquido móvel, do tipo conjuntivo, que esta em equilíbrio com praticamente todos os outros tecidos, constituindo-se uma das grandes forças homeostáticas do organismo. Distribui calor, transporta gases respiratórios, nutrientes e produtos de excreção, além de atuar na defesa do organismo (Ranzani-Paiva & Silva-Souza 2004).

Os parâmetros hematológicos em muitas espécies de peixes são regulados pelas condições ambientais, conseqüentemente o impacto de fatores como temperatura, nível de oxigênio dissolvido, potencial de hidrogênio e estresse, podem alterar o perfil das variáveis hematológicas dos peixes. Cabe ressaltar que peixes cultivados são mais afetados pela flutuação da temperatura do que peixes na natureza, isso ocorre em parte pela impossibilidade de se movimentarem por longas distâncias e assim se afastarem da temperatura adversa (Watts *et al.* 2002).

Sabendo da importância da hematologia como ferramenta para avaliar o estado de saúde dos peixes e dá necessidade de mais conhecimentos sobre as exigências nutricionais da tilápia, este trabalho teve como finalidade avaliar o efeito dos níveis de triptofano sobre o desempenho produtivo e parâmetros hematológicos antes e após o estímulo pelo calor.

Material e métodos

Procedimentos experimentais

O estudo foi realizado na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, no laboratório de aquicultura do GEMaQ (Grupo de Estudos e Manejo na Aquicultura) *Campus* de Toledo. O experimento foi dividido em três fases:

Fase I

Foram utilizados 600 alevinos de tilápia do Nilo com peso e comprimento médio inicial de $3,39 \pm 0,02$ g e $5,07 \pm 0,01$ cm, respectivamente, distribuídos em 20 caixas de fibra de vidro com capacidade de 250 litros, sendo cada unidade composta por 30 peixes. Após 45 dias os peixes foram retirados das caixas, medidos e pesados individualmente para avaliação do desempenho produtivo e 15 peixes foram devolvidos para cada unidade experimental com a mesma biomassa.

Fase II

Para a segunda fase, o experimento foi conduzido por mais 40 dias, os peixes apresentaram peso e comprimento médio inicial de $24,26 \pm 1,96$ g e $14,78 \pm 0,26$ cm, respectivamente. No final do período experimental (85 dias) os peixes foram retirados das caixas, medidos e pesados, para avaliação do desempenho produtivo e coleta de sangue. Desses 15 peixes, 10 foram devolvidos para as mesmas unidades experimentais e foram submetidos ao desafio térmico.

Fase III: estímulo pelo calor

Após o término do desempenho produtivo e da coleta de sangue dos peixes da segunda fase, os animais utilizados nesta etapa foram mantidos na mesma estrutura experimental. Para a realização desse desafio foi mantido o mesmo delineamento do desempenho produtivo, com cinco tratamentos e quatro repetições sendo que 200 peixes foram devolvidos às estruturas, perfazendo 10 peixes por unidade experimental.

Posteriormente a transferência dos peixes realizou-se a elevação da temperatura de 27°C para 35°C (com elevação de 1°C por dia), tendo os peixes permanecidos nessas condições por sete dias. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, porém não foi mensurado o alimento consumido. Após esse período, foram avaliados os mesmo parâmetros hematológicos e bioquímicos da fase II.

Confecção das dietas

Foram elaboradas cinco dietas com 273,1 g kg⁻¹ de proteína digestível e 3181 de kcal kg⁻¹ de energia digestível com níveis crescentes de triptofano (2,33; 2,69; 3,17; 3,50 e 3,87 g kg⁻¹) conforme Tabela 10. Os ingredientes selecionados foram moídos individualmente em moedor tipo martelo com peneira de malha 0,5 mm. Posteriormente as rações foram extrusadas para terem diâmetros de aproximadamente 3,0 mm. O arraçoamento foi realizado quatro vezes ao dia (8h, 11h, 14h e 17h00) até a saciedade aparente dos peixes. A composição dos aminoácidos essenciais e não essenciais encontram-se na Tabela 11. As análises foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC: *High-Performance Liquid Chromatography*) no Laboratório da Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda. – *Animal Nutrition*, São Paulo, Brasil.

Tabela 10 Composição das dietas com níveis crescentes de triptofano (g kg⁻¹).

Ingredientes	Dietas				
	2,33	2,69	3,17	3,50	3,87
Milho, grão	440,30	440,30	440,30	440,30	440,30
Soja, farelo 45%	300,0	300,0	300,0	300,0	300,0
Vísceras, farinha de aves	60,0	60,0	60,0	60,0	60,0
Trigo, farelo	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Milho, gluten 60%	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Fosfato bicálcico	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Óleo de soja	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Suplem. min. Vitamínico *	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
L- ácido glutâmico	28,0	27,50	27,00	26,50	26,00
L-alanina	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
L- lisina	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6
L- treonina	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
DL – metionina	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
L-triptofano	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
Sal comum	3,10	3,10	3,10	3,10	3,10
Antifúngico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Vitamina C	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
Cloreto de colina	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62
Antioxidante	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

*Níveis de garantia por kg do produto - Premix (DSM-Roche®): Vit. A, 24.000 UI; Vit. D3, 6.000 UI; Vit. E, 300 mg; Vit. K3, 30 mg; Vit. B1, 40 mg; Vit. B2, 40 mg; Vit. B6, 35 mg; Vit. B12, 80 mg; Ác. fólico, 12 mg; Pantotenato Ca, 100 mg; Vit. C, 600 mg; Biotina, 2 mg; Colina, 1.000 mg; Niacina, 8730; Ferro, 200 mg; Cobre, 35 mg; Manganês, 100 mg; Zinco, 240 mg; Iodo, 1,6 mg; Cobalto, 0,8 mg.

Tabela 11 Composição de aminoácidos das dietas experimentais (g kg⁻¹ de matéria seca)¹.

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Dietas				
	2,33	2,69	3,17	3,50	3,87
Matéria seca ²	938,8	946,3	940,5	938,3	946,0
Energia digestível (kcal kg ⁻¹) ³	3181	3181	3181	3181	3181
Proteína digestível ³	271,3	271,3	271,3	271,3	271,3
Gordura ³	48,90	48,90	48,90	48,90	48,90
Fibra bruta	31,10	31,10	31,10	31,10	31,10
Cálcio	7,7	8,7	8,7	8,7	8,7
Fósforo disponível ³	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
Aminoácido essencial²					
Arginina	15,25	15,21	15,95	15,69	14,77
Histidina	6,32	6,32	6,43	6,6	5,85
Fenilalanina	12,94	12,8	12,75	12,85	11,59
Isoleucina	10,41	10,22	9,71	9,87	9,31
Leucina	21,79	21,55	17,95	18,31	20,31
Lisina	14,82	14,22	17,1	17,24	15,94
Metionina	6,29	6,69	6,75	6,66	5,9
Metionina + cistina	9,73	10,21	9,98	9,97	8,94
Treonina	13,26	13,17	13,38	13,54	12,42
Triptofano	2,51	2,99	3,39	3,68	4,09
Valina	11,3	11,13	11,53	11,7	10,52
Aminoácido não essencial²					
Alanina	36,51	36,93	38,43	39,63	36,16
Ácido aspártico	22,6	22,66	22,96	22,96	21,21
Ácido glutâmico	67,82	67,95	71,1	72,29	65,49
Cistina	3,46	3,52	3,23	3,31	3,04
Glicina	11,35	11,2	11,2	11,56	10,22
Tirosina	9,8	9,74	9,3	9,41	8,3
Serina	12,11	11,87	11,99	12,27	11,15

¹Valores médios de análises realizadas em duplicata

²Valores determinados no Laboratório da Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos, Ltda., São Paulo, Brasil.

³Com base em valores descritos por Furuya et al. (2010) e Rostagno et al. (2011).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. A aeração do sistema foi mantida por meio de um soprador ($5,49 \pm 0,41$ mg L⁻¹) e a temperatura controlada com a utilização de termostato digital ($26,11 \pm 1,32$ °C) mantendo-se dentro da faixa de conforto para espécie, sendo aferida às 8h00 e 17h00. Fez-se avaliação semanal do oxigênio dissolvido (mg L⁻¹), condutividade elétrica (μ S cm⁻¹) e pH utilizando-se a sonda YSI Professional Plus Multiparameter Water Quality Meter. Ao final do experimento, os peixes foram mantidos em jejum por 24h, para esvaziamento do trato gastrointestinal; posteriormente, para coleta de sangue, foram anestesiados com benzocaína (100 mg L⁻¹ de água) em seguida foram submetidos à eutanásia com benzocaína (250 mg L⁻¹), para realização dos parâmetros zootécnicos e centesimais seguindo protocolo de (Gomes et al. 2001).

Para o desempenho produtivo, foram avaliados os parâmetros de ganho de peso (g) [(peso final) – (peso inicial)]; conversão alimentar [(consumo de ração)/(ganho de peso)]; sobrevivência (%) [(número de animais final ÷ número de animais inicial) × 100]; índice hepatossomático [(peso do fígado/peso final) × 100]; uniformidade = [(quantidade de peixes com peso corporal dentro da média ± desvio padrão/número total de peixes) × 100] ; taxa de eficiência protéica [ganho de peso/(consumo de ração × % da proteína da dieta) × 100]; taxa de retenção proteica [100 × proteína corporal final – proteína corporal inicial)/ consumo em proteína]; uniformidade Retenção de aminoácidos: $100 \times [(\text{peso final} \times \text{conteúdo de aminoácido}) - (\text{peso inicial} \times \text{conteúdo de aminoácido})]/\text{aminoácido consumido}$.

Análises laboratoriais

Para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos foram utilizados 12 peixes por tratamento, antes e após o estímulo pelo calor. Foi coletado 1 mL de sangue de cada peixe por punção da veia caudal, com auxílio de duas seringas, sendo uma delas heparinizada. Com o sangue coletado com a seringa heparinizada, foi realizada a análise do hemograma dos peixes. A contagem total de eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer, a taxa de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se o Kit comercial Analisa Diagnóstica®, para determinação colorimétrica, segundo (Collier 1944). A porcentagem de hematócrito foi determinada pelo método do microhematócrito, de acordo com a metodologia proposta por (Goldenfarb *et al.* 1971). Posteriormente a estas análises foram calculados os índices hematimétricos: Volume corpuscular médio [VCM (fL) = (hematócrito × 10)/eritrócitos]; e concentração de hemoglobina corpuscular média [CHCM (gdL⁻¹) = (hemoglobina × 100)/hematócrito, segundo (Wintrobe 1934).

Para contagem de leucócitos e trombócitos totais e diferenciação das células de defesa, foram feitas extensões sanguíneas e coradas pelo método de (Rosenfeld 1947). A leitura foi realizada em microscópio utilizando-se aumento de 100x. A contagem total de leucócitos e trombócitos foram realizadas pelo método indireto (Martins *et al.* 2004): Leucócitos totais (μL) = [(número de leucócitos contados na extensão × número de eritrócitos em câmara de Neubauer)/2000]; e Trombócitos totais (μL) = [(número de trombócitos contados na extensão × número de eritrócitos em câmara de Neubauer)/ 2000]. Para o diferencial foram contadas 100 células, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular de interesse.

O sangue coletado com a segunda seringa foi transferido para um tubo identificado e em seguida centrifugado a 3000 RPM por 10 minutos. Após a centrifugação o soro foi armazenado em freezer (-20C) para determinação da glicose plasmática pela metodologia enzimática colorimétrica (kit Analisa[®]) e cortisol plasmático determinado pelo teste de ELISA através do kit EIAgen[™] CORTISOL-test (BioChem ImmunoSystems).

As análises centesimais da carcaça como umidade, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral, foram realizadas no Laboratório de Qualidade de Alimento do Grupo de Estudos e Manejo na Aquicultura – Gemaq/Unioeste, Toledo, Paraná. As análises foram realizadas de acordo com a metodologia descrita pela (AOAC 2000).

Análises estatísticas

Foi utilizado um modelo inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância ($P < 0,05$). As diferenças entre as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância para comparação entre médias. Para avaliação dos dados do desafio térmico foi utilizado análise de variância (ANOVA) fatorial (5 x 2), seguidas do teste de Tukey ($p < 0,05$) para as fases de desafio térmico e regressão polinomial para os níveis de triptofano avaliados. Para realização destas análises utilizou-se o programa estatístico SAS 9.1.13 (SAS, 2004).

Resultados

Os parâmetros da qualidade de água monitoradas antes do estímulo pelo calor mostraram-se dentro do considerado adequado para manutenção da condição de saúde dos peixes, segundo (Boyd, 1990), com valores médios de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade $26,11 \pm 1,32$; $5,49 \pm 0,41$; $7,83 \pm 0,029$; $110,04 \pm 16,66$ respectivamente. Os valores médios de ganho de peso, conversão alimentar aparente, taxa de eficiência proteica , taxa de retenção proteica, sobrevivência, índice hepatossomático, gordura visceral e uniformidade da primeira e segunda fase dos peixes alimentados com níveis crescentes de triptofano estão apresentados na Tabela 12. Não houve efeito ($P < 0,05$) dos tratamentos nos parâmetros do desempenho avaliados.

Tabela 12 Desempenho produtivo de alevinos de tilápia alimentados com níveis crescentes de triptofano*.

Fase I	Dietas				
	2,33	2,69	3,17	3,50	3,87
GP (g)	14,88±0,59	15,77±1,65	16,69±1,08	15,99±0,90	15,44±1,58
CF (cm)	9,37±0,21	9,54±0,26	9,73±0,10	9,52±0,09	9,43±0,13
CAA	0,79±0,04	0,79±0,04	0,75±0,04	0,83±0,04	0,73±0,10
TEP (%)	2,52±0,05	2,55±0,13	2,69±0,16	2,48±0,10	2,59±0,13
SO (%)	96,67±4,17	98,33±1,92	95,00±4,30	96,67±2,72	98,33±1,92
Uni (%)	66,51±5,89	58,38±11,71	69,58±6,82	73,16±5,93	70,00±8,87
Fase II					
GP (g)	43,90±4,36	49,32±4,53	46,51±3,76	46,55±4,77	46,85±2,82
CF	14,60±0,24	14,92±0,17	14,80±0,16	14,81±0,35	14,78±0,31
CA	0,81±0,04	0,79±0,07	0,78±0,02	0,86±0,10	0,80±0,04
TEP	4,24±0,24	4,40±0,40	4,44±0,16	4,06±0,44	4,32±0,24
TRP	38,74±4,19	55,87±13,56	51,50±6,45	43,81±6,84	47,73±6,84
SO (%)	98,33±3,33	98,33±3,33	98,33±3,33	98,33±3,33	96,67±3,84
IHS (%)	2,61±0,24	2,29±0,61	2,46±0,46	2,24±0,54	2,44±0,51
GV(%)	1,54±0,38	1,56±0,19	1,75±0,31	1,46±0,21	1,64±0,49

GP=ganho de peso; CF=comprimento final; CAA=conversão alimentar aparente;TEP=taxa de eficiência proteica;TRP=taxa de retenção proteica;SO=sobrevivência;Uni=uniformidade;IHS=índice hepatossomático; GV=gordura visceral

*Dados expressos em média \pm desvio padrão.

A composição centesimal da carcaça dos peixes que consumiram as diferentes dietas está apresentada na Tabela 13. Não houve diferença estatística para umidade, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral.

Tabela 13 Composição corporal ($\text{g} \cdot 100^{-1} \text{g}$) dos peixes alimentados com dietas contendo níveis crescentes de triptofano*.

	Dietas (triptofano digestível g kg^{-1} de matéria seca)				
	2,33	2,69	3,17	3,50	3,87
Umidade	70,93±2,45	69,08±0,35	68,76±0,37	70,46±2,67	69,69±0,45
Proteína bruta	13,58±1,34	16,79±1,67	16,10±2,02	15,03±0,61	15,30±1,62
Extrato etéreo	11,53±1,24	11,90±1,01	12,45±1,26	11,06±2,13	10,23±2,45
Matéria mineral	3,37±0,47	3,81±0,30	3,62±0,17	3,41±0,29	3,62±0,24

*Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Na Tabela 14 estão apresentados os valores da composição corporal dos aminoácidos em peixes inteiros, não foram observadas diferenças significativas $P > 0,05$ sobre estes parâmetros.

Tabela 14 Composição proximal corporal de aminoácidos essenciais e não essenciais ($\text{g} / 16\text{g N}$) de juvenis de tilápias alimentadas com dietas com níveis crescentes de triptofano*.

Aminoácidos	Dietas				
	2,33	2,69	3,17	3,50	3,87
Aminoácido essencial					
Arginina	5,38±0,53	4,93±0,53	5,38±0,79	4,89±0,43	5,41±0,52
Histidina	1,95±0,16	1,82±0,17	1,95±0,23	1,84±0,08	2,00±0,17
Fenilalanina	3,44±0,28	3,17±0,29	3,39±0,43	3,14±0,25	3,45±0,28
Isoleucina	3,45±0,28	3,20±0,31	3,37±0,42	3,23±0,20	3,49±0,34
Leucina	5,96±0,44	5,61±0,58	5,84±0,67	5,62±0,35	5,98±0,64
Lisina	7,00±0,74	6,69±0,28	6,96±0,54	6,48±0,66	6,86±0,65
Metionina	1,99±0,18	1,91±0,21	2,08±0,40	1,92±0,11	2,04±0,31
Metionina+cistina	2,53±0,27	2,46±0,28	2,70±0,54	2,47±0,14	2,65±0,37
Treonina	3,64±0,34	3,36±0,38	3,58±0,41	3,38±0,23	3,63±0,44
Triptofano	0,80±0,05	0,82±0,10	0,80±0,10	0,83±0,08	0,83±0,11
Valina	3,99±0,31	3,69±0,40	3,91±0,49	3,73±0,24	4,00±0,42
Aminoácido não essencial					
Alanina	5,84±0,53	5,39±0,67	5,70±0,66	5,59±0,23	5,89±0,68
Ácido aspártico	7,54±0,63	7,03±0,73	7,43±0,94	7,17±0,37	7,59±0,91
Ácido glutâmico	11,44±1,02	10,67±1,37	11,12±1,34	11,13±0,46	11,47±1,40
Cistina	0,58±0,05	0,54±0,07	0,61±0,14	0,54±0,03	0,60±0,06
Glicina	7,68±0,85	7,10±0,94	7,68±0,97	7,38±0,33	7,85±0,88
Tirosina	2,69±0,18	2,44±0,18	2,66±0,36	2,41±0,24	2,70±0,13
Serina	3,45±0,34	3,19±0,33	3,42±0,44	3,19±0,24	3,48±0,39

*Os valores são médias \pm desvio padrão de quatro repetições.

Para retenção de aminoácidos, foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) para histidina e triptofano, pelo teste de Tukey (Tabela 15). Para a histidina os peixes que receberam a dieta com 3,87 g kg^{-1} de triptofano da matéria seca apresentaram menor retenção de histidina. A maior retenção foi obtida para as dietas contendo 2,19 e 3,17 g kg^{-1} de triptofano da matéria seca. Contudo, não diferiu da dieta contendo 2,33 g kg^{-1} de triptofano da matéria seca. Para o

triptofano, foi observado que à medida que este aminoácido foi acrescentado na ração a retenção diminuiu ($P>0,05$).

Tabela 15 Retenção corporal de aminoácidos essenciais e não essenciais de juvenis de tilápias alimentadas com dietas com níveis crescentes de triptofano¹.

Aminoácidos	Dietas				
	2,33	2,69	3,17	3,50	3,87
Aminoácido essencial					
Arginina	31,91±1,67	35,63±2,53	35,73±1,85	28,95±5,14	36,16±1,06
Histidina ²	27,68±1,46ab	31,60±2,87a	32,06±1,49a	25,73±3,61b	17,10±0,38c
Fenilalanina	23,79±1,55	27,05±2,13	27,97±1,33	22,48±4,10	29,20±0,68
Isoleucina	29,58±1,58	34,06±2,82	36,44±1,81	30,15±5,32	36,56±0,48
Leucina	24,48±1,35	28,61±1,65	34,25±1,68	28,25±4,85	28,77±0,69
Lisina	42,31±3,78	51,70±6,33	43,06±2,84	34,33±3,66	42,13±1,46
Metionina	28,55±1,06	31,45±1,49	32,69±2,76	26,93±4,56	41,59±21,00
Metionina+cistina	24,00±1,10	26,43±1,27	32,69±2,76	23,00±3,79	29,15±1,80
Treonina	25,00±1,16	28,21±2,65	28,60±1,52	23,40±3,92	28,94±1,35
Triptofano ³	28,82±3,02b	30,05±2,33b	24,89±3,97ab	20,81±3,90a	20,01±2,19a
Valina	31,52±1,76	36,03±3,01	35,66±1,47	29,31±4,99	37,04±0,83
Aminoácido não essencial					
Alanina	14,32±0,71	16,03±1,26	15,62±0,67	32,82±4,82	16,10±0,52
Ácido aspártico	29,92±1,23	33,89±2,88	34,14±1,22	28,81±4,52	35,02±1,38
Ácido glutâmico	15,07±0,48	17,09±1,68	16,44±0,62	14,18±2,21	17,09±0,69
Cistina	15,21±0,95	16,91±1,15	19,89±2,35	15,11±2,26	19,48±0,96
Glicina	60,52±4,22	69,01±6,61	72,19±3,71	58,67±7,55	75,12±2,58
Tirosina	24,93±1,75	27,74±2,46	30,42±0,95	23,96±4,97	32,39±2,22
Serina	25,91±1,34	29,71±2,61	30,50±1,86	24,33±4,06	30,94±1,41

¹Valores são médias ± desvio padrão de quatro repetições. Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ($P>0,05$).

²Efeito quadrático: $y = -911,306x^2 + 128,197x + 27,688$; $R^2 = 0,87$

³Efeito linear: $y = -53,727x + 30,293$; $R^2 = 0,62$

Retenção de aminoácidos = [(peso final × conteúdo do Aa final) – (peso inicial × conteúdo do aminoácido inicial)] / (consumo de Aa)

Na Tabela 16 estão apresentados os dados da contagem total de eritrócitos (Erit), taxa de hemoglobina (Hb), percentual de hematócrito (Htc), volume corpuscular médio (VCM), e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), na fase anterior (Fase II) e posterior (Fase III) ao estímulo pela alta temperatura. O eritrograma dos peixes na fase anterior ao estímulo pelo calor não foi afetado pelos níveis de triptofano. Após o estímulo pela alta temperatura pode-se observar que os animais apresentaram elevação do volume corpuscular médio independente da suplementação de triptofano e foi significativamente maior após o estímulo. Comparando os períodos, foi observado que para série vermelha o desafio térmico afetou ($P<0,05$) apenas o volume corpuscular médio.

A Tabela 17 apresenta o número de leucócitos e trombócitos totais, e a diferenciação de leucócitos, incluindo o percentual de linfócitos, neutrófilos e monócitos. Estes parâmetros não se alteraram ($P > 0,05$) em função dos níveis crescentes de triptofano na ração nem antes e nem após o desafio térmico.

Na Tabela 18 estão apresentadas as médias de glicose plasmática e cortisol. Para glicose plasmática foi observada interação entre os níveis de triptofano suplementados na dieta e a temperatura. Separadamente, antes do desafio térmico, através da análise de regressão foi observado efeito quadrático dos níveis de triptofano sobre a glicose, da mesma forma que foi observado diferenças entre as fases (antes e após o estímulo pelo calor). Para o cortisol, foi observada interação entre os níveis de triptofano suplementados na dieta e a temperatura. Através da análise de regressão foi observado efeito quadrático para o cortisol antes e após o estímulo pelo calor.

Tabela 16 Valores médios de contagem total de eritrócitos (Erit), taxa de hemoglobina (Hb), hematócrito (Hct), volume corpuscular médio (VCM), e concentração de hemoglobina corpuscular média (HCM), antes e após o estímulo pelo calor¹.

	Fases ²	Dietas					Fases	Trip	Trip*Fases
		2,33	2,69	3,17	3,50	3,87			
Eri x 10 ⁶ μL ⁻¹	Antes	2,14±0,21	2,02±0,13	2,02±0,16	2,25±0,23	2,07±0,31	ns	ns	ns
	Após	1,84±0,14	1,80±0,14	1,83±0,13	1,89±0,18	1,87±0,16			
Hb g dL ⁻¹	Antes	9,42±1,10	10,24±1,36	9,31±1,31	10,33±0,96	9,12±1,23	ns	ns	ns
	Após	9,85±1,15	10,44±0,96	10,14±1,78	10,14±1,46	10,68±1,11			
Htc (%)	Antes	40,17±0,83	41,83±1,36	39,50±1,31	40,75±1,42	40,08±1,08	ns	ns	ns
	Após	40,58±1,24	40,83±0,96	41,50±1,78	40,33±1,23	40,83±1,33			
VCM (μ ³)	Antes	189,51±20,10a	209,45±16,02a	198,11±14,00a	184,9±30,10a	196,0±21,04a	0,02	ns	ns
	Após	223,0±21,78b	229,33±25,07b	225,38±17,35b	200,85±67,12b	223,49±27,72b			
CHCM (%)	Antes	24,04±2,38	24,79±3,44	23,81±3,31	25,62±2,12	23,44±2,54	ns	ns	ns
	Após	24,22±3,00	25,60±2,45	24,75±4,37	27,55±3,79	26,03±3,05			

¹Dados expressos em média ± desvio padrão. ns= não significativo. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

²Fases: antes e após estímulo pelo calor.

Tabela 17 Valores médios de leucócitos totais (Leuc tot), trombócitos totais (tromb tot), porcentagem de linfócitos (Linf), porcentagem de neutrófilos (Neutr), e porcentagem de monócitos (Mono) de tilápias antes e após o estímulo pelo calor¹.

		Dietas							
Fases		2,33	2,69	3,17	3,50	3,87	Fases	Trip	Trip x fases
Leuc Tot μL^{-1}	Antes	25225±5431,4	26335,6±3484,9	30550±7049,6	33179,6±1133,1	28225±8743,6	ns	ns	ns
	Após	27394±5705,3	20397±9079,6	20254±6742,9	24614,1±5843,5	21541±4148,28			
Tromb tot μL^{-1}	Antes	26412±14422,9	28468,8±11394,6	21507±9396,3	30416,7±15624,3	26148,75±3898,41	ns	ns	ns
	Após	16450±5705,3	19764,2±6549,6	22946,6±5891,9	26864,1±12760	22901,50±4260,10			
Linf %	Antes	86,20±,63	88,75±4,68	84,80±2,48	84,83±2,04	87,75±2,42	ns	ns	ns
	Após	90,40±1,94	91,24±2,41	90±1,73	90,50±3,83	90,17±2,64			
Neutr %	Antes	10,20±3,27	8,0±4,20	12±3,93	9,83±2,04	9,20±2,64	ns	ns	ns
	Após	9,20±2,16	8,43±2,99	10±1,73	9,50±2,83	9,33±2,42			
Mono %	Antes	3,6±1,34	3,7±1,97	3,0±2,04	5,3±1,86	5,0±1,73	ns	ns	ns
	Após	1,0±0,44	1,5±0,70	0,0±0,0	0,0±0,0	3,0±1,22			

Dados expressos em média ± desvio padrão. ns= não significativo.

Fases: antes e após estímulo pelo calor.

Tabela 18 Médias de cortisol e glicose plasmáticas de tilápias, antes e após o estímulo pelo calor.

	Fases	Dietas					Fases	Trip	Trip*Fases
		2,33	2,69	3,17	3,50	3,87			
Glicose mg dL ⁻¹	Antes ¹	64,93±9,97b	52,53±7,11b	75,51±14,66a	66,47±14,10a	107,37±23,58a	<0,01	<0,01	<0,01
	Após	90,31±16,71a	91,86±14,16a	92,73±8,14a	77,65±14,00a	88,98±15,00a			
Cortisol mg dL ⁻¹	Antes ²	7,72±2,50a	7,26±2,41a	4,80±0,55a	3,58±1,23b	5,80±2,22a	>0,05	>0,05	<0,05
	Após ³	4,30±1,05b	5,20±1,42a	6,80±2,62a	6,30±1,75a	5,64±2,58a			

Dados expressos em média ± desvio padrão. Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes diferem entre si pela ANOVA.

¹ Efeito Quadrático: $y = 343,96264 - 208,18572x + 37,77209x^2$; $R^2 = 81,88$

² Efeito Quadrático: $y = 41,20736 - 21,47143x + 3,14810x^2$; $R^2 = 76,66$

³ Efeito Quadrático: $y = -20,93717 + 16,6516x - 2,52644x^2$; $R^2 = 92,34$

Fases: antes e após estímulo pelo calor.

Discussão

Os parâmetros do desempenho produtivo não foram influenciados pelos níveis crescentes de triptofano industrial suplementados na ração ($P > 0,05$). Observou-se que a dieta basal contendo $8,6 \text{ g kg}^{-1}$ de triptofano da proteína já atendeu as exigências dietéticas da espécie. Resultado semelhante foi relatado por Santiago & Lovell (1988) utilizando dietas purificadas, que continham caseína, gelatina, proteína e aminoácidos sintéticos, estes autores determinaram 10 g kg^{-1} de triptofano da proteína, para um máximo ganho de peso para tilápia do Nilo. Segundo (Griffin *et al.* 1992) as rações purificadas são menos palatáveis que as rações práticas, tendo menor aceitabilidade pelos peixes, desta forma proporcionam redução no ganho de peso e eficiência alimentar, fato este que pode ter influenciado a exigência do aminoácido analisado.

Abidi & Khan (2010) avaliando alevinos de *Labeo rohita*, determinaram níveis de $9,0$ a $9,5 \text{ g kg}^{-1}$ de triptofano da proteína para melhor crescimento e utilização eficiente dos alimentos. Enquanto que Fagbenro & Nwanna (1999) determinaram 11 g kg^{-1} de triptofano da proteína para um bom desempenho, para o catfish africano (*Clarias gariepinus*).

Gaylord *et al.* (2005) testaram níveis de 10 a 14 g kg^{-1} de triptofano na dieta de *striped bass* híbridos (*Morone chrysops x M. saxatilis*) estimando níveis de 6 a 7 g Kg^{-1} de triptofano da proteína como ideais para melhor o ganho de peso e sobrevivência. Esses autores observaram que os peixes alimentados com a dieta basal obtiveram uma sobrevivência de 40% enquanto que os alimentados com as dietas contendo triptofano apresentaram sobrevivência em torno de 100% . No presente estudo não foi observado o efeito do triptofano sobre a sobrevivência dos peixes sendo que a dieta basal contendo $8,6 \text{ g kg}^{-1}$ de triptofano da proteína foi o suficiente para um desempenho satisfatório.

Resultados semelhantes ao do presente estudo para sobrevivência, foram observados por Coloso *et al.* (2004) que trabalharam com Asian sea bass (*Lates calcarifer*) e observaram que os níveis de triptofano não afetaram a sobrevivência, porém foi observado um ligeira redução na eficiência de crescimento e na alimentação em dietas deficientes de triptofano, estes autores determinaram $7,88 \text{ g kg}^{-1}$ de triptofano da proteína para melhor resposta para o crescimento e eficiência alimentar.

A exigência de triptofano para várias espécies de peixes tem sido relatada pela NRC (2011), com uma variação de 5 a 10 g kg^{-1} de triptofano da proteína. Estando o valor encontrado no presente estudo dentro da faixa relatada. As diferenças entre a exigência de triptofano

descrita dentre os peixes, está relacionada à idade da espécie, as variações dos parâmetros ambientais, bem como o hábito alimentar (Pezzato *et al.* 2004).

Não foi observado efeito dos níveis de triptofano ($P > 0,05$) sobre a composição centesimal e sobre a composição corporal dos aminoácidos (expresso em g/ 16g N) dos peixes inteiros. Já para retenção de aminoácidos foi observado efeito ($P < 0,05$) dos níveis de triptofano para histidina e para o triptofano. Para a histidina os peixes que receberam a dieta com 3,87 g kg^{-1} de triptofano da matéria seca obtiveram menor retenção de histidina. A maior retenção foi obtida para as dietas contendo 2,19 e 3,17 g kg^{-1} de triptofano da matéria seca. Contudo, não diferiu da dieta contendo 2,33 g kg^{-1} de triptofano da matéria seca. Já para o triptofano, foi observado que à medida que este aminoácido foi acrescentado na ração, a retenção do triptofano apresentou diminuição linear ($P > 0,05$). Resultados similares foram obtidos por Zhou *et al.* (2012) que avaliaram a exigência e o efeito da arginina sobre a imunidade de *Micropterus salmoides*, e observaram que a medida que a arginina foi acrescentada nas dietas, a retenção de arginina diminuiu.

Antes do período do desafio térmico não foi observado efeito dos níveis de triptofano ($P > 0,05$) sobre as variáveis hematológicas. Os resultados obtidos estão dentro da faixa de normalidade para a tilápia hígida, e encontram-se em concordância com os descritos por Hrubec *et al.* (2000), estes autores por sua vez, apresentaram, para a tilápia do Nilo, os seguintes valores sanguíneos normais: 1,91 a 2,83 $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, para os eritrócitos; 27% a 47%, para o hematócrito; 7,0 a 9,8 g dL^{-1} , para hemoglobina; 115 a 183 μ^3 , para o volume corpuscular médio, e 22 a 29 %, para a concentração de hemoglobina corpuscular média. Para tilápia do Nilo, mantida em sistema extensivo, Tavares-Dias & Faustino (1998), apresentaram valores de 1,73 a 4,83 $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, para eritrócitos; 23% a 41%, para hematócrito; 5,4 a 12,7 g dL^{-1} , para hemoglobina; 70,8 a 205,50 μ^3 , para o volume corpuscular médio, e 16,8% a 55,2% para a concentração de hemoglobina corpuscular média. A não influência dos níveis de triptofano sobre os parâmetros hematológicos pode estar associada a quantidades adequadas de aminoácidos nas dietas, portanto, suprindo a exigência nutricional e consequentemente mantendo o estado de higidez da espécie.

Após o desafio térmico foi observado efeito da temperatura ($P < 0,05$) somente para o volume corpuscular médio, sendo que este parâmetro apresentou-se elevado entre todos os tratamentos. O acréscimo desta variável sugere um aumento na capacidade de carreamento do oxigênio. De acordo com Houston & Murad (1995) a temperatura pode ativar a eritropoiese e a liberação de eritrócitos jovens dos compartimentos de estocagem, na tentativa de aumentar a demanda de oxigênio dentro dos tecidos (Lecklin & Nikinmaa 1998). Porém os eritrócitos

jovens são menos eficientes no transporte de oxigênio quando comparados aos eritrócitos mais velhos que já estão na corrente sanguínea, desta forma, o transporte de oxigênio é compensado pelo aumento do volume corpuscular médio (Feldman *et al.* 2000). A elevação do volume corpuscular médio foi igualmente descrito por Garcia *et al.* (2012), para tilápia do Nilo submetidas ao estímulo pelo calor e ao manejo de captura. No entanto, esses mesmos autores relataram redução na contagem total de eritrócitos e leucócitos.

No período anterior ao estímulo pelo calor não houve efeito das dietas contendo níveis crescentes de triptofano sobre série branca dos peixes. Ao se comparar os períodos (antes e após o estímulo pelo calor) observou-se que o estímulo pelo calor não promoveu alterações para o quadro leucocitário. Os valores de leucócitos encontrados estão dentro da faixa considerada normal para tilápia do Nilo. De acordo com a literatura as médias de leucócitos totais para tilápias sadias variam de 21600 a 154700 μL^{-1} no sangue (Hrubec *et al.* 2000). Bem como o número de trombócitos totais que permaneceram dentro da faixa considerada adequada para peixes hígidos. De acordo com Tavares-Dias & Moraes (2004) o número médio de trombócitos em teleósteos de água doce pode variar de 2.000 a 68.400 μL^{-1} de sangue. Resultados semelhantes ao deste trabalho foram reportados por esses mesmos autores, cujos valores encontrados foram 21366,10 a 48902,50 μL^{-1} de trombócitos. Não foram observadas alterações na contagem total desta variável mediante aos níveis de triptofano e ao estímulo pelo calor. Diminuição do número de leucócitos e linfócitos, denominada leucopenia e linfocitopenia, respectivamente, são efeitos de estresse descritos por vários autores (Falcon *et al.* 2008; Barton & Iwana; 1991; Fernandes Junior, 2008; Atwood *et al.* 2003) sendo um quadro característico de estresse em peixes, esse quadro é acompanhado pela diminuição dos linfócitos (linfopenia) com um aumento no percentual de neutrófilos (neutrofilia). No presente estudo, independente dos níveis de triptofano, as dietas ofertadas aos peixes podem ter determinado condições fisiológicas adequadas ao enfrentamento do estresse. Como foi demonstrado pela não alteração dos linfócitos, neutrófilos e monócitos após o desafio.

Em situação de estresse, a liberação de catecolaminas e cortisol causa constrição esplênica, aumento do fluxo sanguíneo e migração dos leucócitos, ocorrendo ainda, redução do número de células brancas totais e linfócitos, juntamente com prejuízo nas funções fagocitárias das células (Barton & Iwana, 1991; McDonald & Milligan, 1992). Noga (2006) associa estresse por temperatura e alteração da concentração de leucócitos, principalmente por afetar a osmorregulação dos peixes e resultar em hemoconcentração ou hemodiluição. Segundo Pickering (1985), a diminuição do número de linfócitos circulantes pode demonstrar importante ligação entre a resposta ao estresse e o surgimento de doenças devido à elevação do cortisol

plasmático. Igualmente, Pickering (1987) relatou que a queda de linfócitos pode estar relacionada com a capacidade do peixe de se defender contra agentes patógenos.

No presente estudo o leucograma demonstrou-se dentro da faixa considerada normal para tilápias em estado de higidez, não ocorrendo alterações dos parâmetros, tanto pelas dietas, como pelo desafio, provavelmente as rações estavam adequadas, e o estímulo pelo calor apenas, não foi o suficiente para causar um quadro de estresse aos peixes. Pode-se inferir que a temperatura na faixa do conforto antes ao estímulo pelo calor bem como as dietas garantiram resistências aos peixes, atenuando desta forma, um possível quadro estressante.

O efeito da interação entre os níveis de triptofano e as fases foi significativo ($P < 0,05$) tanto para glicose quanto para o cortisol. Os valores encontrados no presente estudo não são considerados elevados, podendo inferir que o desafio não gerou um quadro estressante para os animais. A ausência da elevação desses níveis após o estímulo pelo calor ocorreu em virtude da duração do agente estressor (sete dias), com consequente perda do pico. Igualmente ao ocorrido para o cortisol plasmático não foi possível determinar alterações nos níveis glicêmicos considerados elevados, provavelmente, isso não ocorreu em virtude da duração do estímulo estressor. Segundo Barton (2000) a concentração de glicose plasmática aumenta durante períodos curtos, para suprir a maior demanda energética em situações de estresse. A hiperglicemia é causada pelo aumento das catecolaminas e mantida pelos altos valores de cortisol, originada pela glicogenólise no fígado, sendo esta, importante resposta secundária ao estresse (Mommsen *et al.* 1999). Fato este que não foi observado no presente estudo, pois os valores considerados não elevados para o cortisol, não predominou hiperglicemia antes e após o desafio. Os valores de glicose plasmática do presente estudo estão dentro da faixa considerada normal para tilápias, de acordo com Hrubec *et al.* (2000) os valores considerados normais de glicose plasmática para tilápia do Nilo, variam de 39 a 96 mg dl⁻¹. Segundo Urbinati & Carneiro (2004) o perfil da resposta do cortisol é bastante variado até dentro de uma mesma espécie, o que pode ser observado no presente estudo. Wedemeyer *et al.* (1990) descreveram que os níveis plasmáticos de cortisol aumentam após alguns minutos em situações de estresse agudo, retornando aos níveis basais em uma hora. O mesmo não ocorre quando o peixe sofre estresse crônico, sendo que o nível de cortisol permanece elevado por um longo período.

Os valores de cortisol plasmáticos observados nesta pesquisa estão dentro da faixa considerada normal para peixes não estressados (Barton & Iwama, 1991). Falcon (2007) reportou resultados semelhantes ao deste estudo quando desafiou tilápias ao estresse por baixa temperatura. Esses autores relataram médias para o cortisol plasmático variando entre 2,99 a 14,30 mg dL⁻¹, no presente estudo os valores observados oscilaram entre 3,30 a 7,72 mg dL⁻¹.

Possivelmente a maior rusticidade da tilápia, e o tipo de estresse que de acordo com Sumpter (1997) pode provocar respostas distintas, sendo que a duração do estímulo aplicado bem como a permanência dos animais na fase de resistência incluindo ainda a rápida adaptação tenha influenciado na falta de resposta do cortisol.

Foi observado no presente estudo que $2,33 \text{ g kg}^{-1}$ do triptofano da dieta correspondente à relação triptofano: lisina de 0,157:1 foi o suficiente para atender as exigências da espécie e para manutenção da homeostase. O estímulo pelo calor não causou prejuízos no estado de saúde dos peixes.

Referências

Abidi, S.F., Khan, M. (2010) Dietary Tryptophan Requirement of Fingerling Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), Based on Growth and Body Composition. *J. World. Aquacult. Soc.*, v. 41, p. 700-709.

Alam, M. S., S. Teshima, S. Koshio, S. & Yokoyama, M. Ishikawa. (2003) Optimum dietary threonine level for juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Asian Fish. Scie.*, **16**, 175–184.

AOAC. (2000) Association of Official Analytical Chemists. Oficial methods of analysis of association of official analytical chemists. 17^{ed}. Arlington: **1, 2**.

Atwood, H.L., Tomasso, J.R., Weeb, K. & Gatlin III, D.M. (2003) Low – temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* : effects of environmental and dietary factors. *Aquac. Res.*, **34**, 241-251.

Barton, B.A. & Iwama, G.K. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of cortivosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.*, **1**, 3-26.

Barton, B. A. (2000) Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *North Am. J. Aquacult.*, **62**, 12-18.

Beyruth, Z., Mainardes-Pinto, C. S. R., Fusco, S. M., Faria, F. C., Silva, A. L. (2004) Utilização de alimentos naturais por *Oreochromis niloticus* em tanques de terra com arraçoamento. *B. Inst. Pesca.*, **30**, 9-24.

Borlongan, I. G, R. & Coloso, M. (1993) Requirements of juvenile milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) for essential amino acids. *J. Nutr.*, **123**, 125–132.

Coles, E.H. Função hepática. In Coles E.H(Ed). Patologia clínica veterinária. São Paulo. 1984.219p.

Coloso, R. M., Murillo-Gurrea, D. P., Borlongan, I. G., Catacutan, M. R. (2004) Tryptophan requirement of juvenile Asian sea bass *Lates calcarifer*. *J. Appl. Ichthyol.*, **20**, 43–47.

Collier, H.B. (1944) The standardization of blood haemoglobin determinations. Canadian Medical Association Journal, Vancouver. 552p.

Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M. & Gadd, D. (2002) The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish Biol.*, **61**, 493–531.

Fagbenro, O. A. & Nwanna, L. C. (1999) Dietary Tryptophan Requirement of the African Catfish, *Clarias gariepinus*. *J. Appl. Aquaculture*, **9**, 65 – 72.

Falcon, D.R., Barros, M.M., Pezzato, L.E. & Solarte, W.V.N., Guimarães, I.G. (2008) Leucograma da tilápia do Nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetidas ao estresse por baixa temperatura. *Cienc. Ani. Bras.*, **9**, 543-551.

FAO. Organización De Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, 2012. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf> Acesso em 28 out. 2012.

Feldman, B.F., Zinkl, J.G. & Jain, N.C. Schalm's Veterinary Hematology. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.

Fernandes Junior, A.C. Colina em rações para tilápia do Nilo: desempenho produtivo e respostas hematológicas antes e após o estímulo pelo frio. 2008. 45p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista – UNESP.

Garcia, F.; Schalch, S.H.C.; Onaka, E.M.; Fonseca, F.S. & Batista, M.P. (2012) Hematologia de tilápia-do-nilo alimentada com suplemento à base de algas frente a desafios de estresse agudo e crônico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **64**, 198-204.

Gaylord, T.G., Rawles, S.D. & Davis, K. B. (2005) Dietary tryptophan requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Aquac. Nutr.*, **11**, 367-374.

Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E. & Brosius, E. (1971) Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *Am. J. Clin. Pathol.*, **56**, 35-39.

Gomes, L.C., Chippari-Gomes, A.R., Lopes, N.P., Roubach, R. & Araujo-Lima, C.A.R. M. (2001) Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *J. World Aquacult. Soc.*, **32**, 426-431.

Griffin, M.E., Brown, P.B. & Grant, A.L. (1992) The dietary lysine requirement of juvenile hybrid striped bass. *J. Nutr.*, **22**, 1332-1337.

Harper, A. E., Benevenga, N. J. & R. M. Wohlhueter. (1970) Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Phys. Rev.*, **50**, 428-458.

Höglund, E., Balm, P. H. M. & Winberg, S. (2002) Stimulatory and inhibitory effects of 5-HT_{1A} receptors on adrenocorticotrophic hormone and cortisol secretion in a teleost fish, the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Neur. Letters*, **324**, 193-196.

Höglund, E., Bakke, M.J., Øverli, Ø., Winberg, S. & Nilsson, G.E. (2005) Suppression of aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by L-tryptophan supplementation. *Aquaculture*, **249**, 525-531.

Houston, A.H.; Murad, A. (1995) Erythrocytodynamics in fish – recovery of the goldfish *Carassius auratus* from acute anemia. *Can. J. Zool.*, **73**, 411-418.

Hrubec, T.C., Cardinale, J.L.; Smith, S.A. (2000) Haematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.*, **29**, 7-12.

Hseu, J.R., Lu, F.I., Su, H.M., Wang, L.S., Tsai, C.L. & Hwang, P.P. (2003) Effect of exogenous tryptophan on cannibalism, survival and growth in juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, **218**, 251–263.

Lecklin, T. & Nikinmaa, M. (1998) Erythropoiesis in arctic charr is not stimulated by anemia. *J. Fish Biol.*, **53**, 1169-117.

Lepage, O., Larson, E.T., Mayer, I., Winberg, S. (2005) Serotonin, but not melatonin, plays a role in shaping dominant-subordinate relationships and aggression in rainbow trout. *Horm. Behav.*, **48**, 233–242.

Lima, L.C., Ribeiro, L.P., Leite, R.C. & Melo, D.C. (2006). Estresse em peixes. *Bras. Reprod. Anim.*, **30**, 113-117.

Martins, M. L., Pilarsky, F., Onaka, M.E., Nomura, T.D. Fenerick, J., Ribeiro, K., Makoto, D., Myiazaki, Y., Castro, P.M. & Malheiros, E. B. (2004) Hematologia e resposta inflamatória aguda em *O. niloticus* submetidas aos estímulos único e consecutivos de estresse de captura. *B. Inst. Pesca.*, **30**, 71-80.

McDonald, D.G.; Milligan, C.L. (1992) Chemical properties of the blood. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. *Fish Physiology*. London: Academic Press, **12**, 55-133.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. & Moon, T.W. (2009) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *J. Fish Biol.*, **9**, 211- 268.

Noga, E.J. Fish Leukocyte Responses Chapter 61, p.433-439. In Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, C.N. *Shalm's Veterinary Hematology*. Blackwell Publishing, Fifth Edition, 2000. 1344p.

National Research Council. (2011) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. Washington, DC: The National Academies Press.

Ortega, V.A., Renner, K.J. & Bernier, N.J. (2005) Appetite-suppressing effects of ammonia exposure in rainbow trout associated with regional and temporal activation of brain monoaminergic and CRF systems. *J. Exp. Biol.*, **208**, 1855–1866.

Pezzato, L.E., Barros, M.M., Fracalossi, D.M. & Cyrino, J.E.P. Nutrição de peixes. In Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, M.M., Castagnolli, N. (Eds.). Editora TecArt. São Paulo. 2004.533p.

Pickering, A.D. & Pottinger, T.G. (1985) Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta*, to disease without reducing the white blood cell count. *J. Fish Biol.*, **27**, 611-619.

Pickering, A.D. Stress responses and disease resistance in farmed fish. In: Aqua Nor, 87, conference 3: Fish Disease – a threat to international fish farming industry. Trondheim : Norske Fiskeoppdretteres Forening, 1987. p.35-49.

Ranzani-Paiva, M.J.T., & Silva-Souza, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. Cap.4, p.89-120. In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M. Sanidade de Organismos Aquáticos. Ed. Varela, São Paulo, 2004. 426p.

Rostagno, H.S. (2011) *Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais* / editor: Horacio Santiago Rostagno. – 3. ed. – Viçosa, MG: UFV, DZO, 252p.

Rosenfeld, G. (1947) Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan.*, **20**, 329-334.

Santiago, B.C. & Lovell, R.T. (1988) Amino Acid Requirements for Growth of Nile Tilapia. *J. Nutr.*, 1539-1546.

SAS. User's Guide Statistics Version 9.1.3. 9.ed. Cary, NC: SAS Institute Inc, 2004

Schjolden, J., Pulma, K.G., Pottinger, T.G., Tottmar, O. & Winberg, S. (2006) Serotonergic characteristics of rainbow trout divergent in stress responsiveness. *Physiol. Behav.*, **87**, 938–947.

Sumpter, J.P. 1997 The endocrinology of stress. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P.; Schreck, C.B. *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge University Press, p. 95-117.

Tavares-Dias, M. & Faustino, C. D. (1998) Parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. *Ars Veterinária.*, **14**, 254-263.

Urbinati, E.C.; Carneiro, P.C.F. Práticas de Manejo e Estresse dos Peixes em Piscicultura Intensiva. In Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, M.M., Castagnolli, N. (Eds.). Editora TecArt. São Paulo. 2004.533p.

Watts, M., Munday, B.L. & Burke, C.M. (2002) Investigation of humoral immune factors from selected groups of southern bluefin tuna, *Tunnus maccoyii* (Castelnau): implications for aquaculture. *J. Fish Dis.*, **25**, 191-200.

Wedemeyer, G.A., Barton, B.A., Mcleay, D.J. Stress and acclimation. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. *Methods for fish biology*. Bethesda: American Fisheries Society, 1990. p.451-489.

Winberg, S. & Nilsson, G. E. (1993). Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress, with particular reference to fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106**, 597–614.

Winberg, S., Øverli, Ø. & Lepage, O. (2001) Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. *J. Exp. Biol.*, **204**, 3867–3876.

Wintrobe, M.M. (1934) Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Hematologica*, Leipzig, **51**, 32-49.

Zhou, H., Chen, N., Qiu, X., Zhao, M. & Jin, L. (2012) Arginine requirement and effect of arginine intake on immunity in largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquac. Nutr.*, **18**, 107 – 116.