UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
SABRINA VITÓRIA FERREIRA DA COSTA

FONTES ALTERNATIVAS DE ÁCIDOS GRAXOS NO METABOLISMO LIPÍDICO E FISIOLOGIA DO BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*)

MOGI DAS CRUZES, SP
2025

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
SABRINA VITÓRIA FERREIRA DA COSTA

FONTES ALTERNATIVAS DE ÁCIDOS GRAXOS NO METABOLISMO LIPÍDICO E FISIOLÓGICO DO BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Universidade de Mogi das Cruzes, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia aplicada a Recursos Naturais e Agronegócio.

Orientador: Dr. Bruno Cavalheiro Araújo

Coorientadora: Dr. Micheli Zaminham Hassemer

MOGI DAS CRUZES, SP

2025

FINANCIAMENTO





Ficha catalográfica
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

C838f

Costa, Sabrina Vitória Ferreira da
Fontes alternativas de ácidos graxos no metabolismo lipídico e fisiologia do bijupirá (Rachycentron canadum) / Sabrina Vitória Ferreira da Costas. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
66 f. : il.
Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
Orientação: Prof. Dr. Bruno Cavalheiro Araújo.
Coorientadora: Profa. Dra. Micheli Zaminham Hassemer

1. Bijupirá (Rachycentron canadum) 2. Peixes/metabolismo 3. Óleos vegetais 4. Aquicultura I. Araújo, Bruno Cavalheiro II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 639

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quatorze horas do dia vinte e oito de fevereiro de dois mil e vinte e cinco, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação intitulada: "FONTES ALTERNATIVAS DE ÁCIDOS GRAXOS NO METABOLISMO LIPÍDICO E FISIOLÓGICO DO BIJUPIRÁ (RACHYCENTROM CANADUM)", para obtenção do grau de mestre pelo(a) candidato(a) **Sabrina Vitória Ferreira da Costa**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 50 (cinquenta), a saber: 26 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de mestre. A comissão examinadora estava constituída dos senhores professores doutores: Bruno Cavalheiro Araújo, Alexandre Wagner Silva Hilsdorf e Denise Costa Arruda, da Universidade de Mogi das Cruzes, e os professores doutores Renato Massaaki Honji e Caio Augusto Perazza, da Universidade de São Paulo. Sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A sessão pública da defesa da dissertação foi aberta pelo senhor presidente da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Aprovada (aprovado(a) /reprovado(a)) por Unanimidade (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 28 de fevereiro de 2025.

Comissão Examinadora	Julgamento
Prof Dr Alexandre Wagner Silva Hilsdorf	Aprovada (aprovado(a) / reprovado(a))
Prof Dr. Renato Massaaki Honji	Aprovado (aprovado(a) / reprovado(a))
Prof. Dr Bruno Cavalheiro Araújo	Aprovado (aprovado(a) / reprovado(a))

AGRADECIMENTOS

Nessa trajetória de dois anos, gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador, Dr. Bruno Cavalheiro Araújo. Agradeço por aceitar o desafio de me orientar mesmo naquela altura do campeonato, por me proporcionar a oportunidade de desenvolver este projeto, pela confiança ao me permitir ajudar no início das atividades do laboratório LAFINUTRI (mesmo com todas as decorações talvez um pouco exageradas), pela paciência e, principalmente, por toda a orientação e até mesmo pelas "broncas". Expresso minha gratidão a nossa equipe do LAFINUTRI, à Drª. Micheli Zaminham Hassemer pela coorientação, por toda ajuda, ensinamentos, conselhos e parceria. Agradeço também à Júlia Sousa pela nossa amizade, apoio, auxílio e companhia no laboratório – fizemos um excelente trabalho juntas. Agradeço pela oportunidade de fazer parte desse grupo (que só está crescendo) desde o seu início.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes pela oportunidade e estrutura, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio e financiamento de bolsa (código 001) durante minha pesquisa de mestrado e também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio Jovem Pesquisador de processo nº 2022/10972-9, que mantém o nosso laboratório, possibilitando a realização de todas as demandas.

Minha gratidão se estende ao Professor Dr. Alexandre Hilsdorf, que, em um primeiro momento, aceitou me orientar em seu laboratório (LAGOAA), agradeço pelos ensinamentos e apoio. Faço um agradecimento também aos alunos e ex-alunos do LAGOAA, grupo do qual tive o prazer de fazer parte desde minha graduação, durante a iniciação científica e até metade do meu período de mestrado.

Aos meus coorientadores da iniciação científica no LAGOAA, Caio Perazza e Letícia Rafaela, sou imensamente grata por terem sido os primeiros a me guiar nesse "universo dos peixes". Obrigada pelos incentivos, ensinamentos, conselhos, puxões de orelha e, acima de tudo, por nossa amizade. A Letícia, faço um agradecimento especial: você me ensinou lições que vão muito além do acadêmico e que fazem parte de quem sou hoje. Agradeço por nunca ter desistido do meu potencial e por ter me compreendido até mesmo quando eu mesma não me entendia. Sempre guardarei um enorme carinho por você, obrigada por tanto! Ao Danilo Vitoriano, agradeço pela amizade, que esteve presente no laboratório, na vida pessoal, em nossos jogos e até mesmo nos negócios. Agradeço à Gabriela Carvalho pela amizade e companhia nas aulas e atividades do laboratório, à Letícia Ayana e à Claudiane Pinheiro pela

amizade, parceria e apoio, à Claudivane (Naninha) pela amizade e parceria durante nosso estágio docente e nas aulas, e à Laura, pela amizade e conexão no humor. Todos vocês tornaram minha passagem no LAGOAA algo especial. Guardarei com carinho nossas amizades e memórias. Não posso deixar de agradecer também a algumas amizades especiais, que estão comigo há anos e que compartilharam quase que diariamente a minha trajetória até aqui: Marianna Honda, Gabrielly Orra e Emily Passos. Vocês são amigas incríveis. Obrigada por tudo.

Quero também agradecer à minha família, em especial aos meus pais, que, apesar de não entenderem exatamente o meu trabalho acadêmico, sempre se orgulham em dizer: "Minha filha faz um trabalho de mestrado, é pesquisadora." Sou igualmente grata à minha prima Márcia, que é muito mais do que uma prima e sempre me ajudou e apoiou. Agradeço também aos meus irmãos, André e Fabiano, por sempre me apoiarem, ajudarem e me estimularem a chegar onde estou hoje. Especialmente, dedico este trabalho ao Fabiano, que quis ser biólogo quando jovem, mas deixou esse sonho de lado para que eu o realizasse. Fico feliz de ser motivo de orgulho para vocês.

Por último, mas com certeza não menos importante, agradeço ao meu namorado, Gabriel Sagaz, que, embora tenha me conhecido no meio dessa minha trajetória, com certeza me ajudou e apoiou muito nesse processo (principalmente com as gigantescas planilhas de dados do *Excel*). Obrigada por ser meu maior fã.

“Qual é a solução? Continue a nadar! Continue a nadar! Continue a nadar! Para achar a solução... nadar, nadar!”

– Dory, Procurando Nemo, 2003.

RESUMO

Rachycentron canadum, conhecido no Brasil como bijupirá e internacionalmente como *cobia*, é um peixe marinho com alto potencial produtivo. No entanto, existem desafios em seu ciclo produtivo, , que ainda limitam sua produção em larga escala no Brasil, em especial na nutrição. O óleo de peixe (OP) é amplamente utilizado na nutrição de animais marinhos, devido aos seus ácidos graxos (AG) de cadeia longa e altamente insaturados da série ômega 3 (*LC-PUFAs* n-3). Porém, a produção de OP está em declínio, e ingredientes alternativos em dietas para a aquicultura, como por exemplo os óleos vegetais (OV) vêm sendo pesquisados nos últimos anos. Contudo, essa substituição pode impactar de forma negativa o crescimento de peixes marinhos, alterando o metabolismo lipídico, devido principalmente às quantidades elevadas de AGs saturados (*SFA*), monoinsaturados (*MUFA*) e polinsaturados de 18 carbonos da série ômega 6 (*PUFA* n-6), e inversamente à ausência de *LC-PUFAs* considerados essenciais para espécies marinhas, como o ácido eicosapentaenoico (*EPA*), ácido docosahexaenoico (*DHA*) e o ácido araquidônico (*ARA*). Uma estratégia para minimizar os esses impactos é o uso de OVs suplementados com fontes ricas em *LC-PUFAs*. Com base no exposto, o objetivo desse trabalho foi testar diferentes níveis de inclusão do óleo de soja (OS) e de *LC-PUFAs* essenciais, como fonte lipídica alternativa em detrimento ao OP, em dietas para juvenis de bijupirá, e avaliar os efeitos desta substituição no desempenho produtivo, composição lipídica dos tecidos muscular e hepático, morfologia do tecido hepático e na expressão de genes relacionados às vias de síntese e oxidação de AGs do tecido hepático. Foi realizado um experimento nutricional de oito semanas utilizando quatro dietas isolipídicas, isoenergéticas e isoproteicas: OP (dieta controle, com 8,8% de OP como base lipídica), D1 (6% de OS), D2 (4,5% de OS) e D3 (3% de OS). As dietas experimentais (D1, D2 e D3) foram formuladas com a adição de 2% de óleo de coco (OC) e suplementadas com óleos ricos em ARA, EPA e DHA, cujos níveis aumentaram progressivamente entre os tratamentos. A inclusão de ARA foi de 0,1% na D1, 0,4% na D2 e 0,8% na D3, enquanto o EPA variou de 0,2% (D1) para 0,7% (D2) e 1,0% (D3). Já o DHA foi incorporado em 0,5% na D1, 1,2% na D2 e 2,0% na D3. Os resultados mostraram que o desempenho produtivo não foi afetado pelas diferentes dietas experimentais. Em comparação com os níveis dietéticos de AGs, os *SFAs* apresentaram um significativo menor percentual nos tecidos, enquanto *MUFAs*, *PUFAs* e *LC-PUFAs* tiveram deposição superior, exceto na dieta controle, onde *PUFAs* e *LC-PUFAs* foram menores. O percentual de *LC-PUFAs* no músculo acompanhou os níveis dietéticos, com exceção do *ARA* na dieta D3. Em especial o DHA teve seu maior nível de deposição na dieta D3, superando a dieta OP mesmo essa contendo os maiores percentuais deste AG. Essas observações à cerca do perfil de AGs sugere a ocorrência de um efeito poupador de AGs, devido a inclusão de *SFAs*, em especial o 12:0. A morfologia hepática revelou vacúolos lipídicos com maiores áreas em peixes alimentados com OP e D1, e vacúolos menores em D2 e D3. Por fim, a expressão dos genes relacionados ao metabolismo lipídico não apresentou alterações significativas entre os animais dos diferentes grupos experimentais. Conclui-se que o OS suplementado com *LC-PUFAs* essenciais pode substituir o OP em diferentes concentrações sem causar efeitos adversos na performance de crescimento e metabolismo lipídico de juvenis de bijupirá, e ainda, na dieta com maior nível de suplementação (D3) garantiu uma maior deposição de *LC-PUFAs* nos tecidos, em especial no muscular.

Palavras-chave: óleo de soja; *LC-PUFA*; ômega-3.

ABSTRACT

Rachycentron canadum, known as *bijupirá* in Brazil and cobia internationally, is a marine fish with high productive potential. However, there are challenges in its production cycle that still limit large-scale production in Brazil, especially in nutrition. Fish oil (FO) is widely used in marine animal nutrition due to its long-chain, highly unsaturated omega-3 fatty acids (LC-PUFAs n-3). However, the production of FO is declining, and alternative ingredients in aquaculture diets, such as vegetable oils (VO), have been researched in recent years. Nevertheless, this substitution can negatively impact the growth of marine fish by altering lipid metabolism, primarily due to the high amounts of saturated fatty acids (SFAs), monounsaturated fatty acids (MUFAs), and omega-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs n-6), and inversely due to the absence of LC-PUFAs, which are essential for marine species, such as eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), and arachidonic acid (ARA). One strategy to minimize these impacts is the use of VOs supplemented with sources rich in LC-PUFAs. Based on this, the aim of this study was to test different inclusion levels of soybean oil (SO) and essential LC-PUFAs as an alternative lipid source in place of FO, in diets for juvenile cobia, and to assess the effects of this substitution on productive performance, lipid composition of muscle and liver tissues, liver tissue morphology, and gene expression related to the synthesis and oxidation pathways of fatty acids in the liver tissue. A nutritional experiment lasting eight weeks was conducted using four isolipidic, isoenergetic, and isoproteic diets: FO (control diet, with 8.8% FO as the lipid base), D1 (6% SO), D2 (4.5% SO), and D3 (3% SO). The experimental diets (D1, D2, and D3) were formulated with the addition of 2% coconut oil (CO) and supplemented with oils rich in ARA, EPA, and DHA, with levels progressively increasing between treatments. The inclusion of ARA was 0.1% in D1, 0.4% in D2, and 0.8% in D3, while EPA ranged from 0.2% (D1) to 0.7% (D2) and 1.0% (D3). DHA was incorporated at 0.5% in D1, 1.2% in D2, and 2.0% in D3. The results showed that productive performance was not affected by the different experimental diets. Compared to dietary fatty acid levels, SFAs presented a significantly lower percentage in the tissues, while MUFAs, PUFAs, and LC-PUFAs showed higher deposition, except in the control diet, where PUFAs and LC-PUFAs were lower. The percentage of LC-PUFAs in muscle tissue followed the dietary levels, except for ARA in diet D3. Particularly, DHA had the highest deposition level in D3, surpassing the FO diet, even though it contained the highest percentage of this fatty acid. These observations regarding the fatty acid profile suggest a sparing effect on fatty acids due to the inclusion of SFAs, especially 12:0. Liver morphology revealed lipid vacuoles with larger areas in fish fed with FO and D1, and smaller vacuoles in D2 and D3. Finally, the expression of genes related to lipid metabolism showed no significant changes between the animals of the different experimental groups. It is concluded that SO supplemented with essential LC-PUFAs can replace FO at different concentrations without causing adverse effects on growth performance and lipid metabolism of juvenile cobia, and that the diet with the highest supplementation level (D3) ensured higher deposition of LC-PUFAs in the tissues, particularly in the muscle.

Keywords: Soybean oil; LC-PUFA; Omega-3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Relação entre a produção mundial oriunda da pesca e da aquicultura ao longo dos anos.....6
Figura 2 - Exemplar adulto de bijupirá (*Rachycentron canadum*).....7
Figura 3 - Mapa da distribuição mundial do bijupirá.....8
Figura 4 - Classificações de lipídios.....10
Figura 5 - Esquema das classificações de ácidos graxos com base em sua cadeia carbônica.13
Figura 6 - Mapa da lipogênese de ácidos graxos a partir de seus precursores.....15
Figura 7 - Extrusora experimental Ex-Micro®.....19
Figura 8 - Pellets de ração utilizados no experimento nutricional.....20
Figura 9 - Localização do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo.....22
Figura 10 - Estrutura utilizada durante o experimento.....23
Figura 11 - Lâminas histológicas do tecido hepático finalizadas.....27
Figura 12 - Expressão gênica relativa de genes relacionados ao metabolismo lipídico em juvenis de bijupirá.....37
Figura 13 - Deposição lipídica observada nos vacúolos dos hepatócitos de juvenis de bijupirá.....38
Figura 14 - Morfologia hepática ilustrando a deposição lipídica observada nos vacúolos dos hepatócitos de juvenis de bijupirá.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulação e composição proximal (%) das dietas experimentais.....20
Tabela 2 - Pares de primers utilizados durante a q-PCR.....25
Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos totais (%) das diferentes dietas experimentais.....27
Tabela 4 - Desempenho produtivo de juvenis de bijupirá alimentados com diferentes dietas experimentais.....28
Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos totais (%) do tecido muscular de juvenis de bijupirá alimentados com diferentes dietas experimentais.....22
Tabela 6 - Perfil de ácidos graxos totais (%) do tecido hepático de juvenis de bijupirá alimentados com diferentes dietas experimentais.....24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FP - Farinha de Peixe

OP - Óleo de peixe

ZEE - Zona econômica exclusiva

AG - Ácidos graxos

SFA - *Saturated Fatty Acids*

MUFA - *Monounsaturated Fatty Acids*

PUFA - *Polyunsaturated Fatty Acids*

LC-PUFA - *Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids*

C18 PUFA - *Polyunsaturated Fatty Acids with 18 carbons*

EPA - Ácido eicosapentaenoico, 20:5n-3

DHA - Ácido docosahexaenoico, 22:6n-3

ARA - Ácido araquidônico, 20:4n-6

n-3 - Ômega 3

18:3n-3 - Ácido linolênico

18:2n-6 - Ácido linoleico

n-6 - Ômega 6

OV - Óleo vegetal

OS - Óleo de soja

OC - Óleo de coco

RAS - *Recirculating Aquaculture System*

PI - Peso inicial

BI - Biomassa inicial

PF - Peso final

BF - Biomassa final

CR - Consumo de ração

GP - Ganho em Peso

GPD - Ganho em peso diário

CAA - Conversão Alimentar aparente

TCE - Taxa de Crescimento específico

IHS - Índice hepatossomático

IVS - Índice viscerossomático

SO - Sobrevivência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 6
1.1 AQUICULTURA 6
1.2 O BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*) 8
1.2.1 Cultivo do bijupirá 11
1.3 LIPÍDIOS 12
1.3.1 Lipídios na nutrição de peixes 13
1.3.2 Ácidos graxos 15
1.3.3 Ácidos graxos na nutrição de peixes 16
2. MÉTODOS 21
2.1 COMITÊ DE ÉTICA 21
2.2 DIETAS EXPERIMENTAIS 21
2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 24
2.3.1 Animais experimentais e estruturas 24
2.3.2 Experimento nutricional 25
2.4 ANÁLISES METABÓLICAS E MORFOLÓGICAS 26
2.4.1 Perfil de ácidos graxos 26
2.4.2 Análises histológicas 27
2.5 EXPRESSÃO GÊNICA 29
2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 31
3. RESULTADOS 31
3.1 LIPÍDEOS TOTAIS DAS DIETAS 31
3.2 DESEMPENHO PRODUTIVO 32
3.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS 33
3.4 EXPRESSÃO GÊNICA 37
3.5 MORFOLOGIA HEPÁTICA 40
4. DISCUSSÃO 41
5. CONCLUSÃO 50
REFERÊNCIAS 51

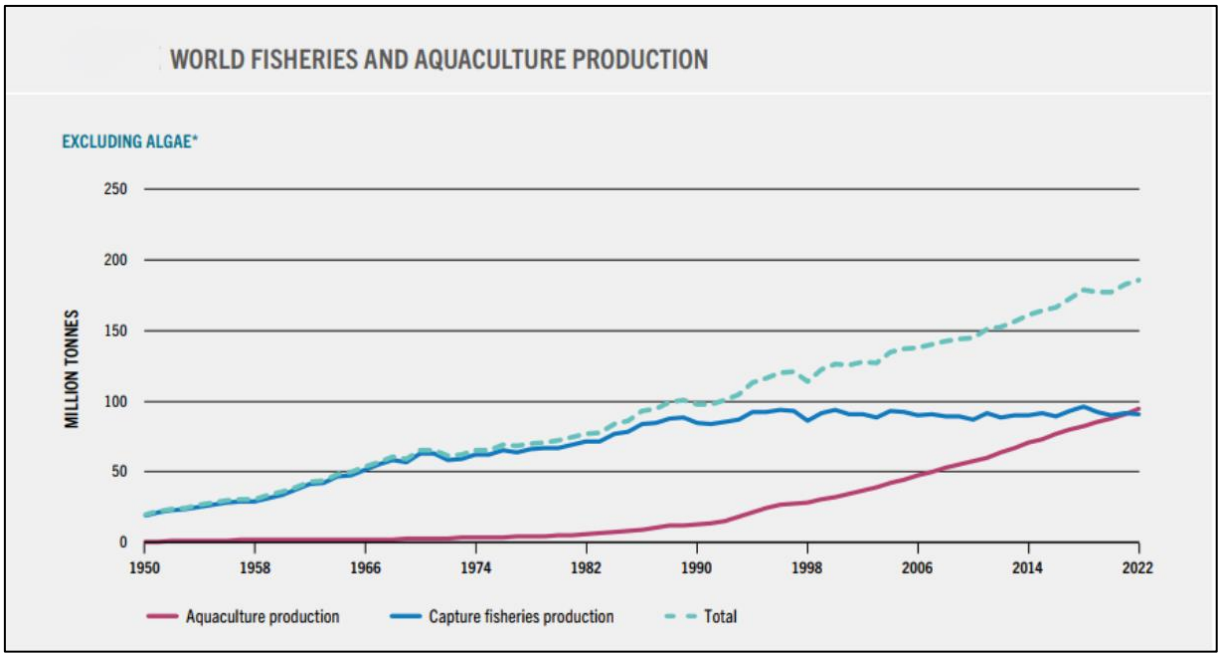
1 INTRODUÇÃO

1.1 AQUICULTURA

De acordo com a FAO (2024), a produção aquícola apresentou um expressivo crescimento nos últimos anos, atingindo um recorde em 2022, com um total de 223,2 milhões de toneladas. Desse volume, 185,4 milhões corresponderam a animais aquáticos e 37,8 milhões a algas. Dos animais aquáticos, 89% foram destinados ao consumo humano, resultando em um consumo estimado de 20,7 kg per capita no mesmo ano, enquanto o restante foi utilizado para fins não alimentares, principalmente na produção de farinha de peixe (FP) e óleo de peixe (OP).

Ainda segundo a FAO (2024), em países de baixa e média renda, o comércio líquido total de produtos da aquicultura (exportações menos importações) atingiu USD 45 bilhões, superando o valor de todos os outros produtos agrícolas combinados nesses países. A aquicultura continental respondeu por 62,6% da produção total, enquanto a aquicultura marinha e costeira contribuiu com 37,4%. Além disso, os produtos aquáticos estão entre as commodities alimentares mais comercializadas, envolvendo mais de 230 países e territórios. Desde 2020, a aquicultura cresceu 6,6%, sendo responsável por mais de 57% dos produtos animais aquáticos destinados ao consumo humano, enquanto a produção pesqueira oriunda da captura permanece estagnada há décadas (figura 1).

Figura 1. Relação entre a produção mundial oriunda da pesca e da aquicultura ao longo dos anos.



Fonte: FAO, 2024

No entanto, a aquicultura, especialmente a marinha, ainda está concentrada em um número reduzido de países, enquanto muitas nações de baixa renda na África, Ásia, América Latina e Caribe não aproveitam plenamente seu potencial produtivo (FAO, 2024). A FAO (2024) prevê um aumento na produção global, no consumo aparente e no comércio de pescado proveniente tanto da pesca quanto da aquicultura até 2032. De acordo com a projeção do órgão, a produção mundial de animais aquáticos deverá atingir 205 milhões de toneladas nesse ano, sendo 111 milhões de toneladas provenientes da aquicultura e 94 milhões de toneladas da pesca, representando um crescimento de 17% e 3%, respectivamente.

Apesar dos avanços e dados promissores, o setor ainda enfrenta grandes desafios. A FAO (2024) alerta para a necessidade de garantir que os estoques pesqueiros sejam colocados sob uma gestão eficaz, para reverter práticas insustentáveis. É essencial adotar uma abordagem ecossistêmica para minimizar os impactos ambientais, garantir a saúde animal e a segurança alimentar. Isso requer o uso eficiente, diversificado e sustentável de insumos e recursos, especialmente rações, ao mesmo tempo em que se busca aumentar os rendimentos e fortalecer os meios de subsistência. Assim ressaltamos a importância da aquicultura para o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável, garantindo dietas e oceanos saudáveis e produtivos de forma menos impactante (FAO, 2024).

De acordo com a Peixe BR (2024), a piscicultura brasileira está em constante desenvolvimento, com um crescimento médio anual de 5,32% nos últimos 10 anos. Em 2023, a produção de pescado cultivado no Brasil atingiu 887.029 toneladas, representando um

aumento de 3,1% em relação ao ano anterior. Esse volume é sustentado, principalmente, pela produção de tilápia (65,3% do total), seguida por espécies nativas dulcícolas (29,7%) e por outras espécies dulcícolas não nativas, como carpas, trutas e pangasius (5%). No Brasil, a piscicultura marinha teve seu início marcado no século XVII em Pernambuco (SILVA, 1976; CAVALLI; HAMILTON, 2007). De acordo com Von Ihering (1932), robalos (*Centropomus*), tainhas (*Mugil*) e carapebas (*Eugerres* e *Diapterus*) eram as principais espécies cultivadas em viveiros de maré em Pernambuco. Schubart (1936) estimou que, na década de 1930, esta região contava com 43 hectares de viveiros, que produziam anualmente 25 toneladas de peixes. No entanto, apesar desse início promissor, a produção comercial de peixes marinhos ainda é pouco difundida no Brasil, o crescimento do setor não progrediu e a produção é insuficiente até mesmo para integrar os dados estatísticos de produção aquícola (Peixe BR, 2024)

Apesar de ainda ser uma atividade incipiente e com um lento desenvolvimento, o nosso país dispõe de vastos recursos naturais, uma longa área costeira (8,5 mil km) com uma zona econômica exclusiva (ZEE) de aproximadamente duzentas milhas, e milhões de hectares de áreas estuarinas, além de um clima favorável ao cultivo de espécies tropicais (CAVALLI; DOMINGUES; HAMILTON, 2011). Contudo, o setor de produção aquícola marinho vem sendo impulsionado nos últimos anos por iniciativas de pesquisas que demonstram resultados promissores para o desenvolvimento do setor no Brasil e no mundo, apresentando uma expectativa de aumento para as próximas décadas (RODRIGUES, 2019; CAVALLI; DOMINGUES; HAMILTON, 2011).

1.2 O BIJUPIRÁ (*Rachycentron canadum*)

Rachycentron canadum, (figura 1) é uma espécie de teleósteo marinho, conhecido popularmente no Brasil como bijupirá (FIGUEIREDO; MENEZES, 1980) ou beijupirá (CARVALHO FILHO, 1999), enquanto na língua inglesa é conhecido como *cobia* (SHAFFER; NAKAMURA, 1989).

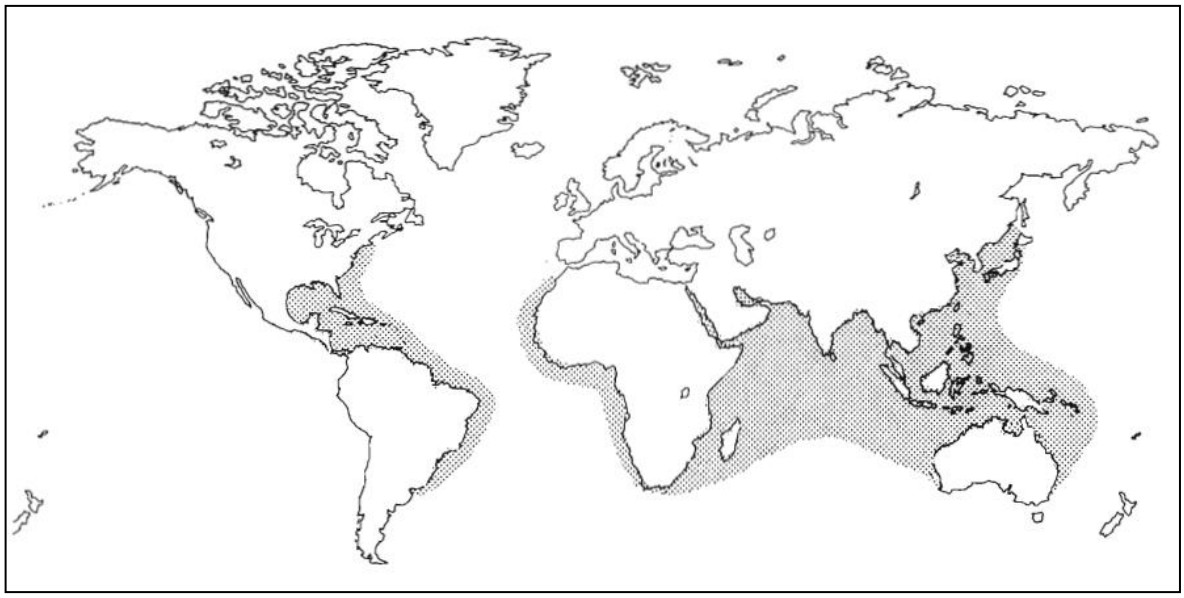
Figura 2. Exemplar adulto de bijupirá (*Rachycentron canadum*).



Fonte: WONG, 2018.

O bijupirá é da ordem dos Perciformes, sendo o único exemplar de sua família (Rachycentridae), é uma espécie tropical com ocorrência em todos os mares tropicais e subtropicais com exceção da região leste do Oceano Pacífico. No Atlântico ocidental, o bijupirá está presente em toda a região costeira, percorrendo desde Massachusetts nos Estados Unidos da América até a Argentina na América do Sul (figura 2) (SHAFFER; NAKAMURA, 1989; FIGUEIREDO; MENEZES, 1980). Segundo Chang (2003) a faixa de temperatura ideal para o cultivo de bijupirá é de 22 a 32°C, ainda, Shaffer e Nakamura (1989) afirmam que devido a essa limitação térmica, a sua distribuição em regiões frias dos oceanos é restrita aos meses mais quentes do ano.

Figura 3. Mapa da distribuição mundial do bijupirá.



Fonte: Shaffer e Nakamura 1989.

No ambiente natural, o bijupirá é geralmente encontrado sozinho ou em pequenos cardumes de aproximadamente 8 a 10 indivíduos (CARVALHO FILHO, 1999; SHAFFER; NAKAMURA 1989), com indivíduos podendo alcançar até dois metros de comprimento e atingir mais de 60kg, no entanto, exemplares com cerca de 110cm e em média 10kg são mais comumente observados (NELSON *et al*., 2016; SHAFFER; NAKAMURA 1989). O bijupirá é descrito como uma espécie pelágica (BRIGSS, 1960) e nerítica (BROWN-PETERSON *et al*., 2001), habitando regiões costeiras desde a superfície até 150 metros de profundidade. Geralmente, é encontrado sobre fundos rochosos, arenosos, de cascalho ou lama, além de habitats como recifes de corais e estuários (SHAFFER; NAKAMURA, 1989). Segundo Arnold, Kaiser e Holt (2002), frequentemente são avistados em naufrágios e plataformas de petróleo e acompanhando objetos à deriva ou mesmo outras espécies como meros (FELIX; HACKRADT, 2008), raias e tartarugas (GRANT; FERRELL, 1993). Os bijupirás foram descritos por Rohit e Bhat (2012) como predadores carnívoros generalistas e não seletivos, tendo sua dieta composta principalmente por peixes menores, crustáceos e moluscos. Os machos da espécie alcançam a maturidade sexual com cerca de 2 anos enquanto as fêmeas geralmente atingem a maturidade com cerca de 3 anos.

A espécie foi classificada como pouco preocupante (*LC*, do inglês *Least Concern*) pela *red list* da *International Union for Conservation of Nature* (*IUCN*) (COLLETTE *et al*., 2015), suas populações naturais são consideradas estáveis. Parte disso é devido ao bijupirá não ser um alvo direto da indústria pesqueira, uma vez que a espécie não possuí o hábito de formar cardumes como, dito anterioremnete (SHAFER; NAKAMURA, 1989). Sua alta taxa

de crescimento e elevado potencial de desova também colaboram com seu atual estado de conservação (COLLETTE *et al.*, 2015).

1.2.1 Cultivo do bijupirá

O bijupirá começou a ganhar destaque como uma espécie marinha com alto potencial produtivo no início da década de 60, quando foram publicados os primeiros estudos que exploraram indiretamente as características associadas a viabilidade do cultivo da espécie no futuro, como o comportamento de corte e desova no ambiente natural (BROWN-PETERSON *et al*., 2001; ARNOLD *et al*., 2002). Na década de 70 começaram a surgir os primeiros documentos que descreviam técnicas de cultivo do bijupirá (HASLLER; RAINVILLE, 1975). Ainda assim, pesquisas e estudos relacionados com a produção da espécie eram escassos, com a maioria dos trabalhos focados em outros temas relacionados principalmente com a biologia e fisiologia básica da espécie e sua pesca. Somente no início do século XXI, a produção do bijupirá começou a ser amplamente estudada nos mais variados temas, como por exemplo os aspectos da desova em cativeiro (FRANKS *et al*., 2001; ARNOLD *et al*., 2002), a disponibilidade de tecnologia básica de produção de alevinos (HOLT *et al*., 2007), a relativa tolerância às variações de salinidade (FAULK *et al*., 2007), sua resposta positiva à vacinação (LIN *et al*., 2006) e sua adaptabilidade ao confinamento e aceitação de dietas comerciais extrusadas (CRAIG *et al*., 2006).

A produção comercial do bijupirá teve seu início marcado principalmente nos países Asiáticos como China e Taiwan, e um dos seus principais marcos foi o estudo de Chang *et al*. (1997) a respeito de aspectos do cultivo da espécie na ilha Hsiao Liu Chio, no sudeste da China. Comparado com outras tradicionais espécies marinhas de cultivo como o salmão do atlântico (*Salmo salar*) e o robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), o cultivo do bijupirá é incipiente, com histórico de pouco mais de três décadas de produção no mundo (CAVALLI *et al*., 2011). No entanto, a produção em média/larga escala desta espécie já ocorre em alguns países, dos quais destacam-se Taiwan (LIAO *et al*., 2004), Estados Unidos da América (WEIRICH *et al*., 2004), Caribe e Ilhas Reunião (FAULK *et al*., 2007), enquanto outros países como Vietnam, Filipinas, China, Panamá, Bahamas, Belize, República Dominicana e México produzem em escala ainda reduzida (HOLT *et al*., 2007).

Atualmente a espécie é conhecida pelo seu alto potencial produtivo, devido a um conjunto de características favoráveis como seu rápido crescimento, podendo alcançar de 4-6 Kg em apenas um ano, e entre 8 e 10 kg após 16 meses (LIAO *et al*., 2004), possui uma excelente taxa de conversão alimentar (próxima de 1,5:1 de dieta por kg de peixe), alta

resistência às condições de cultivo, e uma carne branca com alto valor comercial do filé (LIAO; LEAÑO, 2007; CHOU et al., 2004; NUNES, 2014). Com base nessas características, Cavalli e Hamilton (2007) classificaram o bijupirá como uma espécie promissora para a piscicultura marinha no Brasil. No entanto, alguns desafios ainda impedem seu cultivo em larga escala e em nível comercial, como a ausência de uma legislação específica, os altos custos de produção e, principalmente, a falta de dietas específicas para a espécie e, de modo geral, para peixes marinhos.

Nos últimos anos alguns grupos de pesquisa realizaram estudos nutricionais com a espécie em colaboração com a indústria de produção de dietas. A maior parte destas pesquisas focaram principalmente na definição das exigências nutricionais da espécie para proteínas e aminoácidos (CHOU *et al.*, 2001; ZHOU *et al*., 2006; ZHOU *et al.*, 2007) com poucos estudos investigando a influência da composição das dietas no metabolismos lipídico (TRUSHENSKI *et al*., 2011; ARAÚJO *et al*., 2019; MARQUES *et al*., 2021), sendo este um tema primordial para melhor compreensão do metabolismo energético e consequentemente para melhorar a performance de crescimento e produtividade da espécie, a partir de formulações mais econômicas, estáveis e sustentáveis.

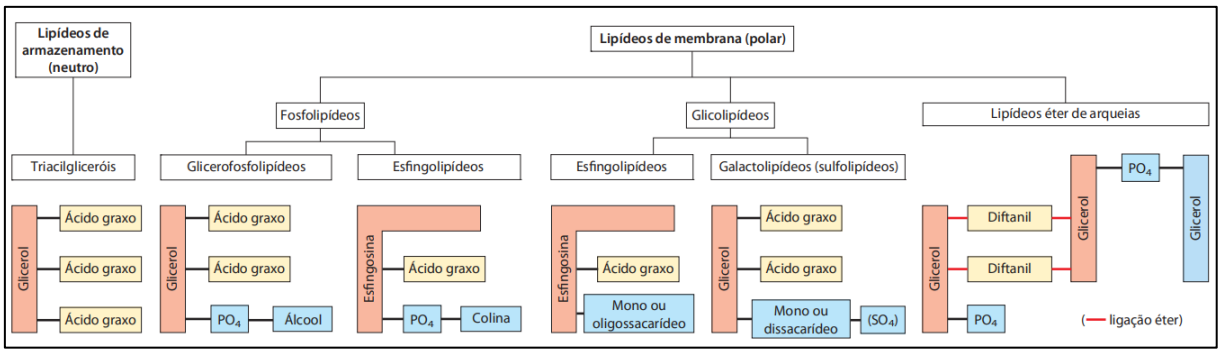
1.3 LIPÍDIOS

De forma geral os lipídeos compõem uma classe distinta de biomoléculas, compreendendo uma mistura de compostos que compartilham algumas propriedades estruturais em comum, com preponderância de grupos apolares. São classificados como compostos orgânicos que possuem como principal característica a sua baixa solubilidade em água e alta solubilidade em solventes orgânicos apolares como o clorofórmio, hexano e benzeno , além de serem constituídos por aproximadamente 90% de ácidos graxos (AG) (LEHNINGER, 2017; RIBEIRO *et al*., 2009). Os lipídeos estão distribuídos por todos os tecidos, e devido a sua insolubilidade em meio aquoso eles se encontram compartimentalizados nos líquidos corporais, estando associados a membranas celulares através de células de gorduras, denominadas adipócitos ou também associados as proteínas do plasma sanguíneo (LEHNINGER 2017; RIBEIRO *et al*., 2009)

Os lipídeos podem ser classificados em dois grupos principais, o primeiro consiste em compostos de cadeia aberta com grupos de cabeça polar e longas caudas apolares, esse grupo incluí os triacilgliceróis, os esfingolipídeos, os fosfoacilgliceróis e os glicolipídeos, enquanto o segundo grupo compreende compostos de anéis fundidos ou cadeia cíclicas, incluindo os esteroides (LEHNINGER, 2017). Ainda, podem ser classificados em lipídeos simples, que

são formados apenas por AGs e álcoois (glicerol, por exemplo), formando as gorduras e ceras, e os lipídeos complexos, que são formados por AGs, álcoois e outros componentes adicionais, como grupos fosfato, açúcares ou outros grupos polares, como por exemplo os fosfolipídios e glicolipídios (CHAMPE & HARVEY, 1997) (figura 3). Para simplificar a ampla classificação dessas moléculas, os lipídios vêm sendo definidos com base em seus principais constituintes, os AGs e seus derivados, bem como nas substâncias relacionadas ao metabolismo lipídico e às funções desses compostos (RODRIGUEZ *et al*., 2009)

Figura 4. Classificações das classes de lipídios.



Fonte: Lehninger, 2017.

1.3.1 Lipídios na nutrição de peixes

A nutrição lipídica começou a ganhar destaque como um fator essencial para a produção de peixes marinhos a partir da década de 1960, sendo que atualmente sabe-se que esses animais são capazes de metabolizar de forma muito eficiente esses compostos, com isso muitas exigências nutricionais para as principais espécies de cultivo já estão detalhadamente descritas na literatura (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Os lipídios desempenham um papel fundamental no metabolismo energético de peixes, e somados as proteínas são os principais macronutrientes presentes na dieta (e consequentemente em seus tecidos), enquanto os carboidratos são incorporados em menores quantidades, já que espécies marinhas carnívoras possuem uma limitação na metabolização desses nutrientes (TOCHER, 2003; ENES *et al*., 2009). Adicionalmente, os lipídios possuem ainda uma vantagem comparado as proteínas, visto que a metabolização das proteínas depende da quebra de fortes interações iônicas e ligações de hidrogênio, e a síntese de biomoléculas mediadas pela ação enzimática nessas vias são controladas exclusivamente pelo código genético do animal, o que resulta em uma alta especificidade nas reações que são catalisadas por essas enzimas. Por outro lado, a metabolização de lipídios depende da quebra

de forças de interação mais fracas, como as forças de *van der waals* e de dispersão, resultando em uma baixa especificidade nas reações catalisadas por suas enzimas. Assim, diferentemente das proteínas, a composição lipídica e de AGs nos tecidos não é definida apenas pela capacidade metabólica inerente a genética do animal, e pode ser alterada mediante outras variáveis, principalmente a composição da dieta. Além disso, os lipídios armazenam mais energia por volume em comparação às proteínas e aos carboidratos, fornecendo cerca de 9 kcal por grama, enquanto estes últimos fornecem aproximadamente 4 kcal por grama. Essa maior densidade energética se deve, em parte, à capacidade dos lipídios de armazenar energia de forma anidra (sem a presença de água), tornando-os o nutriente mais eficiente para a produção e obtenção de energia (MONTEIRO-TORREIRO, 1998; GLENCROSS, 2009; BUREAU *et al*., 2002). Sendo assim, os lipídios podem ser considerados componentes chave nas formulações de dietas para aquicultura, visando um melhor desempenho zootécnico, sanitário e qualidade do produto final (OLSEN, 2004).

Os lipídios desempenham um papel essencial no crescimento de organismos aquáticos, pois regulam o metabolismo energético por meio do chamado *protein sparing effect* (efeito poupador de proteínas). Nesse processo, os animais utilizam preferencialmente os lipídios como fonte de energia, preservando as proteínas para sua principal função: a construção muscular e o crescimento. No entanto, é fundamental manter um equilíbrio adequado entre as fontes proteicas e lipídicas, pois uma ingestão excessiva de lipídios pode levar ao acúmulo excessivo de gordura corporal, resultando em filés de menor qualidade, com alto teor de gordura. Além disso, o desequilíbrio nutricional pode causar problemas de saúde nos animais, como esteatose hepática (acúmulo de gordura no fígado) e enterites (inflamações intestinais) (NRC, 2011; CABALLERO *et al*., 2004).

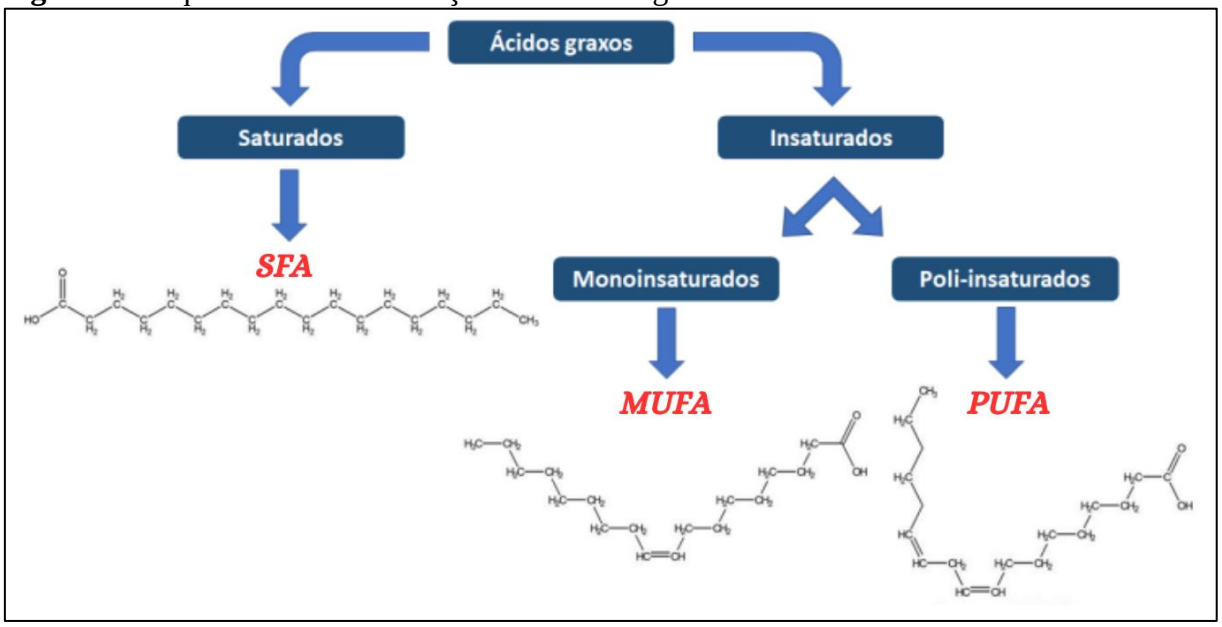
Além de sua importância como substrato energético, os lipídeos estão também relacionados com outras diversas funções fisiológicas imprescindíveis para o desenvolvimento de organismos aquáticos, como por exemplo, na manutenção, estruturação, permeabilidade e estabilidade das membranas celulares, já que estas são formadas por uma bicamada lipídica, sendo seus constituintes principalmente os fosfolipídios e seus AGs estruturais. Os fosfolipídios são um tipo de lipídio anfipático, ou seja, possuem uma região hidrofílica (a "cabeça" polar) e uma região hidrofóbica (a " cauda" apolar), compostas por moléculas de AGs. Devido a essa estrutura, ao entrarem em contato com um meio aquoso, eles se organizam espontaneamente em uma bicamada, na qual as cabeças polares ficam voltadas para o meio aquoso, enquanto as caudas hidrofóbicas se agrupam no interior, formando uma barreira que separa os meios intracelular e extracelular (LEHNINGER, 2017).

Adicionalmente os lipídios são moléculas precursoras de importantes hormônios, e outras moléculas bioativas como os eicosanoides e decosanoides, além de agirem como transportadores de nutrientes fisiologicamente relevantes como as vitaminas lipossolúveis (TOCHER, 2003).

1.3.2 Ácidos graxos

Os AGs são ácidos carboxílicos alifáticos com cadeias hidrocarbonadas e são considerados as unidades básicas dos lipídios. De modo geral, essas moléculas contêm entre 4 e 36 átomos de carbono ligados entre si, embora a maioria dos compostos encontrados na natureza apresente de 16 a 22 átomos de carbono. Elas estão presentes principalmente em gorduras e óleos e são caracterizadas por possuírem uma função ácida de natureza carboxílica e hidrófila, além de uma cadeia carbônica hidrófoba (MURRAY *et al*., 1994). Os AGs normalmente são classificados de acordo com o grau de saturação de suas cadeias , ou seja, se as ligações covalentes entre os átomos de carbono da cadeia são simples ou duplas. Se a cadeia hidrocarbonada não possui nenhuma dupla ligação, cada átomo de carbono está completamente "saturado" com o número máximo de átomos de hidrogênio possível, essa classe é conhecido como AGs saturados (*SFA*, do inglês *Saturated Fatty Acids*), quando ocorre apenas uma insaturação (dupla ligação) na cadeia, são denominados de AGs monoinsaturados (*MUFA*, do inglês *Monounsaturated Fatty Acids*), quando há duas ou mais insaturações são denominados AGs poli-insaturados (*PUFA*, do inglês *Polyunsaturated Fatty Acids*). Os *PUFAs* são ainda subdivididos em outra classe os AGs poli-insaturados de cadeia longa (*LC-PUFA*, do inglês *Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids*) com cadeias com 20 ou mais carbonos e duas ou mais insaturações (NELSON e COX, 2005; LEHNINGER 2017) (figura 4).

Figura 5. Esquema das classificações de ácidos graxos com base em sua cadeia carbônica



Fonte: Adaptado de ANVISA.

As propriedades físicas e as funções dos AGs são diretamente influenciadas pela estrutura de suas cadeias. Isso ocorre porque a presença de uma insaturação em um carbono causa uma "dobra" na cadeia. Dessa forma, os ácidos graxos saturados (*SFAs*) possuem cadeias lineares, enquanto os monoinsaturados (*MUFAs*) apresentam uma única dobra. Já os poli-insaturados (*PUFAs*) e os de cadeia longa (*LC-PUFAs*) possuem múltiplas dobras em sua estrutura (LEHNINGER, 2017). Além disso, de acordo com a união internacional de físicos e químicos aplicados (UIPAC), a fórmula de um AG é feita com base no número de carbonos da cadeia, o número de duplas ligações e a posição da primeira dupla ligação a partir da extremidade metil (CH_3) da cadeia, por exemplo, a fórmula abreviada 18:1n-9 indica um *MUFA* de 18 carbonos, que possui 1 dupla ligação localizada no carbono 9, enquanto a fórmula 16:0 representa um *SFA* de 16 carbonos que não possui nenhuma dupla ligação na sua cadeia (LEHNINGER, 2017)

Como dito anteriormente, os AGs são fundamentalmente importantes para nutrição de peixes já que essas moléculas são as unidades básicas que compõem um lipídio e constituem a maior fonte de energia para estes animais, além de desempenharem inúmeras funções fisiológicas e metabólicas de extrema importância (SARGENT, 1995; LEHNINGER, 2017).

1.3.3 Ácidos graxos na nutrição de peixes

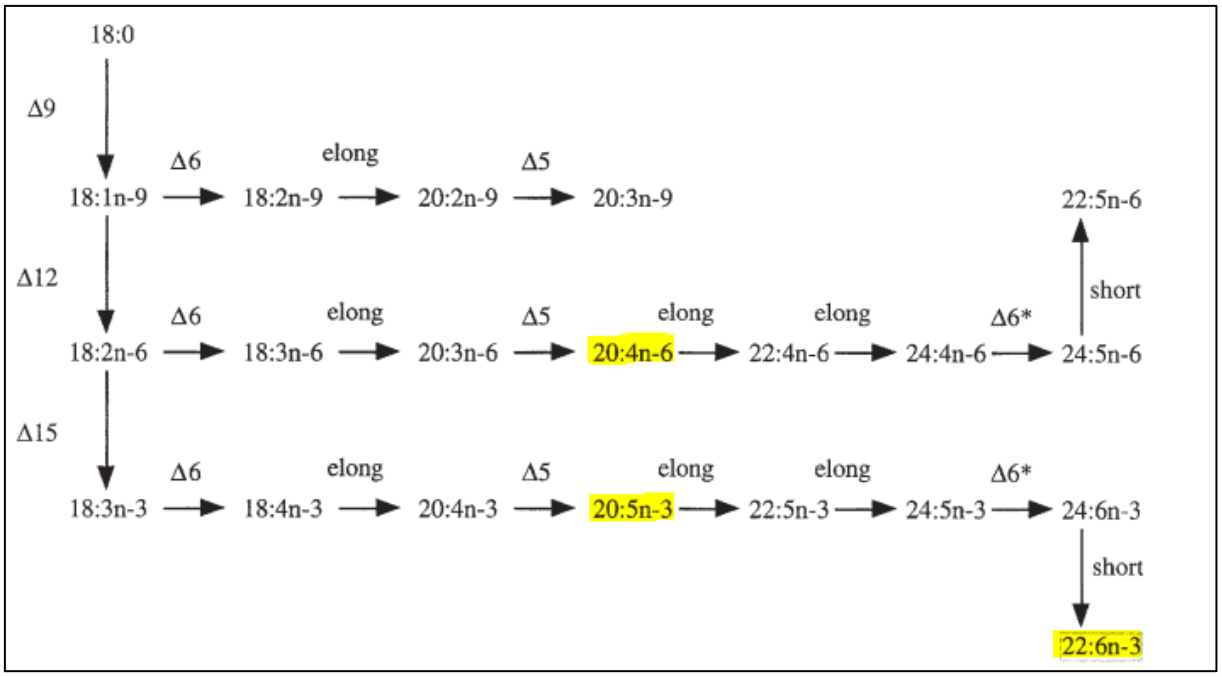
No ambiente dulciaquícola, a cadeia trófica tem como base as espécies de microalgas, alguns insetos, plantas e suas sementes, de modo que há uma grande diversidade de fontes de

AGs. Contudo, os *PUFAs* de 18 carbonos (C18 *PUFA*) são os mais predominantes, estando presentes em grandes quantidades na maioria das espécies, (principalmente o ácido linoleico, 18:2n-6), enquanto os *LC-PUFAs* como o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), ácido docosa-hexaenoico (DHA, 22:6 n-3) e o ácido araquidônico (ARA, 20:4 n-6) são menos representativos (AHLGREN *et al*., 2006; BRETT *et al*., 2009; SARGENT *et al*., 1989). No entanto, mesmo os peixes de água doce apresentam quantidades significativas de *LC-PUFAs* da série ômega 3 (n-3) em seus tecidos, principalmente o DHA e EPA (DE SILVA E ANDERSON, 1995). Isso em parte se deve ao fato de que, os peixes, assim como todos os organismos vivos, possuem a capacidade de sintetizar AGs *de novo*, como os *SFAs* 16:0 e 18:0, através da adição ou retirada de duas unidades de carbono, e posteriormente produzir *MUFAs* como os 16:1n7 e 18:1n-9 (RAWN, 1989; LEHNINGER, 2017).

Entretanto, nenhum vertebrado possui enzimas capazes de sintetizar os AGs alfa-linolênico (18:3n-3) e o ácido linoleico (18:2n-6) a partir de seu precursor (no caso o 18:1n-9). Sendo assim, a única forma de se obter esses *PUFAs* é através da dieta, fato que os caracteriza como AGs essenciais (TOCHER *et al*., 2003). Desse modo, os AGs 18:3n-3 e 18:2n-6, são caracterizados como precursores de outros AGs mais complexos, dando continuidade a síntese de AG cada vez mais longos e insaturados, no caso os *LC-PUFAs*. Essa síntese dos precursores em *LC-PUFAs* é mediada por dois grupos enzimáticos importantes, as dessaturases que aumentam os números de insaturações na molécula de AG, e as elongases que adicionam pares de carbonos na cadeia hidrocarbonados AG.

Sendo assim, o 18:2n-6 é o precursor do ARA, e o 18:3n-3 principal precursor do EPA, que por sua vez é o precursor de DHA, sendo este formado pela síntese inicial de 24:6n-3, seguida pela redução da molécula para 22:6n-3 (DHA) (SARGENT *et al*., 1989; TOCHER, 2003. Esse processo de síntese endógena de AG é conhecido como lipogênese, e para a maioria das espécies ocorre principalmente no fígado, e é catalisado pelo complexo multienzimático da sintetase de AGs citosólicos (gene *fas*) (TOCHER, 2003).

Figura 6. Mapa da lipogênese de ácidos graxos a partir de seus precursores, com ênfase no ARA (20:4n-6), DHA (22:6n-3) e EPA (20:5n-3).



Fonte: Tocher, 2003.

No entanto, no ambiente marinho, os produtores primários, compostos principalmente por algas unicelulares, apresentam um percentual de cerca de 50% de *LC-PUFAs* n-3 em sua biomassa, de modo que toda a cadeia trófica marinha é amplamente rica em AGs da série n-3, em particular o EPA e o DHA, e em menor escala o ARA, um importante ômega 6 (n-6) que também está presente nos produtores primários.

Como a cadeia marinha primária é rica nestes *LC-PUFAs*, eles são repassados até os animais de topo de cadeia, portanto naturalmente todo o ambiente marinho é rico nestes AGs (DE SILVA E ANDERSON, 1995). A alta disponibilidade de *LC-PUFAS* n-3 no ambiente marinho, em conjunto com a baixa quantidade dos C18 *PUFAs*, resultou evolutivamente em uma redução do potencial enzimático das enzimas que agem na síntese deste grupo de AGs, principalmente das enzimas dessaturases e elongases, visto que fisiologicamente não se fazia necessário a biossíntese dos C18 *PUFAs* em *LC-PUFAs* devido a sua abundância no meio (MOURENTE E TOCHER, 1993; SARGENT *et al*., 1989). Desse modo, diferente dos peixes dulcícolas e demais vertebrados, para os peixes marinhos os AGs DHA, EPA e ARA são considerados essenciais, já que só podem ser obtidos através da alimentação (WATANABE, 1993; BELL E SARGENT, 2003)

Diante do exposto, um dos principais limitantes para um maior crescimento e desenvolvimento da piscicultura marinha é a produção e disponibilidade de dietas específicas que atendam às exigências nutricionais das espécies-alvo. Sabe-se que as dietas para organismos marinhos são elaboradas utilizando-se majoritariamente óleo de peixe (OP) como

a principal fonte lipídica e consequentemente de *LC-PUFAs* essenciais, portanto o emprego de OP na nutrição de animais marinhos está diretamente relacionado com a elevada necessidade nutricional destes animais por estes ácidos graxos (TELES *et al.,* 2015). No entanto, a oferta de OP no mercado está cada vez mais limitada, devido principalmente ao fato desse ingrediente ser oriundo da captura de peixes marinhos, influenciando em uma redução abrupta dos estoques naturais. Adicionalmente, a produtividade da pesca direcionada para a produção de OP está estagnada a mais de três décadas, ou seja, é inviável manter um setor em amplo crescimento utilizando ingredientes com disponibilidade limitada (NORDAHL, 2011; FAO, 2024).

Outra desvantagem da utilização de OP produzido a partir dos estoques naturais, é a variabilidade composicional do produto final, influenciado por diversos fatores como particularidades entre as espécies capturadas, fenômenos climáticos (por exemplo *La niña* e *El niño*) e métodos de processamento, dificultando a produção de dietas para aquicultura com composição estável. Sendo assim, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de substituir o OP nas dietas de animais marinhos por fontes lipídicas alternativas que apresentem menor custo e maior disponibilidade no mercado como por exemplo, os óleos vegetais (OV) (ARAÚJO *et al.,* 2016; 2019; ROMBENSO *et al.,* 2015, 2016).

Uma das principais dificuldades no processo de substituição do OP por fontes alternativas consiste em encontrar fontes que atendam às necessidades nutricionais dos animais, principalmente relacionadas com os níveis de *LC-PUFAs*. Dentre os OV, o óleo de soja (OS) é o que apresenta menor custo e produção em larga escala no Brasil, sendo amplamente empregado na elaboração de dietas principalmente para peixes dulcícolas. Esse ingrediente apresenta em sua composição 19 a 30% de ácido oleico (18:1n-9), 44 a 62% de ácido linoleico (LA, 18:2n-6), principal representante da série de AGs n-6, e 4 a 11% de ácido linolênico (18:3n-3), principal representante da série n-3 (CECCHI *et al.,* 2010). Apesar de ser uma ótima alternativa para peixes dulciaquícolas, esse alto teor de 18:2n-6 e a ausência dos de *LC-PUFAs*, principalmente EPA, DHA e ARA, podem impactar negativamente o metabolismo lipídico de peixes marinhos, reduzindo o crescimento, sobrevivência e comumente resultando em quadros severos de esteatose hepática e enterites (WENG *et al.,* 2011; PENG *et al.,* 2014).

Reforçando essa hipótese, estudos testando dietas com níveis elevados de OS mostraram que este ingrediente resultou em queda de desempenho de crescimento, e negativamente impactou a imunidade, além de favorecer o acúmulo de lipídeos no fígado em juvenis de *Larimichthys crocea* (DU *et al.,* 2017), *Argyrosomus regius* (EMRE *et al.,* 2016) e

Lateolabrax japonicus (XU *et al.*, 2015). Um quadro mais severo foi observado em dietas que testaram a substituição total do OP pelo OS, como redução do crescimento, acompanhada por diminuição da atividade antioxidante, induzindo às respostas inflamatórias em *Larimichthys crocea* (MU *et al.*, 2018; TAN *et al.*, 2019). Em contrapartida, quando a substituição OP pelo OS foi parcial, não foram observados efeitos adversos no desempenho produtivo e na sanidade de juvenis de *Micropterus salomoides* (CHEN *et al.*, 2020), *Argyrosomus regius* (EMRE *et al.*, 2016), *Cynoscion parvipinnis* (GONZÁLEZ-FÉLIX *et al.*, 2016) e *Singanus canaliculatus* (XU *et al.*, 2012). Uma forma de minimizar esses efeitos negativos, é a suplementação da carga lipídica baseada no uso do OS com ingredientes ricos em *LC-PUFAs*, como por exemplo óleos concentrados de algas marinhas. Portanto, pesquisas específicas considerando a espécie e fase de vida são imprescindíveis para melhorar a performance de crescimento, mitigando os efeitos negativos da substituição do OP pelo OS.

Outro fator limitante da substituição de OP por OV em dietas para peixes marinhos está relacionado com a qualidade do produto final (pescado). A composição corporal dos peixes é normalmente um reflexo fiel da dieta consumida, e o excesso de AGs, especialmente 18:2n-6 oriundo de fontes vegetais, pode alterar o metabolismo lipídico, causando um desbalanço na razão de n-3/n-6 na musculatura dos animais (OGORI, 2020). Além disso, o acúmulo excessivo de gordura no fígado, devido alterações da razão dos AGs, pode resultar em severa esteatose hepática, caracterizada por um acúmulo anormal de triglicérides nos hepatócitos como mencionado anteriormente. Sendo assim, faz-se necessário testar e definir níveis adequados da substituição total ou parcial do OP por OV, com a finalidade de produzir dietas específicas que maximizem o crescimento e mantenha o estado de higidez dos animais (GLENCROSS, 2009; TURCHINI *et al*., 2009). Adicionalmente, estas dietas devem assegurar o perfil de AGs, não alterando a razão de n-6 e n-3 na parte consumível do animal (filé), visto que o consumo de alimentos ricos em EPA e DHA, presentes principalmente em peixes marinhos, promove benefícios para saúde humana, atuando na prevenção e tratamento de diversas doenças cardiovasculares e imunológicas (RAATZ & BIBUS, 2016; GUESNET & ALESSANDRI, 2011).

Diante do exposto, a principal hipótese deste estudo é que, dietas formuladas com diferentes níveis de inclusão do OS e devidamente suplementadas com *LC-PUFAs* essenciais para peixes marinhos, podem substituir o OP em dietas para juvenis de bijupirá. Sem comprometer de forma negativa o metabolismo lipídico, a fisiologia e o desempenho produtivo da espécie, isto com base em estudos que já demonstraram resultados semelhantes com outras espécies marinhas.

2. MÉTODOS

2.1 COMITÊ DE ÉTICA

Todas as atividades conduzidas com os animais experimentais e tecidos biológicos foram avaliadas, aprovadas e estão de acordo com as regras da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Mogi das Cruzes (CEUA n◦ 008/2017).

2.2 DIETAS EXPERIMENTAIS

As dietas foram produzidas no Laboratório de Nutrição de Peixes, no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo. Foi elaborada uma dieta basal, com baixo conteúdo lipídico, utilizando como base FP e de aves desengorduradas com três lavagens de hexano, para garantir que não haveria nenhuma interferência da carga lipídica destes ingredientes nas dietas experimentais. Os ingredientes foram moídos em moinho tipo martelo com peneira de 0,3 milímetros de diâmetro. Posteriormente, os ingredientes moídos, foram homogeneizados em misturador do modelo em Y por aproximadamente oito minutos até que todos os macro-ingredientes e micro-ingredientes fossem totalmente homogeneizados.

Após esse processo as dietas foram processadas por extrusão utilizando uma extrusora (extrusora Ex-Micro®) experimental (figura 7), com pellets com tamanhos de 4 mm de diâmetro (figura 8), compatíveis com a fase de desenvolvimento dos peixes. Em seguida, os pellets foram secos em estufas com ventilação forçada a 55°C por 24 horas. Após a produção das dietas, os diferentes óleos experimentais concentrados em DHA, EPA e ARA foram incorporados por técnica de *vacuum coating* descrita por (LAMICHHANE *et al*., 2015) respeitando as exigências nutricionais básicas descritas para a espécie (FRASER *et al.,* 2009; TRUSHENSKI *et al*., 2011; ARAÚJO *et al*., 2019).

Figura 7. Extrusora experimental Ex-Micro®.



Figura 8. Pellets de ração utilizados no experimento nutricional.



A dieta controle (OP) foi constituída pela inclusão de 8,8% de OP e nas demais dietas foi feita a inclusão também de 8,8% de óleo, porém de fontes alternativas, a principal sendo o óleo de soja (OS) e como complemento o óleo de coco (OC):

- **Dieta 1** = (D1) foi composta pela inclusão de 2% de óleo de coco, 6% de óleo de soja e 0,2, 0,5 e 0,1% de extratos de EPA, DHA e ARA respectivamente;
- **Dieta 2** = (D2) foi composta por 2% de óleo de coco, 4,5% de óleo de soja e 0,7, 1,2 e 0,4% de extratos de EPA, DHA e ARA respectivamente;
- **Dieta 3** = (D3) constituída por 2% de óleo de coco e 3% de óleo de soja e 1,0, 2,0 e 0,8% de extratos de EPA, DHA e ARA respectivamente.

Os níveis fixos de OC incluídos nas dietas em conjunto com o OS garante que haja um percentual de *SFAs* equivalente ao presente na dieta a base de OP, para que as proporções das classes de AGs não fiquem desbalanceadas entre as diferentes dietas experimentais, (SCHONFELD E WOJTCZAK, 2016; NELSON E COX, 2018; MARQUES *et al*., 2021). Todas as dietas foram formuladas para serem isolipídicas, isoproteicas e isoenergéticas, a formulação dietética completa dos quatro tratamentos está descrita na tabela 1.

Tabela 1. Formulação e composição proximal (%) das dietas experimentais.

	Dietas (%)			
Ingredientes (%)	**OP**	**D1**	**D2**	**D3**
Farinha de peixe [1]	25,0	25,0	25,0	25,0
Farinha de aves	30,0	30,0	30,0	30,0
Farinha de lula	7,8	7,8	7,8	7,8
Tapioca	8,0	8,0	8,0	8,0
Hemoglobina	3,0	3,0	3,0	3,0
Farinha de trigo	13	13	13	13
Premix Min. Vit[2].	2,8	2,8	2,8	2,8
Vitamina C	1,0	1,0	1,0	1,0
Taurina	0,5	0,5	0,5	0,5
Benzoato de Sódio	0,01	0,01	0,01	0,01
BHT[3]	0,1	0,1	0,1	0,1
Óleo de peixe [4]	8,8	-	-	-
Óleo de coco [5]	-	2,0	2,0	2,0
Óleo de soja [6]	-	6,0	4,5	3,0
EPA 40%[7]	-	0,2	0,7	1,0
DHA 50%[8]	-	0,5	1,2	2,0
ARA 40%[9]	-	0,1	0,4	0,8
Composição centesimal (%)				
Umidade	7,50	6,47	6,66	7,59
Proteína bruta	42,39	40,82	41,54	41,50

Lipídeo bruto	8,48	8,65	7,86	8,17
Matéria mineral	19,44	19,08	19,32	18,02

[1]Farinha de peixe (desengordurada com hexano);

[2]Níveis de garantia por kg do produto – Premix (Nutricon Ltda-Me, São Paulo, Brasil): Vitamina A, 2.5MIU; vitamina D3, 0,25 MIU; vitamina E, 16,7 g; vitamina K3, 1,7 g; vitamina B1, 2,5 g; vitamina B2, 4,2 g; vitamina B3, 25 g; vitamina B5, 8,3g; vitamina B6, 2,0 g; vitamina B9, 0,8g; vitamin B12, 0,005 g; biotin, 0,17 g; vitaminaC, 75 g; colina, 166,7 g; inositol, 58s3 g; ethoxyquin, 20,8 g; cobre, 2,5 g; Ferro, 10,0 g; magnésio, 16.6 g; manganês, 15,0 g; zinco, 25,0 g.

[3]BHT – Hidroxitolueno butilado; Stay C – Vitamina C. [1]Phosphotech; [2]Incromega; [3]Jiangsu;

[4]Óleo de peixe de origem da América do Sul;

[5]Copra Indústria Alimentícia Ltda., Alagoas, Brasil;

[6]Cocamar (Cooperativa Agroindustrial), Maringá, Brasil;

[7]Óleo concentrado em EPA (> EPA 45%), Phosphotech Laboratories, ZAC de la Lorie, France.

[8]Óleo concentrado em DHA Incromega™ DHA 500 TG (> 50%DHA), CRODA™, Snaith, East Yorkshire, UK.

[9]Óleo concentrado em ARA (> 40% ARA), Jangsu Tiankai Biotechnology Co., Ltd., Nanjing, China.

2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

2.3.1 Animais experimentais e estruturas

O experimento nutricional foi conduzido no Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar – USP), localizado no município de São Sebastião no litoral norte do estado de São Paulo (figuras 9 e 10).

Figura 9. Localização do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo.

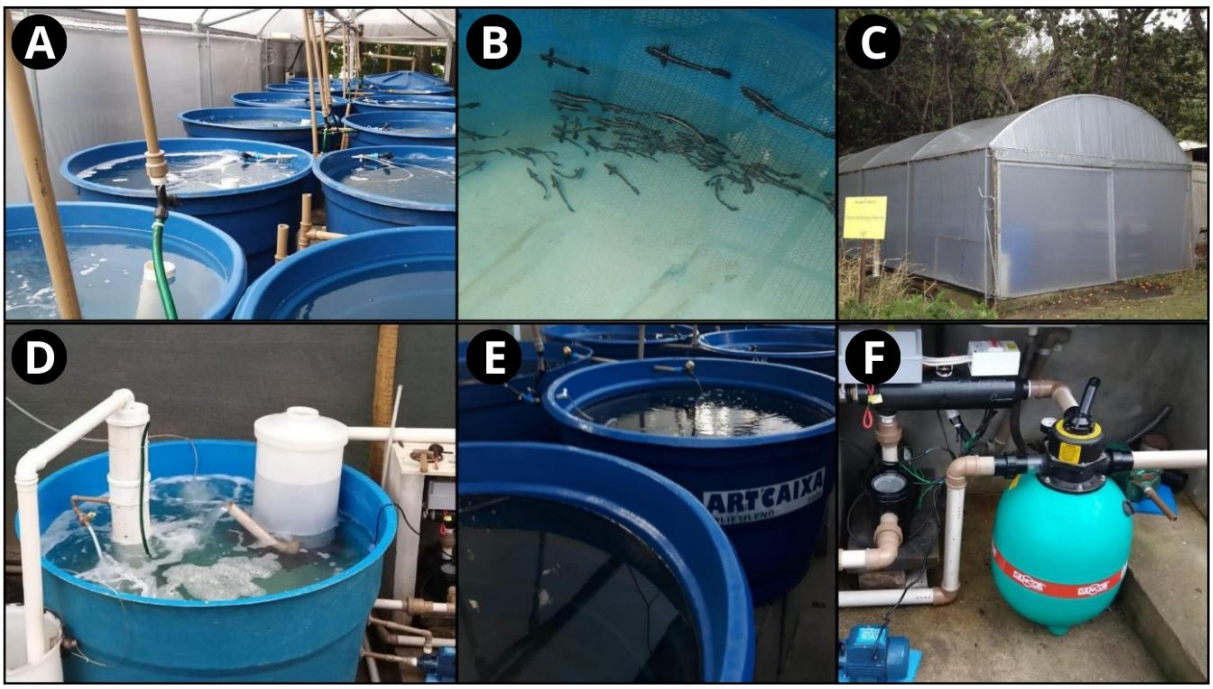


Os animais foram adquiridos da empresa Redemar Alevinos, localizada na cidade de Ilha Bela, também no litoral Norte no estado de São Paulo. Foram mantidos em um tanque

com volume de $10m^3$ por um período de 15 dias, para garantir a aclimatação dos mesmos, e foram alimentados duas vezes ao dia (8h00 e 17h00), até a saciedade aparente. Após essa etapa os peixes foram selecionados, medidos e pesados para que tivessem um tamanho homogêneo para formação dos lotes iniciais para dar início ao teste nutricional. Os parâmetros de qualidade da água como oxigênio dissolvido (5,42 mg. L^{-1}) e temperatura (27±1,2°C) foram aferidos diariamente.

Durante o período de aclimatação dos animais foi fornecida uma dieta base, suplementada com OP em percentuais similares às rações comerciais para peixes marinhos (45% proteína bruta; 12% lipídios totais). O experimento nutricional foi realizado em um sistema fechado (figura 11) de recirculação de água (RAS, do inglês *Recirculating Aquaculture System*) composto por 12 tanques de 500L cada, e equipados com bomba de circulação, filtros mecânico e biológico, luz ultravioleta, aquecedor de passagem e *skimmer* de proteína.

Figura 10. Estrutura utilizada durante o experimento.



A) Sistemas de tanques; **B)** Juvenis de bijupirá; **C)** Estufa; **D)** Sistema de filtragem; **E)** Tanques; **F)** Bomba de circulação.

2.3.2 Experimento nutricional

Os animais foram selecionados de acordo com o média de massa, e posteriormente foram transferidos para o *RAS*. Cada unidade experimental (tanque), foi composta por 18

peixes e a temperatura foi mantida em 28°C ± 1,2 ºC durante todo o período experimental. Dez animais do grupo do estoque inicial de peixes foram anestesiados, utilizando benzocaína (100mg. L^{-1}) e eutanasiados com um corte na medula espinhal, para coleta do tecido hepático e muscular, que foram congelados em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer (-80°C) até o momento das análises. Para as análises histológicas, amostras do tecido hepático foram coletadas e fixadas em formalina tamponada por 24 horas, logo após, foram transferidas para etanol a 70% até a realização das análises.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia (8h00 e 17h00) até a aparente saciedade, com as respectivas dietas experimentais por um período de oito semanas (56 dias). As dietas foram pesadas para o cálculo de consumo por unidade experimental e a pesagem foi realizada antes e após o arraçoamento. Ao final do experimento, três animais de cada tanque, totalizando nove animais por tratamento, da mesma forma que os animais inicialmente amostrados, foram anestesiados e eutanasiados para coleta dos tecidos para posterior realização das análises moleculares, metabólicas e histológicas. Para o desempenho produtivo foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Massa inicial (MI): Massa individual em gramas inicial;
- Biomassa inicial (BI): Soma inicial da massa de todos os indivíduos do tanque;
- Massa final (MF): Massa individual em gramas final;
- Biomassa final (BF): Soma final da massa de todos os indivíduos do tanque;
- Consumo de ração (CR): Peso ofertado–peso consumido;
- Ganho em massa (GM): Massa final–massa inicial;
- Ganho em massa diário (GMD): (massa final–massa inicial) /número de dias de experimento;
- Conversão Alimentar aparente (CAA): Consumo de ração/ganho de massa;
- Taxa de Crescimento específico (TCE): (% dia-1) = 100 x (massa final–massa inicial) /dias);
- Índice hepatossomático (IHS): 100 x (massa do fígado/massa corporal total);
- Índice viscerossomático (IVS): 100 x (massa das vísceras/massa corporal total);
- Sobrevivência (SO): 100x (número de peixes final/número de peixes inicial).

2.4 ANÁLISES METABÓLICAS E MORFOLÓGICAS

2.4.1 Perfil de ácidos graxos

A extração dos lipídios totais das dietas experimentais e dos tecidos coletados foi realizada com uma mistura de clorofórmio: metanol: água (2:1:0,5) (FOLCH *et al*., 1957) e os mesmos quantificados pelo método colorimétrico de Frings *et al*., (1972). O produto lipídico dos tecidos coletados foram metilados utilizando cloreto de acetila (5% de HCl em metanol) (CHRISTIE, 2003). Por fim seus extratos foram submetidos a uma atmosfera de N^2 para evaporação do solvente, e para que não haja oxidação dos ácidos graxos, e a composição de AGs foi avaliada como metil ésteres utilizando um cromatógrafo a gás Varian modelo 3900 equipado com um ionizador de chama (FID) e auto-injetor. A coluna capilar para analisar os AGs foi uma CP Wax 52 CB, 0.25 μm de espessura, 0.25 mm de diâmetro interno e 30 m de comprimento. O hidrogênio foi utilizado como gás carregador a uma velocidade linear de 22 cm/s. Foi utilizado o seguinte programa de temperatura: 170°C durante 1 minuto, seguido de uma rampa de 2.5°C/ minuto até alcançar 240°C, e um tempo de espera final de 5 minutos, totalizando 31 minutos de corrida. No injetor a temperatura foi de 250°C e no detector de ionização de chama, a temperatura foi de 260°C. Usando um padrão de metil ésteres conhecidos (FAME), (Supelco, 37 *components*; Sigma-Aldrich; Mixture, Me93; *Larodan and Qualmix*, *PUFA fish* M, *Menhaden Oil*, Larodan), os AGs foram identificados por comparação ao tempo de retenção.

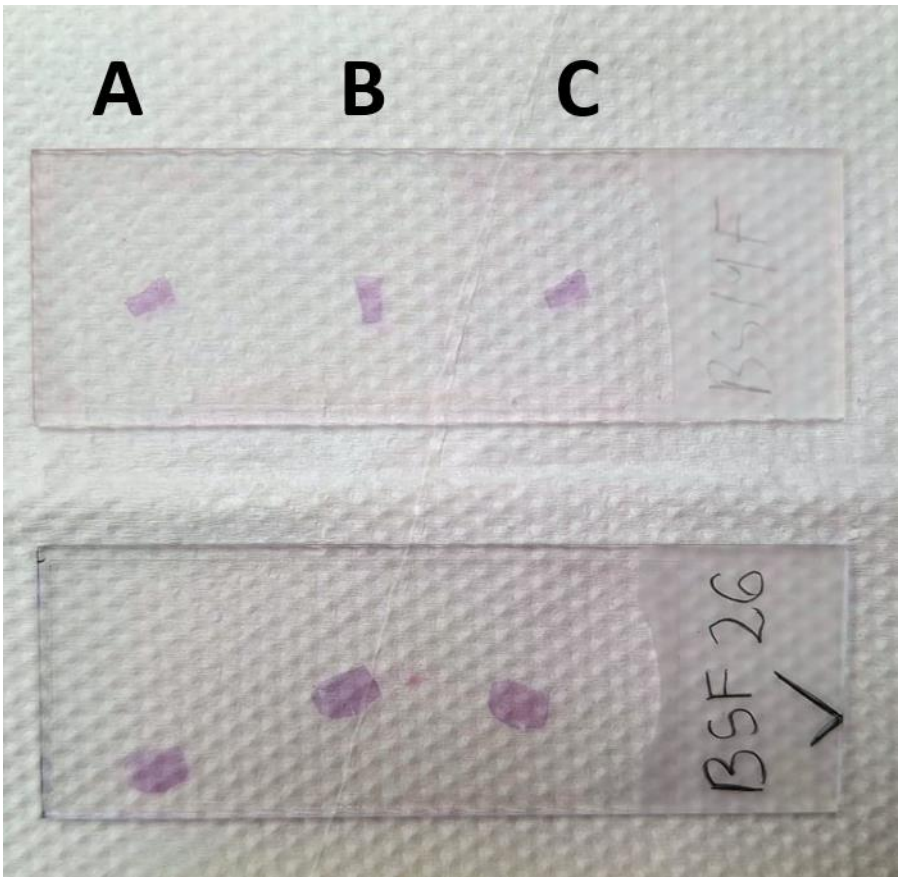
2.4.2 Análises histológicas

Amostras do tecido hepático foram coletadas ao término do experimento nutricional de cada um dos 36 animais (três animais por tanque, nove animais por tratamento) e imediatamente fixadas em formol 10% por 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período o formol foi descartado e as amostras foram lavadas três vezes com etanol a 70% e armazenadas no mesmo em temperatura ambiente até serem utilizadas no protocolo histológico. As amostras foram desidratadas em série alcoólica de 80% e 95% por 40 minutos e no etanol a 100% por 60 minutos, essa última sendo repetida duas vezes para garantir a desidratação total da amostra, na sequência as amostras foram diafanizadas em três banhos de xilol (dimethybenzene) de 40 minutos cada. Por fim as amostras foram incluídas em parafina liquída (paraplast®) e dentro de uma estufa a 65°C, foram realizados cinco banhos de parafina de 60 minutos de duração cada para garantir que a parafina ocupasse todo o espaço intracelular, na etapa final foi realizado o emblocamento das amostras em parafina.

Os blocos obtidos foram cortados em micrótomo (Leica 390 HistoCore AutoCut, equipado com navalhas descartáveis) em cortes de 5μm de espessura, que foram montados em lâminas e posteriormente, corados com Hematoxilina e Eosina (Behmer et al., 1976). Após a

coloração, as lâminas foram fechadas com lamínula e goma Damar. A montagem das lâminas histológicas seguiu um padrão de três cortes histológicos por lâmina, de forma que cada amostra de fígado de cada um dos 36 peixes, estava disposta em três cortes distintos na mesma lâmina (cortes A, B e C, da esquerda para direita com base no lado fosco da lâmina, representado na figura 12) com a distância entre cada corte de aproximadamente 100 µm, afim de garantir uma cobertura maior da amostragem do tecido hepático de cada indivíduo. As imagens digitalizadas dos cortes histológicos foram obtidas usando um sistema de captura digitalizada do microscópio Leica DM1000 LED (light microscope), acoplado a uma câmera (Leica DFC450) e um sistema de captura de imagens Leica MC170HD (photographic câmera) e Leica 379 LAS Interactive Measurements (image analysis).

Figura 11. Lâminas histológicas do tecido hepático finalizadas.



A mensuração da área (em µm²) dos hepatócitos foi realizada por meio do software Image Pro-Plus 6.0 (1260 pixels por 960 pixels). Foram quantificadas 30 células por corte, sendo três cortes pra cada amostra (A, B e C), assim 90 células foram quantificadas por indivíduo, sendo utilizados nove animais por tratamento, totalizando 810 células mensuradas

por tratamento. Os resultados finais foram organizados de forma a abranger a média de cada corte histológico, a média de cada lâmina histológica (ou a média de cada peixe) e finalmente a média final de cada grupo. Análises semelhantes foram realizadas em outras espécies de teleósteos com diferentes tecidos (HONJI *et al*., 2015; ARAÚJO *et al*., 2021) e também no fígado de bijuírás (ARAÚJO *et al*., 2019; MARQUES *et al*., 2021).

2.5 EXPRESSÃO GÊNICA

O RNA total das amostras do fígado foi extraído utilizando o kit PureLink RNA Mini Kit 250 rxns (12183025 Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific) acordo com as instruções do fabricante. Para eliminar a potencial contaminação com DNA genômico as amostras foram tratadas com DNase usando o kit Turbo DNAfree (AM1907 Invitrogen™). A quantidade do RNA foi determinada usando espectrofotômetro (Nanodrop® One, Thermo Fisher Scientific INC). Apenas amostras de RNA com razão OD 260/280 entre 1,90 e 2,20 foram usadas para quantificação da expressão. A concentração do RNA total foi padronizada para 100 ng, e então foi usado como um modelo para sintetizar o cDNA usando o kit SuperScript II Reverse Transcriptase (18.064.014 Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante, após esta etapa o cDNA foi armazenado a -20 °C.

Os primers usados neste estudo (tabela 2) foram referentes aos genes *fas* (do inglês *fatty acid synthase*), *cpt1a* (do inglês *carnitine palmitoyltransferase 1A*), *acox1* (do inglês *acyl-CoA oxidase 1*), *acsl* (do inglês *acyl-CoA synthetase long-chain*), *β-act* (do inglês *beta-actin*) e *ef1α* (do inglês *elongation factor 1-alpha*), sendo os dois últimos utilizados como genes endógenos de referência. Suas sequências foram obtidas da literatura (ARAÚJO *et al*., 2018; ARAÚJO *et al*., 2023) e sintetizados pela Thermofisher S.A (Invitrogen ™).

Tabela 2. Pares de primers utilizados durante a q-PCR.

Gene	Sequência (5′–3′)
fas_fw	ACGGTTACGCCAACTCATC
fas_rv	TGCTTCGCTCTTCACCACC
β-act_fw	AGCCATGGAAGATGAAATCG
β-act_rv	TCTCTTGCTCTGGGCTTCAT
ef1α_fw	AGTGCGGAGGAATCGACAAG
ef1α_rv	TGCTGGTCTCGAACTTCCAC
acsl_fw	CTCAATCTTCTCTGGTGCTATGT
acsl_rv	CTGCAGAGGCCTTGGATAAA
cpt1_fw	GTCTCACCGCACGAGTATTT
cpt1_rv	TTCGGTCCTGTTGCTGATG

acox1_fw	TTGTTTGTAGACCTCCACCA
acox1_rv	ATTGTGTCCTATCTGAATGAAC

Foi realizada a PCR convencional para amplificar os produtos específicos usando a *Platus Taq DNA Polymerase* (recombinante) (Sinapse inc), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 64°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido por 10 minutos de extensão final a 72°C. Os produtos da reação de PCR foram amplificados em gel de agarose a 1%, corado em *GelRed* em Tampões Tris-Borato-EDTA (TBE) e visualizado em luz ultravioleta, para confirmação da ligação do produto da PCR aos *primers*.

A avaliação quantitativa da expressão gênica relativa foi feita por meio da técnica de PCR em Tempo Real do cDNA (RT-qPCR do inglês *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*) com a utilização do corante fluorescente Kit Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Warrigton, UK). Para cada amostra do tecido hepático, foi utilizado 5 μL cDNA (1:10), 10 μL de Power SYBR® Green Mix, 0,6 μL dos primers *forward* e *reverse* e 3,8 μL de água ultrapura, suficiente para um volume final de 20 μL. As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, no Sistema Real Time 7500 (Applied Biosystems). Os valores de limiar de ciclo bruto (Cts) foram determinados, e a reação incluiu 10 minutos a 95C° (manutenção fase), 15s a 95C°, seguido por 1 minuto a 60C° (40 ciclos de desnaturação - fase de ciclo) e uma curva de fusão de 60–95C°. O mRNA relativo aos níveis dos genes alvo foram normalizados usando *ef1α* como gene de referência endógena, e os valores relativos foram expressos para os valores de expressão do grupo OP. O nível de transcrição de cada gene foi calculado em relação aos níveis dos outros genes usando o valor de Ct para cada gene e, em seguida, normalizado contra *ef1α*, usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen & Livak, 2008). Esse método consiste em 3 etapas: Cálculo do ΔCt para cada gene, onde ΔCt é a diferença entre o Ct do gene alvo e o Ct do gene de referência endógeno (neste caso, *ef1α*). Isso normaliza as diferenças de expressão em relação ao gene de referência, controlando variações na quantidade total de mRNA ou eficiência da transcrição reversa. Em seguida o cálculo do ΔΔCt foi realizado, comparando os valores normalizados (ΔCt) entre grupos experimentais. O grupo controle (neste caso, o grupo OP) foi utilizado como base de comparação. Finalmente foi realizada a conversão para expressão relativa onde os valores de ΔΔCt foram convertidos em níveis de expressão relativa utilizando a fórmula:

$2^{-\Delta\Delta Ct}$, esse método assume que a eficiência da amplificação é próxima de 100% (ou seja, o DNA dobra a cada ciclo).

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis dependentes coletadas de todas as metodologias foram submetidas ao teste de Normalidade Shapiro-Wilk e teste de Bartlet para verificar homocedasticidade. Após atendido os pressupostos, procedeu-se a Análise de Variância (ANOVA) e, quando significativa foi aplicado o teste *post-hoc* de Tukey para comparação de médias e separação dos grupos. Todos os testes estatísticos foram conduzidos, usando o software estatístico *SigmaStat* versão 7.0, utilizando o nível de significância de 5% ($P<0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 LIPÍDEOS TOTAIS DAS DIETAS

A Tabela 3 apresenta o perfil de AGs totais das dietas experimentais utilizadas no experimento nutricional. Como esperado, os níveis de AGs corresponderam as proporções incluídas nas formulações dietéticas. Os percentuais de *SFAs* e *MUFAs* em geral foram similares, nas diferentes dietas. A dieta OP apresentou um percentual relativamente maior dos AG n-3 comparado com as demais dietas experimentais influenciada principalmente pelo nível de DHA, enquanto as dietas contendo OS (D1, D2 e D3) apresentaram elevado percentual do 18:2n-6 (maior em D1 seguido por D2 e D3). Essas alterações resultaram em maior razão Σn-3/Σ n-6 na dieta OP, seguido pela dieta D3, D2 e D1.

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos totais (%) das diferentes dietas experimentais.

	Dietas (%)			
Ácidos Graxos	**OP**	**D1**	**D2**	**D3**
12:0	-	11,97	10,07	8,81
14:0	8,93	6,25	5,72	4,28
16:0	30,64	24,3	23,44	22,89
18:0	6,74	7,16	7,11	6,69
∑SFA	46,31	49,68	46,34	42,67
16:1	9,44	3,6	3,52	4,27
18:1n-9	16,07	21,34	20,39	19,69
18:1n-7	3,93	2,71	2,77	3,36
20:1n-9	1,1	0,15	1,49	1,03
∑MUFA	30,54	27,8	28,17	28,35
20:5n-3 (EPA)	1,32	0,35	1,11	2,67

Ácidos graxos	OP	D1	D2	D3
22:5n-3	1,31	0,4	0,41	0,93
22:6n-3 (DHA)	6,39	0,73	2,39	3,88
∑n-3	9,02	1,48	3,91	7,48
18:2n-6	6,95	19,52	17,91	14,06
20:4n-6 (ARA)	1,43	0,61	0,44	1,63
∑n-6	8,38	20,13	18,35	15,69
∑PUFA	17,4	21,61	22,26	23,17
∑C18 PUFA	6,95	19,52	17,91	14,06
∑LC-PUFA	10,45	2,09	4,35	9,11
Σn-3/Σ n-6	1,07	0,07	0,21	0,47
∑LC-PUFA/∑C18 PUFA	1,50	0,11	0,24	0,64

∑SFA – somatória ácidos graxos saturados; ∑MUFA – somatória ácidos graxos monoinsaturados; ∑n-3 – somatória ácidos graxos polinsaturados da série n-3; ∑n-6 – somatória ácidos graxos polinsaturados da série n-6; ∑PUFA- somatória de ácidos graxos polinsaturados; ∑LC-PUFA – Somatória dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa; ∑C18 PUFA – Somatória ácidos graxos de 18 carbonos; Σn-3/Σ n-6 – razão entre ácidos graxos n-3 e n-6; ∑LC-PUFA/∑C18 PUFA – razão entre LC-PUFA e C18 PUFA.

3.2 DESEMPENHO PRODUTIVO

Não foram observadas diferenças significativas para os índices de MF, BF, GM, GMD, CAA, TCE, SO, IVS e IHS nos animais provenientes dos diferentes grupos experimentais (tabela 4). Entretanto observando os valores podemos notar uma tendência a melhor performance nos animais do grupo OP comparado àqueles alimentados com dietas contendo OS (D1, D2 e D3). Essa tendência é principalmente observada para MF, BF, GM, GMD e TCE.

Tabela 4. Desempenho produtivo de juvenis de bijupirá alimentados com diferentes dietas experimentais.

	Dietas				
	OP	**D1**	**D2**	**D3**	***p*-valor**
Variáveis					
[1]MI (g)	10,70 ±0,18	10,97±0,15	10,64± 0,08	10,82±0,24	*0,583*
[2]BI (g)	160,52±2,72	164,58±2,29	159,72±1,22	162,29±3,67	*0,593*
[3]MF (g)	86,03±6,27	69,06±1,53	75,65±4,9	75,03±4,04	*0,141*
[4]BF(g)	1131,50±125,23	888,26±27,37	897,80±113,90	835,20±100,65	*0,232*
[5]GM(g)	75,33±6,17	58,09±1,42	65,01±4,97	64,21±4,00	*0,131*
[6]GMD (g/dia)	1,34±0,11	1,03±0,02	1,16±0,08	1,14±0,07	*0,131*

Variáveis	OP	D1	D2	D3	*p-valor*
[7]CAA (g/g)	1.19±0,14	1,50±0,018	1,36±0,08	1,40±0,03	*0,160*
[8]TCE (%)	3,71±0,12	3,28±0,02	3,49±0,13	3,45±0,09	*0,102*
[9]IVS (%)	16,38±1,04	14,85±1,58	14,55±0,26	15,30±0,23	*0,580*
[10]IHS (%)	6,16±0,87	5,11±0,37	5,40±0,16	4,86±0,34	*0,364*
[11]SO (%)	100±00	100±00	93,33±6,67	93,33±6,67	*0,595*

Resultados apresentados como média ± desvio padrão [1]Massa inicial; [2] Biomassa inicial; [3]Massa final; [4]Biomassa final; [5]Ganho em massa; [6]Ganho em massa diário; [7]Conversão alimentar aparente, [8]Taxa de crescimento específico; [9]Índice viscerossomático; [10]Índice hepatossomático; [11]Sobrevivência.

3.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

O perfil do tecido muscular e hepático dos juvenis de bijupirá, são apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Apesar de apresentarem perfis distintos, pode-se notar alguns padrões semelhantes dentro dos percentuais de cada grupo de AGs para ambos os tecidos.

No tecido muscular (Tabela 5) foi observado que o percentual dos *SFAs* foi significativamente maior nos peixes alimentados com a dieta OP, comparado aqueles alimentados com a dieta D1, enquanto para as demais dietas experimentais não foram observadas diferenças. As diferenças observadas nos *SFAs* foram influenciadas principalmente pelas variações no percentual dos AGs 14:0 e 16:0, que da mesma forma, foram mais representativos nos animais do grupo OP. Um maior percentual na somatória dos *MUFAs* também foi observado nos animais alimentados com a dieta OP, diferindo estatisticamente dos animais alimentados com as outras dietas experimentais. Essa variação nos *MUFAs,* foi influenciada principalmente pelo maior percentual do 16:1 nos animais do grupo OP, comparado aos animais dos outros grupos experimentais, e também pelo 18:1n-7 em um menor grau.

Os percentuais da somatória dos AGs da série n-3, não apresentaram diferenças estatísticas entre as dietas OP e D3, e D1 e D2, sendo a dieta D3 a com maior percentual, enquanto a dieta D1 teve o menor percentual. Neste caso os AGs que mais influenciaram no perfil dos n-3 totais foram EPA e DHA, onde o EPA teve o maior percentual na dieta OP, seguido por D3, D2 e D1 com menor percentual, enquanto para o DHA o maior percentual observado foi na dieta D3 comparado aos outros grupos que não foram significativamente diferentes entre sí. Os animais que receberam a dieta OP apresentaram percentual significativamente menor dos AGs da série n-6, sendo que os que receberam as outras dietas experimentais apresentaram valores até 3 vezes superiores comparado a dieta OP, e o percentual deste grupo de AGs seguiu um padrão decrescente do grupo D1 (maior) ao D3

(menor), com diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais. Essas variações no total de AGs n-6, foram influenciadas principalmente pelas diferenças observadas nos percentuais do 18:2n-6, resultante da inclusão de distintos níveis do OS nas dietas experimentais, sendo observado um gradiente de inclusão com maiores níveis na dieta D1 e menores na D3. Diferenças significativas foram, da mesma forma, observados nos níveis do 20:4n-6 (ARA) entre os diferentes grupos, sendo observado um gradiente de concentração com menores porcentagens desse AG nos animais alimentados com a dieta OP, seguido por D1, D2 e com maiores níveis naqueles alimentados com a dieta D3.

As alterações nas concentrações dos AGs das séries n-3 e n-6 resultaram em um menor percentual dos *PUFAs* totais nos animais do grupo OP, comparado aos animais dos grupos D1, D2 e D3. Na somatória dos *LC-PUFAs*, foram notadas diferenças significativas entre os animais alimentados com diferentes dietas experimentais, com maior percentual nos animais alimentados com a dieta D3 comparado aqueles alimentados com as dietas D1 e D2, e menor percentual naqueles alimentados com a dieta D1, comparado a dieta OP e D3. Os C18 *PUFAs* tiveram o menor percentual na dieta controle (OP), enquanto nas dietas experimentais os percentuais foram mais elevados nos animais do grupo D1 seguido por aqueles do grupo D2 e D3, todos sendo significativamente diferentes entre si.

Por fim, os valores da razão entre os *LC-PUFAs* e os C18 *PUFAs* foram maiores para os animais alimentados com a dieta controle, e menores nas outras dietas experimentais, seguindo um padrão crescente de D1 (menor) a D3 (maior), sendo OP nesse caso significativamente diferente apenas de D2.

Tabela 5. Perfil de ácidos graxos totais (%) do tecido muscular de juvenis de bijupirá alimentados com diferentes dietas experimentais.

	Dietas (%)				
Ácidos Graxos	**OP**	**D1**	**D2**	**D3**	***P-valor***
12:0	-	1,12±0,42^{c}	1,31±0,45^{b}	1,87±0,43^{a}	*0.170*
14:0	4,55±0,18^{a}	2,20±0,28^{b}	2,33±0,39^{b}	2,67±0,39^{b}	*0.001*
16:0	26,46±1,49^{a}	18,88±0,59^{b}	20,88±0,70^{bc}	21,36±0,07^{c}	*0.001*
18:0	7,01±0,46	6,87±0,70	8,05±1,31	7,06±0,88	*0.407*
ΣSFA	38,02±1,83^{a}	29,07±0,31^{b}	32,57±1,28^{ab}	32,96±0,47^{ab}	*0.024*
16:1	8,89±0,73^{a}	2,90±0,38^{b}	3,02±0,22^{b}	3,39±0,30^{b}	*0.001*
18:1n-9	22,21±0,65^{bc}	23,82±0,57^{a}	22,43±0,11^{b}	21,18±0,38^{c}	*0.001*
18:1n-7	4,31±0,08^{a}	2,53±0,21^{b}	2,87±0,24^{b}	2,78±0,16^{b}	*0.001*
20:1n-9	0,69±0,05	0,46±0,01	0,49±0,04	0,72±0,20	*0.001*
ΣMUFA	36,11±1,37^{a}	29,71±0,86^{b}	28,81±0,15^{b}	28,07±0,43^{b}	*0.001*

Ácidos graxos	**OP**	**D1**	**D2**	**D3**	***P-valor***
20:5n-3 (EPA)	6,00±0,47^{a}	1,81±0,17^{b}	3,12±0,39^{c}	4,35±0,64^{d}	*0.001*
22:5n-3	1,39±0,30^{a}	0,78±0,08^{b}	0,76±0,06^{b}	1,24±0,23^{ab}	*0.009*
22:6n-3 (DHA)	6,47±1,52^{b}	4,49±0,86^{b}	6,59±0,59^{b}	10,33±0,59^{a}	*0.001*
Σn-3 PUFA	13,86±2,27^{a}	7,08±1,11^{b}	10,47±0,76^{b}	15,92±0,30^{a}	*0.001*
18:2n-6	7,63±0,58^{d}	28,91±0,33^{a}	23,37±0,94^{b}	17,70±1,41^{c}	*0.001*
20:4n-6 (ARA)	1,79±0,16^{d}	1,86±0,31^{c}	2,02±0,24^{b}	2,64±1,03^{a}	*0.392*
Σn-6 PUFA	9,42±0,85^{d}	30,77±0,14^{a}	25,39±0,91^{b}	20,34±0,60^{c}	*0.001*
ΣPUFA	23,28±2,95^{b}	37,86±0,96^{a}	35,87±1,41^{a}	35,86±0,80^{a}	*0.001*
ΣC18 PUFA	7,63±0,64^{c}	28,91±0,48^{a}	23,37±1,15^{b}	17,70±1,56^{d}	*0.001*
ΣLC-PUFA	15,65±2,36^{ab}	8,94±1,40^{c}	12,49±0,86^{bc}	18,56±1,46^{a}	*0.001*
Σn-3/Σ n-6	1,47±0,16^{a}	0,23±0,03^{b}	0,42±0,03^{ab}	1,27±0,03^{ab}	*0.016*
ΣLC-PUFA/ΣC18 PUFA	2,05±0,17^{b}	0,30±0,02^{ab}	0,53±0,05^{a}	0,99±0,16^{ab}	*0.001*
Outros	1,90	1,18	1,06	1,20	-

Resultados apresentados como média ± desvio padrão.^{ab}Letras representam diferenças estatísticas entre as diferentes dietas pelo teste de Tukey (P<0,05). ΣSFA - ácidos graxos saturados; ΣMUFA - ácidos graxos monoinsaturados; Σn-3 PUFA - ácidos graxos polinsaturados da série n-3; Σn-6 PUFA - ácidos graxos polinsaturados da série n6; ΣPUFA - somatória do total de ácidos graxos polinsaturados; ΣLC-PUFA -Somatória dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa; Σn-3/Σ n-6 – Razão entre as somatórias dos ácidos graxos n-3 e n-6; ΣC18 PUFA – Somatória dos ácidos graxos com 18 carbonos; ΣLC-PUFA/ΣC18 PUFA – Razão entre as somatórias de LC-PUFA e C18 PUFA; Outros – somatória dos ácidos graxos contendo menos de 0,5% do total.

No tecido hepático (Tabela 6) foi observado um perfil semelhante da composição dos AGs comparado ao tecido muscular. Os *SFAs* foram mais representativos nos animais alimentados com a dieta OP, enquanto para aqueles alimentados com as outras dietas experimentais os valores foram similares, não sendo observada diferenças significativas entre os diferentes grupos. Esse perfil dos *SFAs*, foi influenciado principalmente pelo alto percentual do 16:0 presente na dieta OP, representando mais de 72% dos totais de *SFA*. Um perfil semelhante ao do *SFA* foi observado para os *MUFAs* com maior percentual nos animais alimentados com OP, enquanto as dietas experimentais apresentaram valores inferiores e similares, da mesma forma não sendo observada diferenças entre D1, D2, D3 para esta classe de AGs. Similar ao tecido muscular, o elevado percentual de *MUFAs* no tecido hepático dos animais alimentados com a dieta OP foi resultado principalmente da elevada deposição do 16:1 e em menor grau do 18:1n-7, enquanto o 18:1n-9 em OP foi diferente de todas as demais dietas.

Os AGs da série n-3 foram menos representativos nos animais alimentados com a dieta D1, sendo observado um gradiente de concentração com nível intermediário em D2 e maior em D3, sendo os três grupos estatisticamente diferentes entre si, enquanto aqueles

alimentados com dieta OP apresentaram percentual semelhante aos do grupo D2 e D3. Similar ao observado para o tecido muscular, esse padrão justifica-se principalmente pelas variações observadas nos níveis de EPA e DHA como menores valores de EPA observados nos grupos D1 e D2 e maiores nos grupos OP e D3. Da mesma forma os níveis de DHA foram similares aos observados para o EPA, no entanto o grupo OP e D2 não foram significativamente distintos, e apresentaram níveis intermediários, enquanto D1 foi significativamente inferior e D3 significativamente superior.

Similar ao observado no tecido muscular, os AGs da série n-6, foram menos representativos nos animais do grupo OP, enquanto para aqueles provenientes dos outros grupos experimentais o percentual foi de aproximadamente 4 vezes maior comparado com a dieta controle. Ainda com relação aos *PUFAs* n-6, foi observado um gradiente decrescente da concentração entre D1 (maior) e D3 (menor), sendo todos os grupos significativamente diferentes entre si, exceto pelas dietas D1 e D2. Semelhante ao observado no tecido muscular, para esta classe de AGs, observamos valores elevados no grupo D1, níveis intermediários no grupo D2 e níveis inferiores no grupo D3, devido aos diferentes níveis de inclusão do OS nas dietas experimentais, e consequentemente variações no 18:2n-6 entre os grupos. Os percentuais da somatória dos *PUFAs* foram maiores e iguais entre os animais alimentados com as dietas D1, D2 e D3, enquanto na dieta OP o valor foi significativamente inferior, devido a influência das variações entre os grupos observada para os AGs das séries n-3 e n-6, como previamente mencionado. Diferenças significativas foram da mesma forma observadas para os *LC-PUFAs* totais. As dietas experimentais foram diferentes estatisticamente entre si, e seus percentuais apresentaram um gradiente crescente de D1 para D3, enquanto o percentual dos animais do grupo controle (OP) não foi significativamente diferente daqueles animais dos grupos D2 e D3. A razão entre os AGs das séries n-3 e n-6 foi maior nos peixes alimentados com a dieta controle, enquanto nas dietas experimentais os valores foram menores e crescentes de D1 a D3, todos significativamente. Por fim, todas as alterações observadas nos *PUFAs* resultaram em maior razão entre *LC-PUFAs* e os *C18 PUFAs* nos animais do grupo OP, seguido por D3, D2 e D1 (tabela 6).

Tabela 6. Perfil de ácidos graxos totais (%) do tecido hepático de juvenis de bijupirá alimentados com diferentes dietas experimentais.

	Dietas (%)				
Ácidos Graxos	**OP**	**D1**	**D2**	**D3**	***P-valor***
12:0	-	0,69±0,10	0,84±0,16	0,90±0,03	*0.151*

Ácidos Graxos	OP	D1	D2	D3	*P-valor*
14:0	2,83±0,28[a]	2,29±0,07[b]	2,19±0,14[b]	2,24±0,17[b]	*0.008*
16:0	29,89±1,41[a]	22,12±2,76[b]	22,61±1,40[b]	22,91±0,23[b]	*0.001*
18:0	7,51±1,18[a]	6,62±1,16[b]	6,02±0,70[c]	5,92±0,15[d]	*0.511*
ΣSFA	40,23±2,23[a]	31,72±3,81[b]	31,66±1,76[b]	31,97±0,03[b]	*0.004*
16:1	9,45±0,63[a]	4,74±0,26[b]	5,12±0,17[b]	5,77±0,21[b]	*0.002*
18:1n-9	29,55±1,30	30,12±1,41	29,83±1,32	29,07±0,14	*0.734*
18:1n-7	4,12±0,19[a]	2,40±0,25[b]	2,62±0,09[b]	2,93±0,06[b]	*0.001*
20:1n9	0,52±0,04[a]	0,49±0,02[b]	0,52±0,04[c]	0,53±0,03[d]	*0.332*
ΣMUFA	43,64±1,16[a]	37,75±1,87[b]	38,09±1,50[b]	38,3±0,11[b]	*0.002*
20:5n-3 (EPA)	3,90±0,84[a]	1,03±0,23[b]	2,03±0,34[b]	3,33±0,17[a]	*0.001*
22:5n-3	1,13±0,28[a]	0,61±0,15[b]	0,82±0,11[ab]	1,25±0,06[a]	*0.007*
22:6n-3 (DHA)	4,04±0,81[b]	2,09±0,45[c]	4,31±0,70[b]	7,17±0,12[a]	*0.001*
Σn-3 PUFA	9,07±2,04[ab]	3,73±0,83[c]	7,16±1,11[b]	11,75±0,30[a]	*0.001*
18:2n-6	4,07±0,75[c]	22,60±3,99[a]	19,06±2,66[a]	14,13±0,30[b]	*0.001*
20:4n-6 (ARA)	1,12±0,17	1,11±0,21	1,26±0,13	1,48±0,02	*0.053*
Σn-6 PUFA	5,19±0,43[c]	23,71±4,67[a]	20,32±2,94[a]	15,61±0,34[b]	*0.001*
ΣPUFA	14,26±2,96[b]	27,44±5,44[a]	27,48±3,17[a]	27,36±0,09[a]	*0.002*
ΣC18-PUFA	4,07±0,84[c]	22,60±4,41[a]	19,06±2,86[a]	14,13±0,30[b]	*0.001*
ΣLC-PUFA	10,19±2,04[ab]	4,84±1,08[c]	8,42±1,15[b]	14,35±0,26[a]	*0.001*
Σn-3/Σ n-6	1,74±0,11[a]	0,15±0,01[b]	0,35±0,05[d]	0,75±0,03[c]	*0.001*
ΣLC-PUFA/ΣC18 PUFA	2,47±0,11[a]	0,25±0,02[d]	0,46±0,07[c]	0,93±0,03[b]	*0.001*
Outros	1,48	1,26	1,22	1,12	

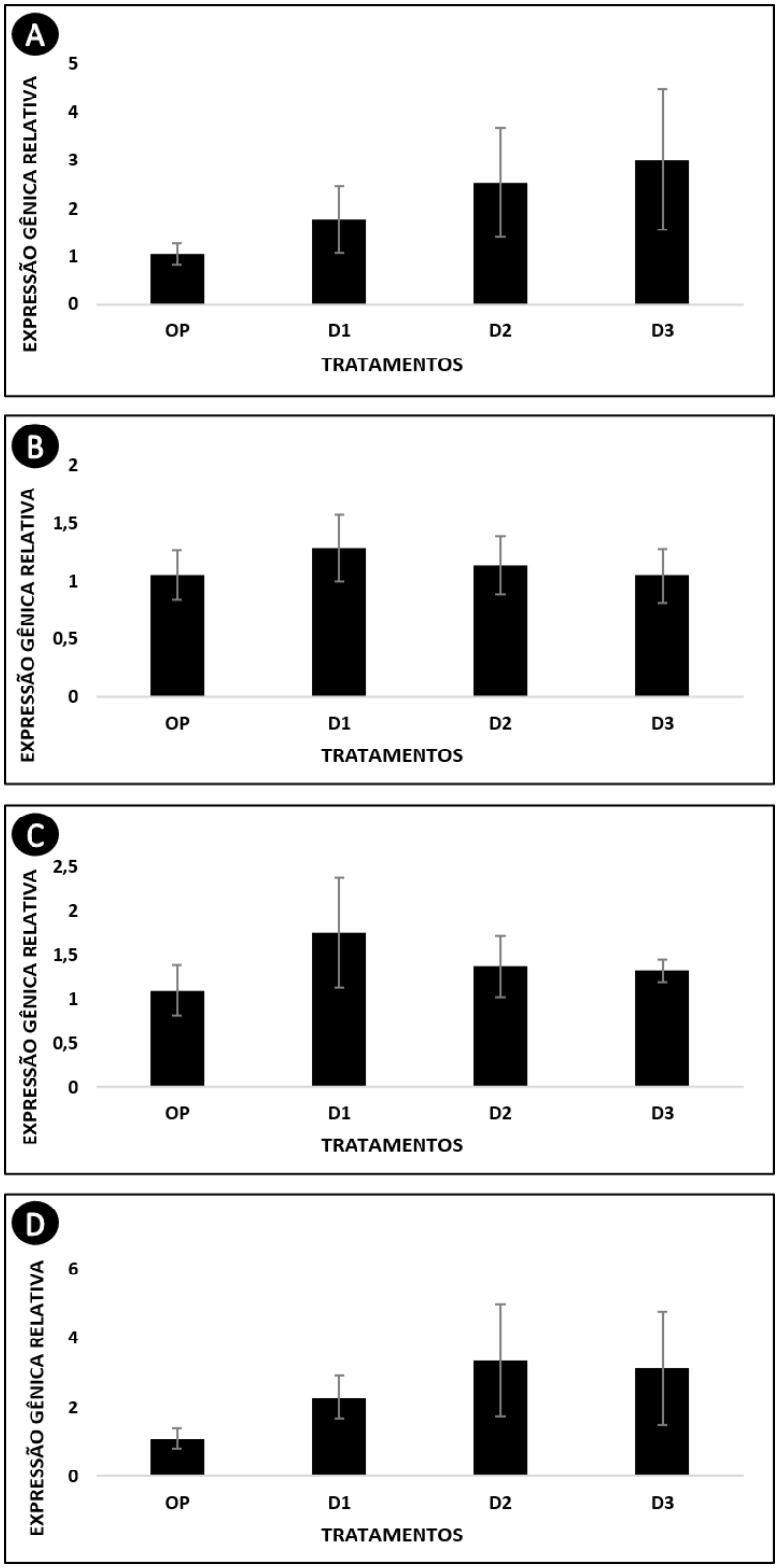
Resultados apresentados como média ± desvio padrão.[ab]Letras representam diferenças estatísticas entre as diferentes dietas pelo teste de Tukey (P<0,05). ΣSFA - ácidos graxos saturados; ΣMUFA - ácidos graxos monoinsaturados; Σn-3 PUFA - ácidos graxos polinsaturados da série n-3; Σn-6 PUFA - ácidos graxos polinsaturados da série n6; ΣPUFA - somatória do total de ácidos graxos polinsaturados; ΣLC-PUFA -Somatória dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa; Σn-3/Σ n-6 – Razão entre as somatórias dos ácidos graxos n-3 e n-6; ΣC18 PUFA – Somatória dos ácidos graxos com 18 carbonos; ΣLC-PUFA/ΣC18 PUFA – Razão entre as somatórias de LC-PUFA e C18 PUFA; Outros – somatória dos ácidos graxos contendo menos de 0,5% do total.

3.4 EXPRESSÃO GÊNICA

Os resultados da expressão relativa dos genes *fas*, *cpt1a*, *acox1* e *acsl* do tecido hepático dos animais dos diferentes grupos experimentais são apresentados na figura 13 (A – *fas*, B – *cpt1a*, C – *acox1*, D – *acsl*). De modo geral, os resultados da expressão dos genes relacionados ao metabolismo lipídico, não foi influenciada (não foram significativamente diferentes, P<0,05) pela composição das diferentes dietas experimentais. No entanto, foi possível observar uma tendência a um aumento gradual da expressão de *fas* (P = 0,545), que foi menor no grupo OP, seguido por D1, D2 e D3. No *cpt1a* (P = 0,896) o maior valor de expressão foi observado na dieta D1 e os menores valores em OP e D3. Na expressão *acox1*(P

= 0,700) o maior valor também foi no grupo D1 e a menor em OP. Por fim, foi observada uma tendência de menor expressão de *acsl* (P = 0,566) nos animais do grupo OP, principalmente comparado aos animais do grupo D2 e D3.

Figura 12. Expressão gênica relativa de genes relacionados ao metabolismo lipídico em juvenis de bijupirá.



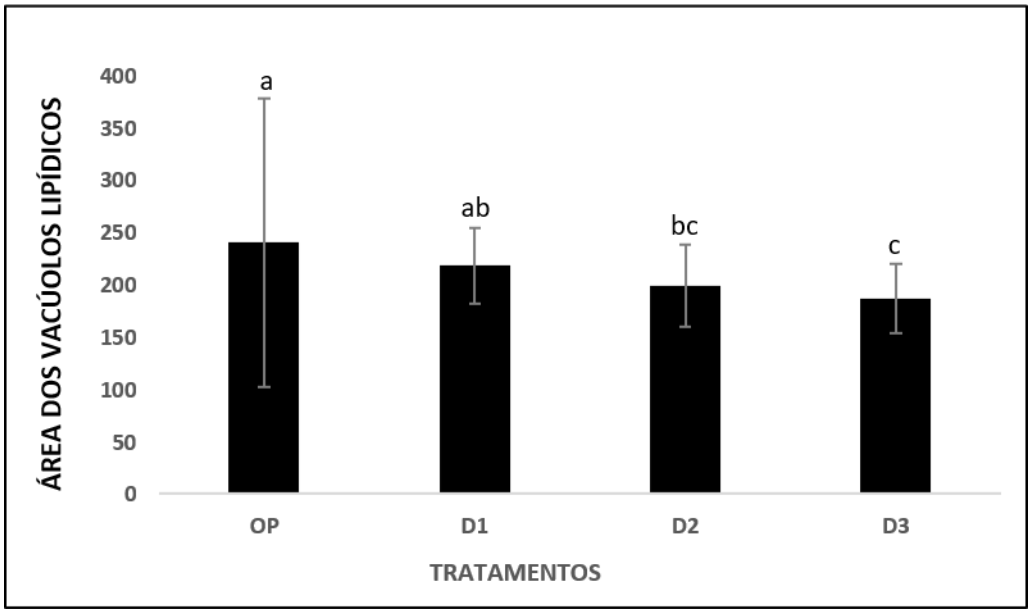
Níveis de expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo lipídico. (**A**) *fas* (ácido graxo sintase) P = 0,545; (**B**) *cpt-1α* (carnitina palmitoiltransferase Iα) P = 0,896; (**C**) *acox1* (acyl-CoA oxidase 1) P = 0,700; (**D**) *acsl* (cyl-CoA sintase de cadeia longa) P = 0,566. Os valores representam a média ± erros padrão. O nível de transcrição de cada gene foi calculado e normalizado contra o gene endógeno *ef1α*. Os valores mostrados são as mudanças de indução de dobra em relação ao valor médio de Ct para todos os genes.

3.5 MORFOLOGIA HEPÁTICA

A média da área (µm²) dos vacúolos lipídicos dos hepatócitos dos juvenis de bijupirá, bem como a morfologia hepática dos animais de cada um dos quatro grupos de tratamentos, estão representados na figura 14 e 15 respectivamente.

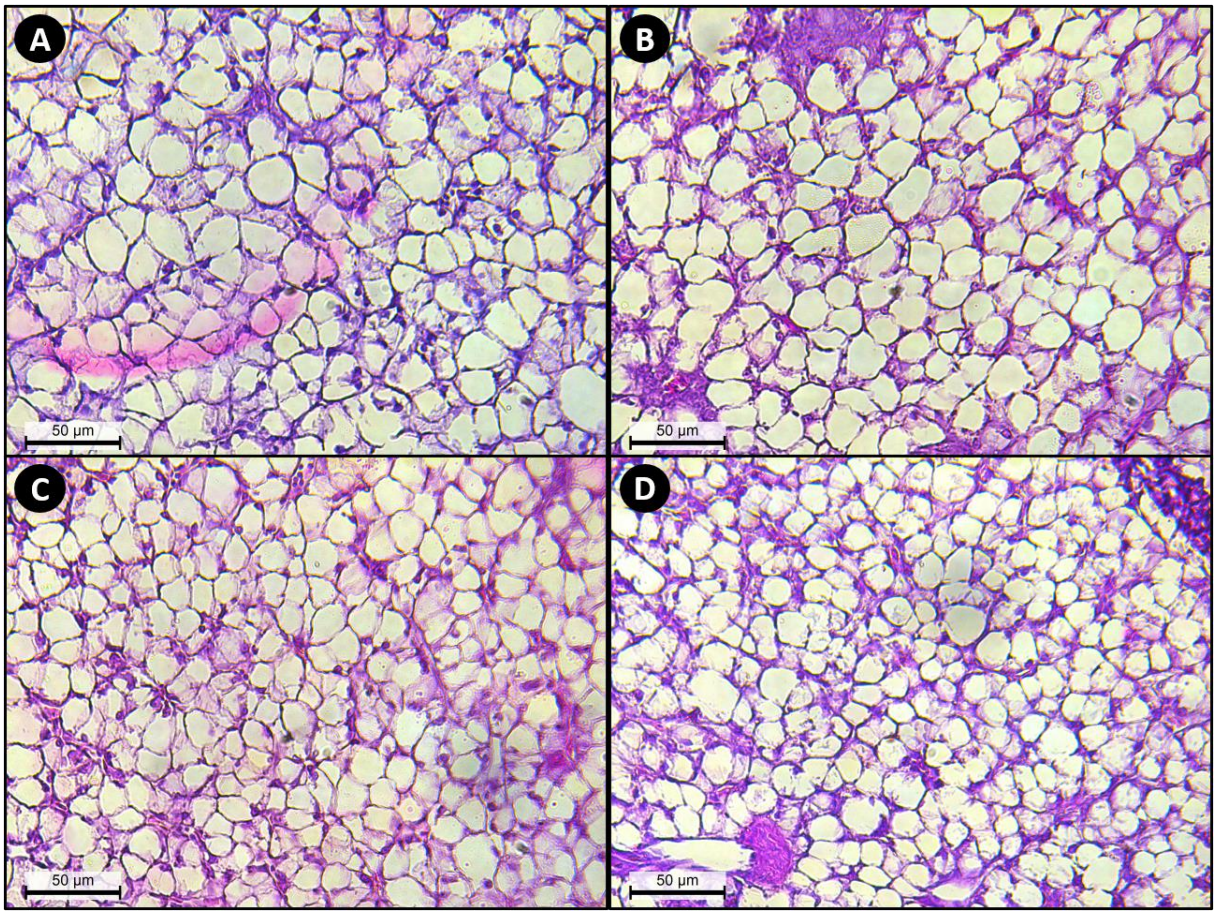
Os resultados demonstram que a média da área dos vacúolos lipídicos dos hepatócitos, foi significativamente maior nos animais alimentados com a dieta OP (média de 249 µm²) comparado aos animais alimentados com as dietas D1, D2 e D3 (média de 227 µm², 195µm², e 190 µm², respectivamente). Adicionalmente, foi notado uma tendência a menor deposição lipídica dá dieta OP até a D3 (OP>D1>D2>D3). As análises estatísticas mostraram uma diferença significativa entre os grupos (P= <0,001), onde OP diferiu de D2 e D3, D1 diferiu apenas de D3. Nas imagens do tecido hepático é possível visualizar os diferentes padrões de deposição lipídica no tecido hepático dos animais provenientes dos grupos experimentais.

Figura 13. Área dos vacúolos lipídicos dos hepatócitos de juvenis de bijupirá alimentados com diferentes dietas experimentais.



Área média dos vacúolos lipídicos (em µm²) do tecido hepático de juvenis de bijupirá, alimentados com diferentes dietas experimentais. [ab] Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre as dietas, pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Figura 14. Morfologia hepática ilustrando a deposição lipídica nos vacúolos de hepatócitos de juvenis de bijupirá alimentados com diferentes dietas experimentais.



Morfologia hepática observada nos juvenis de bijupirá, objetiva de 40x. **(A)** Grupo OP; **(B)** Grupo D1; **(C)** Grupo D2; **(D)** Grupo D3.

4. DISCUSSÃO

Apesar de ser um ingrediente importante para a produção de dietas para peixes marinhos, a utilização de OP vem sendo drasticamente reduzida por este ser um ingrediente de alto custo, de produção instável e de alto impacto ambiental, já que são produzidos em grande parte a partir dos estoques naturais de peixes (GLENCROSS, 2009). Com isso, é imprescindível a busca por fontes lipídicas alternativas menos impactantes, sendo as mais utilizadas as de origem vegetal. Essa substituição de OP por fontes alternativas, comumente resulta em baixa aceitação da ração pelos organismos devido principalmente a redução da palatabilidade, impactando negativamente o metabolismo e consequentemente a performance de crescimento dos animais (YILDIRIM-AKSOY *et al*., 2007; TRUSHENSKI *et al*., 2011). Os OVs, (incluindo o OS), em sua maior parte são fontes ricas em 18:2n-6, e embora sejam amplamente utilizados na produção de dietas para aquicultura, sua inclusão deve ser cuidadosamente avaliada, já que pode resultar em possíveis efeitos adversos que

comprometem o metabolismo energético dos animais, além de resultar em baixa qualidade nutricional do produto final (OGORI, 2020).

No entanto, nossos resultados demonstraram que todas as dietas foram bem aceitas pelos animais, e o desempenho produtivo não foi negativamente afetado pela inclusão de uma mistura contendo OS e óleos ricos em *LC-PUFAs,* e consequente redução de OP nas dietas. Não foram observadas alterações significativas para todos os parâmetros zootécnicos avaliados, mesmo com as dietas apresentando distintas razões de importantes AGs, em detrimento à substituição do OP por OS. No entanto, é importante mencionar que as dietas experimentais foram devidamente suplementadas com óleos concentrados de DHA, EPA e ARA a fim de atender as necessidades nutricionais da espécie, que já foram previamente descritas em estudos anteriores (TRUSHENSKI *et al*., 2012; ARAÚJO *et al*., 2019)

Os OVs são frequentemente utilizados como fontes lipídicas na substituição parcial ou até mesmo total de OP em dietas comerciais, e diversos estudos conduzidos com peixes marinhos de interesse comercial apresentaram resultados consistentes (TURCHINI *et al*., 2011). Semelhante aos nossos achados, Marques *et al.*, (2021), já havia demonstrado que a espécie alvo mostrou boa aceitação de dietas livres de OP, utilizando como fonte alternativa OVs ricos em *SFAs* (OC) e *MUFAs* (azeite de oliva) e suplementados com ingredientes ricos em EPA, DHA e ARA, não sendo observado diferenças significativas nos diferentes parâmetros de performance avaliados. Em outro estudo realizado com a mesma espécie, Araújo *et al*., (2019) observou em temperatura ótima (26,5ºC) e subótima (29,5 ºC) até mesmo uma melhora na performance produtiva de juvenis de bijupirá alimentados com dietas livres de OP e suplementadas com EPA e DHA, e diferentes níveis de ARA comparado aos animais alimentados com dietas contendo apenas OP como base lipídica. Similarmente, os resultados observados em nosso estudo demonstram que os OVs, nesse caso o OS e o OC podem ser incorporados em dietas para juvenis de bijupirá sem causar efeitos negativos significativos no crescimento e sobrevivência, desde que as dietas sejam adequadamente suplementadas com os *LC-PUFAs* essenciais para peixes marinhos. Os resultados presentes também são consistentes com estudos prévios realizados com outras espécies de peixes marinhos como *Morone saxatilis* (ARAÚJO *et al*., 2021), *Seriola dorsalis* (ROMBENSO *et al*., 2018) e *Trachinotus carolinus* (ROMBENSO *et al*., 2017).

Entretanto, apesar de não haver uma diferença significativa em relação ao desempenho produtivo, foi observada uma tendência a um melhor desempenho de crescimento nos animais alimentados com a dieta OP, principalmente em relação aos índices de peso final, biomassa final, ganho em peso, ganho em biomassa, ganho em peso diário. Estes resultados podem

estar relacionados com o elevado nível de *SFAs* e *MUFAs* presentes nessa dieta, principalmente representado pelos AGs 16:0 e 16:1. A relação de maiores taxas de crescimento com um maior nível destes AGs da mesma forma já foi observada por Marques *et al.* (2021) e Woitel *et al.* (2014) para a mesma espécie, e também para outras espécies marinhas como *Atractoscion nobilis* (ROMBENSO *et al*., 2015), *Trachinotus carolinus* (ROMBENSO *et al*., 2016), *Epinephelus coioides* (TSENG & LIN, 2019) e *Trachinotus ovatus* (GUO *et al*., 2020), e esses estudos sugerem um efeito benéfico dessas classes de AGs no desempenho produtivo de espécies de teleósteos marinhas.

Para manter um nível adequado de *SFAs* nas dietas livres de OP, estas foram suplementadas com a mesma concentração de OC, rico no AG 12:0 (aproximadamente 50% do total de AGs) (MARQUES *et al*., 2021). Sendo assim, os níveis de *SFAs* totais das dietas experimentais ficaram iguais (comparado a dieta D2), similares (comparado a dieta D3) ou até mesmo superiores (comparado a dieta D1) ao observado na dieta controle. Diferente de outros *SFAs* este AG em específico (12:0) tende a ser preferencialmente oxidado (resultados a respeito da deposição lipídica observado neste estudo também corroboram com essa hipótese), já que devido sua cadeia carbônica mais curta, a β-oxidação mitocondrial não depende da via de transporte da acil-carnitina (ação do gene *cpt1a*), ou seja, esse AG é capaz de entrar livremente na matriz mitocondrial para ser oxidado, gerando energia de forma rápida e com menor gasto energético para o organismo em comparação a oxidação de AGs de cadeias maiores (NELSON E COX, 2018).

Portanto o 12:0 presente nas dietas experimentais pode ser considerado mais eficiente com relação a performance de crescimento do que por exemplo o 16:0 presente em níveis elevados na dieta OP. No entanto, diferente dos resultados obtidos por Marques *et al*. (2021), no qual a taxa de crescimento foi totalmente proporcional ao nível de *SFA* incluído na dieta, ou seja, os animais que receberam maiores quantidades de *SFAs* obtiveram as maiores taxas de crescimento, a tendência observada nos resultados não foi correlacionada com a maior taxa de *SFAs*, mesmo com a inclusão do 12:0. Apesar dos *SFAs* desempenharem um papel importante no crescimento de espécies marinhas, inclusive na espécie alvo do estudo (Marques *et al*., 2021), provavelmente não foi essa classe de AG em específico o único fator responsável pela tendência de melhor desempenho observado no grupo OP.

Uma notável diferença entre os percentuais de AGs dietéticos está no percentual de DHA, que foi maior na dieta OP em comparação com as dietas experimentais, sugerindo que altos níveis de DHA também podem estar relacionados a melhora da performance de crescimento em peixes marinhos. Este padrão foi anteriormente observado por Trushenski *et*

al. (2012) em experimento com juvenis da mesma espécie, ao testar dietas a base de OS suplementadas com DHA ou EPA, ou uma mistura dos dois AGs, onde observou melhor crescimento nos animais alimentados com as dietas contendo maiores níveis de DHA, enquanto níveis de EPA não influenciaram no crescimento. Os resultados obtidos mostram que apesar de haver uma ordem preferencial no catabolismo de AGs em peixes marinho, sendo maior para os *SFAs*, seguido por *MUFAs*, C18 *PUFAs* e por fim *LC-PUFAs* (TOCHER *et al*., 2003), os processos metabólicos e fisiológicos são também modulados pela interação de inúmeras variáveis bióticas e abióticas, com destaque para temperatura, estágio de vida e principalmente a composição da dieta (ARAÚJO *et al*., 2023; TOCHER, 2003).

Além disso, a dieta contendo o OP apresentou a maior razão entre AGs n-3 e n-6, com um valor de 1,07. Em contraste, as dietas com o OS apresentaram proporções de 0,07 (D1), 0,21 (D2) e 0,47 (D3). Estudos anteriores já confirmaram que a maior razão entre n-3/n-6 afeta diretamente o desempenho produtivo (principalmente em relação ao crescimento) de espécies de teleósteos (PENG *et al*., 2014; IBEAS *et al*., 1994, 1996). Adicionalmente Berge *et al*. (2009) já havia relatado para o salmão do atlântico (*Salmo salar*) que uma baixa relação n-3/n-6 (no caso do estudo 0,26) ocasionou em menores taxas de crescimento, enquanto Jin *et al*. (2019) definiu que a proporção ideal para garantir melhores taxas de crescimento em goraz preto (*Acanthopargrus schlegelii*) foi de 0,7. Diante do exposto, acredita-se que a maior razão n-3/n-6 também seja um dos fatores que podem justificar a tendência a maior crescimento observada nos animais do grupo OP, enquanto a razão n-3/n-6 observada nas dietas D1, D2 e D3 podem estar abaixo das consideradas ótimas para a espécie. No entanto, estudos adicionais ainda são necessários, pois como dito anteriormente, as diferenças de desempenho zootécnico não foram significativas , portanto, não podemos destacar que a variação observada tenha sido influenciada pela concentração de um AG específico.

De maneira geral, o perfil de AGs nos tecidos hepático e muscular dos juvenis de bijupirá, refletiu os perfis dietéticos, em concordância com estudos prévios realizados com outras espécies de teleósteos (ROMBENSO *et al*., 2016; ARAÚJO *et al*., 2018; JIN *et al*., 2018; GUO *et al*., 2020; FISHER *et al*., 2022) e especificamente com bijupirá (TRUSHENSKI et al., 2012; ARAÚJO *et al*. 2021; MARQUES *et al*., 2021). Com base no perfil observado, aparentemente o 12:0 foi preferencialmente oxidado pelos animais de todos os grupos experimentais, uma vez que sua deposição no músculo e fígado foram as mais baixas dentre todos os outros AGs, sendo este resultado corroborado por aqueles reportados por Marques *et al*. (2021). Houve uma deposição significativamente inferior de *SFAs* e, inversamente maior deposição dos *LC-PUFAs* nos tecidos dos animais experimentais. Sabe-se

que apesar de existir uma ordem preferencial de oxidação de AGs, organismos aquáticos em geral tendem a oxidar preferencialmente os nutrientes que estão em excesso na dieta, e poupar (depositar) os que apresentam menores quantidades, sendo este processo denominado de "efeito poupador" (TURCHINI *et al*., 2011; TRUSHENSKI *et al*., 2013).

Os resultados observados neste estudo sugerem um possível efeito poupador de *LC-PUFAs*, visto que comparado aos *SFAs*, DHA, EPA e ARA foram positivamente depositados, principalmente na musculatura mesmo com percentuais relativamente baixos destes AGs nas dietas experimentais (em especial D1 e D2). A preservação de *LC-PUFAs* e maior oxidação de *SFAs* e *MUFAs*, da mesma forma, foram observadas para a espécie alvo do estudo em estudos prévios(WOITEL *et al*., 2014; ARAÚJO *et al*., 2019; MARQUES *et al*., 2021). Da mesma forma ao observado para o 12:0, foi notado uma menor deposição de outros *SFA*s no tecido muscular comparado ao perfil da dieta. No entanto, *SFAs* com menor cadeia carbônica foram menos depositados e possivelmente mais oxidados, comparado àqueles com maior cadeia carbônica, sendo estes resultados observados para o 16:0 e 18:0 comparado ao 12:0. Estes resultados composicionais sugerem também a existência de uma ordem preferencial de oxidação baseada no tamanho das moléculas (SCHÖNFELD E WOJTCZAK, 2016), onde cadeias mais curtas são preferencialmente catabolizadas por demandarem menos energia durante o processo de β-oxidação.

Marques *et al.* (2021) observou que os *MUFAs* eram mais depositados nos tecidos à medida que o nível de inclusão na dieta era maior, ao contrário dos *SFAs*, corroborando assim a hipótese que os *SFAs* são prontamente oxidados comparado aos *MUFAs*. Da mesma forma, outros estudos realizados com peixes carnívoros marinhos (ROMBENSO *et al*., 2018; ARAÚJO *et al*., 2018) e com a espécie modelo deste estudo (TRUSHENSKI *et al*., 2013) observaram resultados similares. Nossos resultados estão de acordo com o que a literatura retrata a respeito do metabolismo da espécie, nossas dietas possuíam níveis equiparados tanto de *SFAs* como de *MUFAs*, no entanto os *SFAs* foram negativamente depositados nos tecidos, enquanto os percentuais de *MUFAs* sofreram poucas alterações comparado ao perfil das dietas.

O mesmo pode ser observado para os *LC-PUFAs n-3*, com *SFAs* preferencialmente oxidados, indiretamente resultando em maior deposição de destes AGs nos tecidos. É importante mencionar que a maior deposição de *LC-PUFAs* n-3 na musculatura tem também uma relação importante com a qualidade nutricional do pescado, já que estes AGs, em especial EPA e DHA são altamente relevantes para saúde humana.

O perfil dos AGs dos tecidos muscular e hepático demonstram também uma maior retenção do 18:2n-6 à medida que sua inclusão dietética aumentou. Este AG é conhecido por apresentar uma maior tendência a ser incorporado nos tecidos lipolíticos e lipogênicos, devido à preferência metabólica dos peixes por oxidar AGs de cadeia curta e média ao invés de *PUFAs* (ALMEIDA *et al*., 2006). Esse resultado é consistente com estudos anteriores, que indicam uma forte tendência de retenção do ácido graxo 18:2n-6 nos tecidos de peixes (PIEDECAUSA *et al*., 2007; THURCHINI, 2009; TRUSHENSKI *et al*., 2011; NAYAK *et al*., 2016; CHEN *et al*., 2019; MARQUES *et al*., 2021). De maneira geral, a alta retenção deste AG pode comprometer a qualidade do produto final, dado pela consequente diminuição na razão n3/n6 no filé (SIMOPOULOS *et al*., 2002). Adicionalmente, Sissener *et al.* (2020) demonstrou que altos níveis de 18:2n-6 dietético resultaram em efeitos deletérios sobre os níveis de EPA (um importante modulador do sistema imunológico em peixes) no tecido muscular do salmão do atlântico (*Salmo salar*), ou seja, EPA foi preferencialmente oxidado comparado ao 18:2n-6, diferente de nossos resultados, onde os percentuais de *LC-PUFAs* não sofreram alterações em relação aos níveis de inclusão do OS nas dietas. Assim, a deposição de 18:2n-6 nos tecidos pode impactar o perfil lipídico final do produto, sendo um aspecto importante a ser considerado em formulações de dietas para peixes marinhos, especialmente quando o objetivo é aumentar os níveis de n-3, que são AGs fisiologicamente mais relevantes para a saúde humana. A deposição de EPA e DHA aumentou conforme o aumento dos níveis destes AGs nas dietas experimentais. No entanto, nos animais alimentados com a dieta OP que, continha o maior percentual de DHA dentre os quatro tratamentos, não foi observada uma taxa de deposição positiva (maior que a concentração da dieta) na musculatura, evidenciando que somente o elevado percentual de *LC-PUFA* na dieta não é responsável pela sua maior deposição nos tecidos. Com isso sugere-se que os níveis de DHA e EPA presentes na dieta OP estejam acima das necessidades nutricionais para os animais experimentais nestas condições específicas de cultivo. Na nutrição em aquicultura é imprescindível fornecer níveis adequados de *LC-PUFAs* de acordo com as necessidades específicas de diferentes espécies em diferentes fases de vida, uma vez que em excesso estes nutrientes podem ser catabolizados pelos animais, acarretando um maior custo produtivo já que os ingredientes ricos neste grupo de AGs possuem custo elevado (ex. óleo de peixe de boa qualidade e extratos de algas) comparado a fontes ricas em *SFAs* e *MUFAs* (ex. óleos vegetais). Adicionalmente em estudo prévio Trushenski *et al*. (2012) atestou que EPA é “dispensável” e comumente catabolizado por juvenis de bijupirá quando inserido em excesso na dieta.

No tecido hepático EPA e ARA foram menos depositados, enquanto DHA mais depositado. Este resultado sugere que EPA e ARA possam estar sendo catabolizados pelos animais, assim como sugerido por Trushenski *et al*. (2012), ou podem ainda estarem sendo convertidos em outras moléculas, em especial eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), já que ambos AGs são precursores e competem pelas vias de síntese destas biomoléculas. No entanto, análises adicionais como a quantificação plasmática de prostaglandinas, são necessárias para suportar esta hipótese. Os resultados obtidos neste estudo, assim como estudos prévios reportaram que de maneira geral os animais comumente retêm os AGs na mesma proporção aos obtidos na dieta, como previamente reportado (BELL E SARGENT, 2003; TOCHER, 2003; GLENCROSS, 2009). Entretanto, esse paradigma pode ser alterado pela influência de várias outras variáveis, especialmente especificidade do tecido, composição da dieta, temperatura e também pelas proporções de cada AG (TOCHER, 2003).

A composição dos tecidos lipolíticos e lipogênicos em peixes é diretamente afetado pela expressão diferencial de genes relacionados à síntese e catabolismo de AGs (LEAVER *et al*., 2008). Apesar de não ser observada nenhuma alteração significativa na expressão relativa dos genes avaliados, algumas importantes tendências foram reportadas. O gene *fas* juntamente com o *acsl* se caracterizam como genes de função lipogênica. O *fas* está envolvido na síntese *de novo* de AGs, catalisando a conversão de precursores como o acetil-CoA e malonil-CoA em AGs, os principais produtos resultantes da lipogênese são o 16:0 e 18:0 (TOCHER, 2003; ARAÚJO *et al*., 2023).

Jin *et al*. (2018) sugere que uma maior razão n-3/n-6 está, na maioria dos casos, relacionado com maiores percentuais de *LC-PUFAS* nos tecidos, o que condiz com os resultados observados neste estudo. Portanto, em estudo realizado com goraz preto, Jin *et al*. (2018) correlacionou a expressão de *fas* com a razão n-3/n-6, onde animais alimentados com dietas contendo as menores razões apresentaram maiores níveis de expressão de *fas*. Nossos resultados não corroboram os resultados observado por Jin *et al.* (2018) visto que, a expressão de *fas* foi inferior nos animais alimentados com a dieta contendo maior razão n-3/n-6 e consequentemente maiores percentuais de *LC-PUFAs* (representados principalmente pelo DHA), e inversamente superior nos animais alimentados com as dietas a base de OS, que continham menores razões. Adicionalmente, a expressão do *fas* aumentou conforme a razão desses AGs também aumentou na dieta, sendo maior para D1, seguido por D2 e D3. Já Marques *et al*. (2021) no estudo com bijupirá, correlacionou a maior expressão observada para *fas* com os níveis mais baixos de *SFAs* dietéticos. Com relação aos resultados referentes as dietas a base de OS essa correlação foi semelhante, visto que a expressão de *fas* aumentou

conforme o percentual dietético de *SFAs* diminuiu. Com base nas divergências e convergências observadas nestes estudos prévios, sugere-se que a expressão de *fas* possa ter sido modulada não apenas pelos baixos níveis de *SFAs*, mas também por maiores níveis de DHA na dieta OP, com possível influência também dos altos níveis de 18:2n-6 presentes nas dietas contendo OS.

Dentre outras funções o gene *acsl*, é responsável por converter AGs de cadeia longa (incluindo os C18 *PUFAs*), por meio da ligação destes à coenzima A (CoA), formando o acil-CoA, um essencial substrato capaz de modular diversas vias metabólicas celulares, que incluem síntese, oxidação, armazenamento de AGs nos tecidos e conversão em lipídios sinalizadores (SOUPENE *et al*., 2008; LOPES-MARQUES *et al*., 2013). Betancor *et al*., (2018) em um estudo com o salmão do atlântico, observou expressão negativa de *acsl* em relação a altos níveis de DHA e EPA dietéticos, no entanto contrariamente Yang *et al*. (2022) observou que a expressão de *acsl* em golden pompano (*Trachinotus ovatus*) aumentou significativamente em dietas contendo OS, enquanto os níveis dietéticos de n-3 e a razão DHA/EPA não tiveram efeito significativo sobre a expressão deste gene. Adicionalmente neste estudo, uma expressão menor de *acsl* foi observada em peixes alimentados com dietas a base de OP comparado com peixes alimentados com dietas a base de OS e banha. Enquanto em nossos resultados, a tendência observada foi de menor expressão *acsl* no grupo OP em comparação com as dietas a base de OS, o que pode ter influência tanto dos altos níveis de DHA na dieta controle. Adicionalmente é possível que a tendência observada de maior expressão *acsl* nos grupos contendo OS (D1, D2 e D3) pode estar relacionada com o alto nível de 18:2n-6, onde dependem da função *acsl* para serem depositados nos tecidos.

Os genes *cpt1a* e *acox1* são caracterizados como genes lipolíticos estando intimamente relacionados com as vias do catabolismo de AGs (LEAVER *et al*., 2008). A expressão do gene *cpt1a* (responsável por transportar AGs acima de 12 carbonos para o interior das mitocôndrias, precedendo a sua oxidação), não apresentou nenhuma alteração significativa nos animais alimentados com as quatro diferentes dietas experimentais testadas. A expressão inferior deste gene (comparado aos demais genes), nos animais provenientes dos grupos D1, D2 e D3, poderia estar relacionada aos níveis de 12:0 no tecido hepático já que este AG, não depende da ação do *cpt1a* para ser oxidado na mitocôndria. No entanto os animais alimentados com a dieta controle, que não contém o 12:0, também apresentaram expressão similar a observada nas demais dietas, sugerindo que a expressão do *cpt1a* não foi influenciada apenas por este *SFA*, mas sim pela composição da dieta como um todo. Sabe-se que a lipogênese (em nosso trabalho representado pelo gene *fas*) tende a inibir a ação de *cpt1a*

(TOCHER, 2003). No entanto, mesmo com as variações nos valores de expressão de *fas*, a expressão de *cpt1a* não foi significativamente alterada, apesar de ser possível notar uma leve tendência de diminuição do *cpt1a* a medida que a expressão de *faz* aumenta, ainda, o gene *cpt1a* tende a ser mais expresso durante períodos de jejum, porém mesmo com os animais estando em um jejum por 12 horas a partir do momento da coleta, isso não resultou em variações na expressão deste gene. Resultados semelhantes foram observados por Marques *et al.* (2021) e Araújo *et al*. (2018) em estudos realizado com bijupirá e garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* respectivamente, onde dietas com diferentes composições não resultaram em diferenças significativas na expressão *cpt1a*.

Acox1, é considerado um gene lipolítico e atua na primeira etapa da β-oxidação peroxissomal (LEAVER *et al*., 2008), que normalmente ocorre quando um AG possui uma cadeia grande demais para ser metabolizado diretamente na mitocôndria, sendo necessário uma diminuição de sua cadeia nos peroxissomos para então seguirem para a oxidação mitocondrial. Nossos resultados foram consistentes entre os diferentes grupos, com uma leve tendência a maior expressão deste gene pelos animais alimentados com a dieta D1, ou seja, com maior percentual de *SFA,s* e inversamente menor percentual de *LC-PUFAs*, diferente ao observado na literatura (TAJ *et al*., 2020; SU *et al*., 2021), uma vez que maiores níveis de expressão deste gene estão associados a maiores níveis de DHA e EPA. No entanto, por se tratar de uma apenas uma tendência os resultados obtidos podem ser reflexo de uma variação individual dentro dos grupos experimentais. Estudos nutricionais com *Salmo salar* mostraram que *MUFAs*, principalmente o 18:1n-9, é o principal AG oxidado pelo peroxissomo no fígado, e suas concentrações influenciam diretamente a expressão de genes relacionados a esta via (BELL *et al*., 2003; STUBHAUG *et al*., 2006; TORSTENSEN *et al*., 2004). Assim, nossos resultados podem estar relacionados com a composição das dietas, uma vez que o maior percentual do 18:1n-9 dietético foi na dieta D1 e o menor na dieta OP, enquanto D2 e D3 tiveram valores próximos. Os resultados obtidos neste estudo, diferem daqueles observados em garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*) por Araújo *et al*. (2018), na qual a expressão *acox1* foi significativamente diferente entre as dietas experimentais, porém as alterações não tiveram relação com os níveis dietéticos do 18:1n-9 que foram semelhantes entre as dietas testadas. Os resultados da expressão gênica relativa, foram de maneira geral, contraditórios comparados aos já reportados na literatura para o bijupirá e outras espécies de peixes marinhos, atestando para a necessidade da realização de mais experimentos que investiguem a influência da composição da dieta nas vias de síntese e oxidação de AGs, uma

vez que trabalhos relacionados com estas vias metabólicas em peixes marinhos são incipientes.

A inclusão de níveis mais altos de OV nas dietas para organismos marinhos podem alterar a morfologia padrão dos hepatócitos, influenciando em um desequilíbrio na composição de AGs, comprometendo assim a integridade do tecido hepático e comumente resultando em uma maior deposição lipídica (CABALLERO *et al*., 2004). A síntese e oxidação de AGs no fígado e as enzimas envolvidas nessas vias têm uma relação direta com a disponibilidade de AGs em tecidos específicos (HENDERSON, 1996). Quando os lipídios estão em excesso na dieta, ou quando a síntese de proteínas é comprometida, há um aumento na síntese e deposição de triglicerídeos nos hepatócitos, resultando em um padrão morfológico patológico conhecido como esteatose hepática, que é resultante do acúmulo de gordura especificamente neste tecido (CABALLERO *et al*., 2004). Os resultados relacionados com a área dos vacúolos lipídicos dos hepatócitos apontaram para maior deposição lipídica nos animais do grupo alimentado com a dieta contendo OP. No entanto, os três diferentes níveis de inclusão do OS também resultaram em uma deposição lipídica diferenciada nos hepatócitos dos animais dos grupos D1, D2 e D3, onde é possível observar que quanto menor foi o percentual de 18:2n-6 menor foi a deposição lipídica, essa tendência de retenção do 18:2n-6 no fígado já foi relatada antes por Francis *et al*., (2007) e Zheng *et al*. (2005). Diferente ao observado neste estudo, Marques *et al*., (2021) em estudo com juvenis da mesma espécie, observou menor deposição lipídica no tecido hepático de animais alimentados com dietas tendo como base lipídica OP, e de acordo com este autor, este resultado pode estar relacionado com processos de catabolismo seletivo. Com exceção do 12:0 (preferencialmente metabolizado comparado a outros *SFAs*), o excesso de *SFAs* e *MUFAs* na dieta comumente resulta em maior deposição lipídica no tecido hepático de teleósteos (YIN *et al*., 2021; XU *et al*., 2018). Portanto, a maior deposição lipídica nos hepatócitos dos animais do grupo OP pode estar relacionado com maiores níveis dos AGs 16:0 e 16:1 da dieta comparado as outras dietas experimentais, como já foi relatado por Feng *et al*. (2018) e Jiang et al. (2019). No entanto, não foi observada diferença significativa na medida dos vacúolos entre os animais dos grupos OP e D1. Assim, como para alguns *SFAs* e *MUFAs* específicos, estudos prévios mostraram que dietas com baixa razão n3/n6 podem diretamente resultar em maior deposição lipídica no tecido hepático, comumente resultando em quadros de esteatose (CABALLERO *et al*., 2004).

Aparentemente, os resultados obtidos neste estudo corroboram esta hipótese, já que os animais do grupo D1 (razão n3/n6 = 0,07) apresentaram maiores áreas de vacúolo lipídico nos hepatócitos comparados aos animais dos grupos D2 (razão n3/n6 = 0,24) e D3 (razão n3/n6 =

0,64), dado principalmente pelo elevado nível de inclusão do 18:2n-6 proveniente do OS. Portanto, as diferenças observadas na morfologia dos hepatócitos podem em geral ser justificadas pelo excesso de *SFAs* e *MUFAs* específicos na dieta OP e também pelo excesso do 18:2n-6 (que por consequência reduziu a razão n3/n6) presente na dieta D1. Adicionalmente Bian *et al*. (2024) relatou que o DHA é capaz de reduzir a deposição hepática de lipídios, principalmente por estimular a lipólise. No entanto, esse efeito não foi observado na dieta OP com maiores níveis de DHA, e em relação as dietas contendo OS, a diminuição do vacúolo lipídico foi proporcional ao aumento de níveis de DHA.

Os lipídios são a principal fonte de energia para peixes ósseos, e o fígado é considerado o tecido lipolítico central (especialmente em jejum) e, notavelmente, um depósito de gordura essencial para energia em várias espécies (TOCHER, 2003; TURCHINI *et al*., 2009). Apesar das diferenças observadas na área dos hepatócitos dos diferentes grupos experimentais, os parâmetros relacionados com a performance produtiva não evidenciaram nenhuma condição patológica que pudesse ser considerada prejudicial ou fora dos padrões já observados antes para a mesma espécie (ARAÚJO *et al*., 2019; MARQUES *et al*., 2021).

5. CONCLUSÃO

Este estudo é o primeiro a testar dietas livres de OP para juvenis de bijupirá, utilizando como fonte lipídica o OS e OC suplementados com *LC-PUFAs* essenciais para peixes marinhos (DHA, EPA e ARA). A substituição do OP pelo OS em diferentes níveis de inclusão nas dietas experimentais, não acarretou em alterações significativas em relação ao desempenho produtivo dos diferentes grupos experimentais, corroborando a hipótese de que desde que adequadamente suplementado com *LC-PUFA*s n-3, o OS pode ser considerado um ingrediente viável para a nutrição de juvenis de bijupirá em detrimento ao OP.

Os resultados de composição de AGs dos tecidos analisados apontam ainda para o catabolismo preferencial por *SFAs*, em especial o 12:0, um AG de uso estratégico em formulações dietéticas para peixes, especificamente em carnívoros marinhos, que pode resultar em um efeito poupador de *LC-PUFAs*, que pode ser principalmente observado na maior otimizando custos produtivos, sem impactar a performance de crescimento e qualidade do produto final. Ainda, nossos resultados demonstraram uma maior deposição (retenção) de DHA nos animais alimentados com a dieta alternativa D3 em comparação com a dieta OP, gerando um filé mais rico em n-3, agregando um valor econômico e nutricional ao pescado maior do que o obtido com uso do OP.

REFERÊNCIAS

AHLGREN, G.; ZENEBE, Z.; GUSTAFSSON, I. B. Fatty acid and lipid content of *Oreochromis niloticus* L. in Ethiopian lakes—dietary effects of phytoplankton. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 3, p. 308-316, 2006.

ARAÚJO, B. C.; BARBOSA, D. A.; HONJI, E. M.; BRANCO, G. S.; MENEGIDIO, F. B.; MARQUES, V. H.; MOREIRA, R. G.; KITAHARA, M. V.; ROMBENSO, A. N.; MELLO, P. H.; HILSDORF, A. W. S. Post-feeding Molecular Responses of Cobia (*Rachycentron canadum*): RNA-Sequencing as a Tool to Evaluate Postprandial Effects in Hepatic Lipid Metabolism. **Marine Biotechnology**, v. 25, n.3, p. 358–371, jun. 2023.

ARAÚJO, B. C.; WADE, M. W.; DE MELLO, P. H.; RODRIGUES-FILHO, J. A.; GARCIA, C. E. O.; DE CAMPOS, M. F.; BOTWRIGHT, N.; HASHIMOTO, D. T.; MOREIRA, R. G. Characterization of lipid metabolism genes and the influence of fatty acid supplementation in the hepatic lipid metabolism of dusky grouper (*Epinephelus marginatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 219-220, p. 1-9, 2018.

ARAÚJO, B.; RODRIGUEZ, M.; HONJI, R. M.; ROMBENSO, A. N.; RIO-ZARAGOZA, O. B.; CANO, A.; TINAJERO, A.; MATA-SOTRES, J. A.; VIANA, M. T. Arachidonic acid modulated lipid metabolism and improved the productive performance of striped bass (Morone saxatilis) juveniles under sub- to optimal temperatures. **Aquaculture**, v. 530, art. 735939. 2021.

ARAÚJO, B.; SALINI, M.; GLENCROSS, B.; WADE, N. The influence of dietary fatty acid and fasting on the hepatic lipid metabolism of barramundi (Lates calcarifer). Aquaculture Research, v. 47, n. 7, p. 3879–3893. 2016.

ARAÚJO, B.C.; HONJI, R.M.; ROMBENSO, A.N.; SOUZA-BRAMBILA, G.; MELLO, P.H.; HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA, R.G. Influences of different arachidonic acid levels and temperature on the growth performance, fatty acid profile, liver morphology and expression of lipid genes in cobia (*Rachycentron canadum*) juveniles. **Aquaculture**, v. 511, art. 734245, 2019.

ARNOLD, C. R.; KAISER, J. B.; HOLT, G. J. Spawning of cobia (*Rachycentron canadum*) in captivity. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 33, p. 205-208, 2002.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; NETO, A. G. F. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, 1976. 239 p.

BELL, J. G.; SARGENT, J. R. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. **Aquaculture**, v. 218, p. 491–499. 2003.

BENETTI, D.D.; O'HANLON, B.; RIVERA, J.A.; WELCH, A.W.; MAXEY, C.; ORHUN, M.R. Growth rates of cobia (Rachycentron canadum) cultured in open ocean submerged cages in the Caribbean. **Aquaculture**, v. 302, p. 195–201. 2010.

BENETTI, D.D.; ORHUN, R.; SARDENBERG, B.; O'HANLON, B.; WELCH, A.; HOENIG, R.; ZINK, I.; RIVERA, J.A.; DENLINGER, B.; BACOAT, D.; PALMER, K.;

CAVALIN, F. Advances in hatchery and grow-out technology of cobia Rachycentron canadum (Linnaeus). **Aquaculture Resources**, v. 39, p. 701–711. 2008.

BENETTI, D.D.; TURCHINI, G.M.; ORHUN, R.; SARDENBERG, B.; O'HANLON, B.; ZINK, I.; PALMER, K.; HOENIG, R.; DENLINGER, B. Advances in hatchery and grow-out technology of cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture Resources**, v. 39, p. 701–711. 2009.

BERGE, G. M.; WITTEN, P. E.; BAEVERFJORD, G.; VEGUSDAL, A.; WADSWORTH, S.; RUYTER, B. Diets with different n-6/n-3 fatty acid ratios in diets for juvenile Atlantic salmon: effects on growth, body composition, bone development, and eicosanoid production. **Aquaculture**, v. 296, n. 3–4, p. 299-308, Nov. 16, 2009.

BETANCOR, M. B.; LI, K.; BUCERZAN, V. S.; SPRAGUE, M.; SAYANOVA, O.; USHER, S.; HAN, L.; NORAMBUENA, F.; TORRISSEN, O.; NAPIER, J. A.; TOCHER, D. R.; OLSEN, R. E. Transgenic Camelina sativa oil containing more than 25% long-chain n-3 PUFA as the main lipid source in Atlantic salmon (*Salmo salar*) feeds. **Cambridge University Press**, p. 30, 2018.

BIAN, C.; JI, S.; ZENG, C.; SUN, J.; KANEKO, G.; JI, H. Docosahexaenoic acid (DHA) alleviates hepatic lipid accumulation by regulating mitochondrial quality control through ERK signaling pathway in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 579, art. 740209, 2024.

BRETT, M. T.; MÜLLER-NAVARRA, D. C.; PERSSON, J. Crustacean zooplankton fatty acid composition. In: ARTS, M. T.; BRETT, M. T.; KAINZ, M. J. (eds.). **Lipids in aquatic ecosystems**. New York: Springer, p. 115–146. 2009.

BRIGGS, J. C. Fishes of worldwide (circumtropical) distribution. **Copeia**, v. 1960, n. 3, p. 171–180. 1960.

BROWN-PETERSON, N. J.; OVERSTREET, R. M.; LOTZ, J. M.; FRANKS, J. S.; BURNS, K. M. Reproductive biology of cobia, *Rachycentron canadum*, from coastal waters of the southern United States. **Fishery Bulletin**, v. 99, p. 15-28, 2001.

BUREAU, D. P.; KAUSHIK, S. J.; CHO, C. Y. Bioenergetics. *In*: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (ed.). **Fish nutrition**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 1-59.

CABALLERO, M.J., IZQUIERDO, M.S., KJØRSVIK, E., FERNANDEZ, A.J., ROSENLUND, G. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata L*., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. **J. Fish Dis**. v. 27, p. 531–541. 2004.

CARVALHO FILHO, A. **Peixes: costa brasileira**. 3. ed. São Paulo: Melro, 1999.

CAVALLI, R. O.; HAMILTON, S. A piscicultura marinha no Brasil - Afinal, quais as espécies boas para cultivar? **Panorama da Aqüicultura**, v. 17, n. 104, p. 50-55, 2007.

CAVALLI, R.O.; DOMINGUES, E.C.; HAMILTON, S. Desenvolvimento da produção de peixes marinhos em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 151–164. 2011.

CECCHI, T.; PASSAMONTI, P.; CECCHI, P. Study of the quality of extra virgin olive oil stored in PET bottles with or without an oxygen scavenger. **Food Chemistry**, v. 120, p. 730–735. 2010.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 446 p.

CHANG, D. O cultivo do beijupirá em Taiwan: a escolha de um peixe de carne branca para consumidores exigentes. **Panorama da Aquicultura**, v. 13, n. 79, p. 43-49, 2003.

CHEN, Y.; SUN, Z.; LIANG, Z.; XI, Y.; SU, J.; LUO, Q.; ZHU, J.; LIU, Q.; HAN, T.; WANG, A. Effects of dietary fish oil replacement by soybean oil and L-carnitine supplementation on growth performance, fatty acid composition, lipid metabolism and liver health of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. **Aquaculture,** v. 516, art. 734596, 2019.

CHEN, Y.; SUNA, Z.; LIANG, Z.; XIEB,Y.; SUB, J.; LUOB, Q.;ZHUB, J.; LIU, Q.; HAN, T.; WANG, A. Effects of dietary fish oil replacement by soybean oil and L-carnitine supplementation on growth performance, fatty acid composition, lipid metabolismo and liver health of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. **Aquaculture,** v. 516, art. 734596. 2020.

CHOU, R. L.; HER, B. Y.; SU, M. S.; HWANG, G.; WU, Y. H.; CHEN, H. Y. Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**, v. 299, p. 325–333. 2004.

CHOU, R. L.; SU, M. S.; CHEN, H. Y. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v. 193, p. 81-89, 2001.

CHRISTIE, W.W. 2003. Lipids analysis. The only press, Bridgwater.

CRAIG, S. R.; SCHWARZ, M. H.; McLEAN, E. Juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) can utilize a wide range of protein and lipid levels without impacts on production characteristics. **Aquaculture**, v. 261, p. 384-391, 2006.

DE SILVA, S. S.; ANDERSON, T. A. **Fish nutrition in aquaculture**. London: Chapman & Hall, 1995.

DU, J.; XU, H.; LI, S.; CAI, Z.; MAI, K.; AI, Q. Effects of dietary henodeoxycholic acid on growth performance, body composition and related gene expression in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) fed diets with high replacement of fish oil with soybean oil. **Aquaculture**, v. 479, p. 584–590. 2017.

EMRE, Y.; KURTOGLU, A., EMRE, N.; GUROL, B.; GUROY, D. Effect of replacing dietary fish oil with soybean oil on growth performance, fatty acid composition and

haematological parameters of juvenile meagre, Argyrosomus regius. **Aquaculture Research**, v. 47, n. 7, p. 2256–2265. 2015.

ENES, P.; PANSERAT, S.; KAUSHIK, S.; OLIVA-TELES, A. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 519–539. 2009.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**
: meeting the sustainable development goals. Rome: FAO, 2018. *E-book*. Disponível em: https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/6fb91ab9-6cb2-4d43-8a34-a680f65e82bd/content. Acesso em: 14 maio 2024.

FAULK, C. K.; KAISER, J. B.; HOLT, G. J. Growth and survival of larval and juvenile cobia *Rachycentron canadum* in a recirculating raceway system. **Aquaculture**, v. 270, p. 149–157. 2007.

FELIX, F. C.; HACKRADT, C. W. Interaction between *Rachycentron canadum* and *Epinephelus itajara*, on the Paraná coast, Brasil**. Coral Reefs**, v. 27, p. 633, 2008.

FENG, L.; YANG, R.; LIU, Y.; JIANG, W.; WU, P.; TANG, L. Hepatic lipid accumulation induced by dietary oleic acid (18:1n-9) in fish: A role of lipogenic gene upregulation and oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 230, p. 16-24, 2019.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. III. Teleostei (2). São Paulo: **Museu de Zoologia/USP**. p. 90. 1980.

FOLCH, J.; LESS, M.; STANLEY, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 226, p. 497–503.

FRANCIS, D. S.; TURCHINI, G. M.; JONES, P. L.; DE SILVA, S. S. Dietary lipid source modulates the fatty acid composition of hepatic lipid classes in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 269, n. 1-4, p. 305-314, 2007.

FRANKS, J. S.; OGLE, J. T.; LOTZ, J. M.; NICHOLSON, L. C.; BARNES, D. N.; LARSEN, K. M. Spontaneous spawning of cobia, Rachycentron canadum, induced by human chorionic gonadotropin (HCG), with comments on fertilization, hatching, and larval development. **Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, v. 52, p. 598–609. 2001.

FRASER, T.W.K.; SIMON, J.D. Nutritional requirements of cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus): a review. **Aquaculture Research,** v. 40, p. 1219–1234. 2009.

FRINGS, C. S.; FENDLY, T. W.; Dunn, R. T.; Quenn, C. A. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. **Clinical Chemistry**, v. 18, p. 673–674. 1972.

GLENCROSS, B. D. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. **Rev Aquac**., v. 1, p. 71–124. 2009.

GONZALEZ-FELIX, M.L.; MALDONADO-OTHON, C.A.; PEREZ-VELAZQUEZ, M. Effect of dietary lipid level and replacement of fish oil by soybean oil in compound feeds for the shortfin corvina (Cynoscion parvipinnis). **Aquaculture**, v. 454, p. 217–228. 2016.

GOU, N.; Ji, H.; Chang, Z.; Zhong, M.; Deng, W. Effects of dietary essential fatty acid requirements on growth performance, fatty acid composition, biochemical parameters, antioxidant response and lipid related genes expression in juvenile *Onychostoma macrolepis*. **Aquaculture** v. 528, art. 735590. 2020.

GRANT, G. S.; FERREL, D. Leatherback turtle, Dermochelys coriacea (Reptilia: Dermochelidae): Notes on near-shore feeding behavior and association with cobia. Brimleyana, v. 19, p. 77-81, 1993.

GUESNET, P.; ALESSANDRI, J.M. Ácido docosahexaenóico (DHA) e o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) - implicações para recomendações dietéticas. **Biochimie**, v. 93, p. 7–12. 2011.

GUO, H.; CHEN, C.; YAN, X.; LI, Y.; WEN, X.; YOU, C.; MONROIG, O.; TOCHER, D. R.; WANG, S. Effects of different dietary oil sources on growth performance, antioxidant capacity and lipid deposition of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus*. **Aquaculture**, v. 530, p. 735923, 2020.

HASSLER, W. W.; RAINVILLE, R. P. Techniques for hatching and rearing cobia, Rachycentron canadum, through larval and juvenile stages. Raleigh: **University of North Carolina Sea Grant College Program**, 1975. 26 p. (Report, UNC-SG-75-30).

HENDERSON, R.J. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. **Arch. Anim. Nutr**., v. 49, p. 5–22. 1996.

HOLT, G. J.; FAULK, C. K.; SCHWARZ, M. H. A review of the larviculture of cobia, *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. **Aquaculture**, v. 268, p. 181–187. 2007.

HOLT, G. J.; FAULK, C. K.; SCHWARZ, M. H. A review of the larviculture of cobia Rachycentron canadum, a warm water marine fish. **Aquaculture**, v. 268, n. 1-4, p. 181–187, 2007.

HONJI, R. M.; CANEPPELE, D.; PANDOLFI, M.; LO NOSTRO, F. L.; MOREIRA, R. G. Gonadotropins and growth hormone family characterization in an endangered Siluriform species, *Steindachneridion parahybae* (Pimelodidae): relationship with annual reproductive cycle and induced spawning in captivity. **Anatomical Record**, v. 298, p. 1644-1658, 2015.

IBEAS, C.; CEJAS, J.; GÓMEZ, T.; JEREZ, S.; LORENZO, A. Influence of dietary n-3 highly unsaturated fatty acid levels on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 142, n. 3–4, p. 221-235, June 20, 1996.

IBEAS, C.; IZQUIERDO, M. S.; LORENZO, A. Effect of different levels of highly unsaturated n-3 fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture,** v. 127, n. 2–3, p. 177-188, Nov. 1, 1994.

COLLETTE, B.B.; CURTIS, M.; WILLIAMS, J.T.; SMITH-VANIZ, W.F.; PINA AMARGOS, F. *Rachycentron canadum*. *In*: **The IUCN Red List of Threatened Species 2015**: e.T190190A70036823. 2015. Disponível em: https://www.iucnredlist.org/species/190190/70036823. Acesso em: 14 mai. 2024.

IZQUIERDO, M. S.; OBACH, A.; ARANTZAMENDI, L.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; ROSENLUND, G. Dietary lipid sources for sea bream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. **Aquaculture Nutrition**, v. 9, p. 397-407, 2003.

JIN, M.; LU, Y.; PAN, T.; ZHU, T.; YUAN, Y.; SUN, P.; ZHOU, F.; DING, X.; ZHOU, Q. Effects of the n-3 LC-PUFA/n-6 C18 PUFA ratio in the diet on growth, feed utilization, fatty acid composition, and gene expression related to lipid metabolism in black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*. **Aquaculture**. p. 521–531. 2019.

JIANG, W. D.; WU, P.; LIU, Y.; JIANG, J.; KUANG, S. Y.; TANG, L.; FENG, L. Excess dietary saturated fatty acids induce hepatic lipid accumulation, inflammation and oxidative stress via modulation of lipid metabolism-related genes in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, Oxford, v. 223, p. 88-97, 2019.

KAKELA, R.; ACKMAN, R. G.; HYVARINEN, H. Very long chain polyunsaturated fatty acids in the blubber of ringed seals (*Phoca hispida botnica*) from lake Saimaa, lake Ladoga, the Baltic Sea, and Spitsbergen. **Lipids**, v. 30, p. 319–325. 1995.

LAMICHHANE, S.; SAHTOUT, K.; SMILLIE, J.; SCOTT, T. A. Vacuum coating of pelleted feed for broilers: opportunities and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v. 200, p. 1-7, 2015.

LEAVER, M. J.; VILLENEUVE, L. A. N.; OBACH, A.; JENSEN, L.; BRON, J. E.; TOCHER, D. R.; TAGGART, J. B. Genomic functional reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary fish oil replacement with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **BMC Genomics**, v. 9, art. 299, 2008.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. 7ª Ed. São Paulo: **Sarvier**, p. 839, 2017.

LI, C.; XU, Y.; LI, X.; WANG, X.; WANG, Z.; YANG, Y.; ZHU, X.; WANG, Y. Effects of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth performance, muscle fatty acid composition, and intermediary metabolism in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). **Front. Physiol**., 2020.

LIAO, I. C.; HUANG, T. S.; TSAI, W. S.; HSUEH, C. M.; CHANG, S. L.; LEAÑO, E. M. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. **Aquaculture**, v. 237, p. 155–165. 2004.

LIAO, I. C.; LEAÑO, E. M. **Cobia aquaculture: research, development and commercial production**. Taiwan: Asian Fisheries Society, 2007. 178 p.

ALMEIDA, N. M.; BUENO FRANCO, M. R. Influência da dieta alimentar na composição de ácidos graxos em pescado: aspectos nutricionais e benefícios à saúde humana. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 1, p. 7–14. 2006.

LIN, J. H. Y.; CHEN, T. Y.; CHEN, M. S.; CHEN, H. E.; CHOU, R. L.; CHEN, T. I.; SU, M. S.; YANG, H. L. Vaccination with three inactivated pathogens of cobia (Rachycentron canadum) stimulates protective immunity. **Aquaculture**, v. 255, n. 1-4, p. 125–132. 2006.

LOPES-MARQUES, M.; CUNHA, I.; REIS-HENRIQUES, M. A.; SANTOS, M. M.; CASTRO, L. F. C. Diversity and history of the long-chain acyl-CoA synthetase (Acsl) gene family in vertebrates. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, p. 271, 2013.

MARQUES, V.H.; MOREIRA, R.G.; BRANCO, G.S.; HONJI, R.M.; ROMBENSO, A.N.; VIANA, M.T.; MELLO, P.H.; MATA-SOTRES, J.A.; ARAÚJO, B.C. Different saturated and monounsaturated fatty acids levels in fish oil-free diets to cobia (*Rachycentron canadum*) juveniles: effects in growth performance and lipid metabolism. **Aquaculture** v. 541, art. 73684. 2021.

MARTÍNEZ-LLORENS, S.; VIDAL, A. T.; MONINO, A. V.; TORRES, A. L.; CERDÁ, M. J. Effects of dietary soybean oil concentration on growth nutrient utilization and muscle fatty acid composition of gilthead sea bream (*Sparus auratus L*.). **Aquaculture Research**, v. 38, p. 76-81, 2007.

MONTEIRO-TORREIRO, C. M. Aspectos bioquímicos e fisiológicos dos lipídios na nutrição de peixes. In: Nutrição e alimentação de peixes e camarões marinhos. São Paulo: Editora **Varela**, p. 123-145, 1998.

MOURENTE, G.; TOCHER, D. R. Incorporação e metabolismo de ácidos graxos poliinsaturados marcados com 14C em juvenis selvagens de salmonete, *Liza aurata*, in vivo. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 12, p. 119-130, 1993.

MOURENTE, G.; TOCHER, D. R. The in vivo incorporation and metabolism of [1-14C] linolenic acid (18:3n-3) in a marine fish: *Dicentrarchus labrax L*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 10, n. 5, p. 395-407, 1998.

MURRAY, R. K. **Bioquímica**. 7ª Ed. São Paulo: Atheneu, p. 763, 1994.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, DC: **National Academy Press**, 2011.

NAYAK, M.; SAHA, A.; PRADHAN, A.; SAMANTA, M.; GIRI, S. S. Dietary fish oil replacement by linseed oil: effect on growth, nutrient utilization, tissue fatty acid composition and desaturase gene expression in silver barb (*Puntius gonionotus*) fingerlings. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 205, p. 1-12, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: Principles of biochemistry. **Freeman, New York**. pp.1119, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: Principles of Biochemistry. **New York: Freeman**, p. 341-362, 2018.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. Fisheries of the world. 5ª Edição. Hoboken, New Jersey, **John Wiley & Sons**, p. 384, 2016.

NORDAHL, G. Is the Aquaculture Industry Caught in a Fishmeal Trap? Master Thesis in Economic Analysis. **Norwegian School of Economics and Business Administration**, p.109, 2011.

(NRC) NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp: Agriculture Handbook No. 74. Washington, D.C.: **National Academies Press**, 2011.

NUNES, A. J. P. Ensaios com o beijupirá, *Rachycentron canadum*. **Ministério da Pesca e Aquicultura**, CNPq, Ceará. 352p, 2014.

OGORI, A. F. Source, extraction and constituents of fats and oils. **Journal of Food Science and Nutrition**, v. 6, p. 2-8, 2020.

OGORI, A.F. Source, extraction and constituents of fats and oils. **J. Food Sci. Nutr**., 6, 2–8, 2020.

OLSEN, Y. Live food technology of cold-water marine fish larvae. In: MOKSNESS, E.; KJORSVIK, E.; OLSEN, Y. (Eds.). Culture of cold-water marine fish. **Oxford: Blackwell Publishing Ltd**, p. 73-128, 2004.

PEIXE BR – Associação Brasileira da Piscicultura. Anuário Peixe BR da Piscicultura 2024. Maringá: Peixe BR, 2024. Disponível em: https://www.peixebr.com.br/anuario-2024.

PENG, M.; XU, W.; MAI, K.; ZHOU, H.; ZHANG, Y.; LIUFU, Z.; ZHANG, K.; Ai, Q. 2014. Growth performance, lipid deposition and hepatic lipid metabolism related gene expression in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L*.) fed diets with various fish oil substitution levels by soybean oil. **Aquaculture**, v. 433, p. 442–449.

PIEDECAUSA, M. A.; MAZÓN, M. J.; GARCÍA GARCÍA, B.; HERNÁNDEZ, M. D. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diets. **Aquaculture**, v. 263, p. 211–219, 2007.

RAATZ, S.; BIBUS, D. Fish and fish oil in health and disease prevention. USA: **Academic Press**, 2016.

RAWN, J. D. *Biochemistry*. 2. ed. Boston: Neil Patterson Publishers, 1989.

RIBEIRO, P. A. P.; COSTA, L. S.; LOGATO, P. V. R. Lipídios para peixes. **Editora UFLA**. Lavras – MG, 2009.

RODRIGUES, R. V. Produção de peixe marinho dá novo passo no Brasil? **Aquaculture Brasil**, Laguna, ed. 17, mar./abr., p. 59. 2019.

RODRÍGUEZ, C.; LORENZO, A.; MARTÍN, V. **Nutrición lipídica**. In: SANZ, F. (ed.). La nutrición y alimentación en piscicultura. Madrid: CSIC, p. 153–274. 2009.

ROHIT, P.; BHAT, U. S. Fishery and diet composition of the cobia Rachycentron canadum (Linnaeus, 1766) exploited along Karnataka coast. **Indian Journal of Fisheries**, v. 59, n. 4, p. 61–65, 2012.

ROMBENSO, A. N.; TRUSHENSKI, J. T.; JIRSA, D.; DRAWBRIDGE, M. Docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA) are essential to meet LC-PUFA requirements of juvenile California yellowtail (Seriola dorsalis). Aquaculture, v. 463, p. 123–134. 2016.

ROMBENSO, A. N.; TRUSHENSKI, J. T.; JIRSA, D.; DRAWBRIDGE, M. Successful fish oil sparing in white seabass feeds using saturated fatty acid-rich soybean oil and 22:6n-3 (DHA) supplementation. Aquaculture, v. 448, p. 176–185. 2015.

ROMBENSO, A. N.; TRUSHENSKI, J. T.; SCHWARZ, M. H. Beef tallow is suitable as a primary lipid source in juvenile Florida Pompano feeds. Aquaculture Nutrition, v. 23, p. 1274–1286. 2017.

ROMBENSO, A. N.; TRUSHENSKI, J. T.; DRAWBRIDGE, M. Saturated lipids are more effective than others in juvenile California yellowtail feeds—understanding and harnessing LC-PUFA sparing for fish oil replacement. Aquaculture, v. 493, p. 192–203. 2018.

SARGENT, J. R. **Origins and functions of egg lipids: nutritional implications**. In: BROMAGE, N. R.; ROBERTS, R. J. (eds.). Broodstock management and egg and larval quality. Cambridge: University Press, p. 353–372. 1995.

SARGENT, J. R.; HENDERSON, R. J.; TOCHER, D. R. **The lipids**. In: HALVER, J. E. (ed.). Fish nutrition. 2. ed. San Diego: **Academic Press**, p. 153-218, 1989.

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 6, p. 943-954, 2016.

SCHUBART, O. Investigações sobre os viveiros do Recife. **Boletim da Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de Pernambuco**, v. 1, p. 153-176, 1936.

SHAFFER, R. V.; NAKAMURA, E. L. Synopsis of biological data on the cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). U.S. Department of commerce, Washington, D. C., USA, p. 20, 1989.

SILVA, J. E. **Fisioecologia do camorin (Centropomus undecimalis Bloch, 1972)**: estudo experimental de crescimento em ambiente confinado. 1976. Tese (Doutorado em Ciências e Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1976.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.

SISSENER, N. H.; ARAUJO, P.; SÆLEA, O.; ROSENLUND, G.; STUBHAUG, I.; SANDEN, M. Dietary 18:2n-6 affects EPA (20:5n-3) and ARA (20:4n-6) content in cell membranes and eicosanoid production in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). **Aquaculture**, v. 522, p. 735-798, 2020.

SOUPENE, E.; KUYPERS, F. A. Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. **Experimental Biology and Medicine** (Maywood), v. 233, n. 5, p. 507-521, 2008.

STUBHAUG, I.; LIE, O.; TORSTENSEN, B.E. 2006. β-oxidation capacity in liver increases during parr–smolt transformation of Atlantic salmon (*Salmo salar L*.) fed vegetable and fish oil. **J. Fish Biol**., v. 69, p. 504–517.

SU, X.; XU, Y.; LI, X.; WANG, X.; WANG, Z.; YANG, Y.; ZHU, X.; WANG, Y. The regulation of fenofibrate on lipid metabolism in obscure puffer (*Takifugu obscurus*) is dependent on dietary lipid content. **Aquac. Nutr**., v. 27, p. 782–791. 2021.

TELES, A. O.; ENES, P.; PERES, H. Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish. In: DAVIS, D.A. Feed and Feeding Practices in Aquaculture. **Elsevier P**. p. 203–233. 2015.

TOCHER, D. R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. **Rev Fish Sci**, v. 11, p. 107–184. 2003.

TORSTENSEN, B.E.; FROYLAND, L.; LIE, O. Replacing dietary fish oil with increasing levels of rapeseed oil and olive oil – effects on Atlantic salmon (*Salmo salar L*.) tissue and lipoprotein lipid composition and lipogenic enzyme activities. **Aquacult. Nutr**., v. 10, p. 175–192. 2004.

TRUSHENSKI, J. T.; BOWZER, J. C. Having your omega 3 fatty acids and eating them, too: strategies to ensure and improve the long-chain polyunsaturated fatty acid content of farm-raised fish. In: DE MEESTER, F.; WATSON, R. R.; ZIBADI, S. (eds.). Sustainable long chain omega-3 fatty acids in cardiovascular and mental health. **New York: Springer,** p. 319-340, 2013.

TRUSHENSKI, J.; SCHWARZ, M.; BERGMAN, A.; ROMBENSO, A.; DELBOS, B. DHA is essential, EPA appears largely expendable, in meeting the n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid requirements of juvenile cobia Rachycentron canadum. Aquaculture, v. 326–329, p. 81–89. 2012.

TRUSHENSKI, J.; SCHWARZ, M.; LEWIS, H.; LAPORTE, J.; DELBOS, B.; TAKEUCHI, R.; SAMPAIO, L.A. 2011. Effect of replacing dietary fish oil with soybean oil on production performance and fillet lipid and fatty acid composition of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, p. e437–e447.

TSENG, Y.; LIN, Y.-H. 2019. Effects of dietary supplementation with coconut oil on the growth, fatty acid profiles and some lipid metabolism relative gene expressions of orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. **Aquac. Nutr**., v. 26, n. 1, p. 1–10.

TURCHINI, G. M.; NG, W.-K.; TOCHER, D. R. Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. Boca Raton: Taylor & Francis, **CRC Press**, 2011.

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

VON IHERING, R. Criação de peixes em viveiros no Recife. **Boletim da Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de Pernambuco**, v. 1, p. 153-176, 1932.

WATANABE, T. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 24, p. 152-161, 1993.

WEIRICH, C. R.; SMITH, T. I. J.; DENSON, M. R. et al. Pond culture of larval and juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, in the Southeastern United States: initial observations. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 16, p. 27-44, 2004.

WOITEL, F. R.; TRUSHENSKI, J. T.; SCHWARZ, M. H.; JAHNCKE, M. L. More judicious use of fish oil in cobia feeds: I. Assessing the relative merits of alternative lipids. **North American Journal of Aquaculture**, v. 76, p. 222–231, 2014.

WOITEL, F.R.; TRUSHENSKI, J.T.; SCHWARZ, M.H.; JAHNCKE, M.L. 2014. More judicious use of fish oil in cobia feeds: II. Effects of graded fish oil sparing and finishing. **N. Am. J. Aquac**., v. 76, p. 232–241.

Xu, H., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Wang, J., Zhang, W. Effects of dietary lipid sources on growth performance, fatty acid composition and lipid metabolism in large yellow croaker *(Larimichthys crocea*). **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 6, p. 1960–1971. 2018.

XU, Z.-X.; DONG, X.-H.; LIU, C.-W. Necessidade dietética de zinco de juvenis de bijupirá (*Rachycentron canadum*). **Shui Chan Ke Xue**, v. 26, n. 3, p. 138-141, 2007.

YANG, Z.; ZHU, H.; HUANG, X.; WANG, Aimin; XIE, Dizhi. Molecular characterization, tissue distribution profile, and nutritional regulation of acsl gene family in golden pompano (*Trachinotus ovatus*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6437, 2022.

YANG, Z.; ZHU, H.; HUANG, X.; WANG, A.; XIE, D. Caracterização molecular, perfil de distribuição tecidual e regulação nutricional da família de genes acsl em Golden Pompano (*Trachinotus ovatus*). **Int. J. Mol. Sci**., v. 23, n. 12, art. 6437. 2022.

YILDIRIM-AKSOY, M.; LIM, C.; DAVIS, D.A.; SHELBY, R.; KLESIUS, P.H. 2007. Influence of dietary lipid sources on the growth performance, immune response, and resistance to Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Streptococcus iniae* challenge. **J. Appl. Aquac.**, v. 19, p. 29–49.

YIN, Z.; LUO, H.; XU, C.; CHENG, C. H. K.; SUN, J. Effects of high-fat diets on lipid metabolism and liver health in fish: A review. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 51-67, 2021.

ZHENG, X.; TOCHER, D. R.; DICKSON, C. A.; BELL, J. G.; TEALE, A. J. Effects of diets containing vegetable oils on hepatic fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 250, n. 1-2, p. 431-442, 2005.

ZHOU, Q. C.; WU, Z. H.; CHI, S. Y.; YANG, Q. H. Dietary lysine requirement of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v. 273, p. 634-640, 2007.

ZHOU, Q. C.; WU, Z. H.; TAN, B. P.; CHI, S. Y.; YANG, Q. H. Optimal dietary methionine requirement for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v. 258, p. 551-557, 2006.