

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**USO DO TRIPTOFANO COMO MITIGADOR DE ESTRESSE  
DURANTE O TRANSPORTE DE JUVENIS DE ROBALO PEVA  
(*Centropomus parallelus*).**

**LORENA CRISTINA O'REILLY SEPULCHRO**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO / 2014**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**USO DO TRIPTOFANO COMO MITIGADOR DE ESTRESSE  
DURANTE O TRANSPORTE DE JUVENIS DE ROBALO PEVA  
(*Centropomus parallelus*).**

Dissertação apresentada à  
Universidade Vila Velha, como pré-  
requisito do programa de pós-  
graduação em Ciência Animal, para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Ciência Animal

**LORENA CRISTINA O'REILLY SEPULCHRO**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO / 2014**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S479u Sepulchro, Lorena Cristina O'Reilly.

Uso do triptofano como mitigador de estresse durante o transporte de juvenis de robalo peva (*Centropomus parallelus*) / Lorena Cristina O'Reilly Sepulchro. – 2014.

45 f.: il.

Orientador: Levy de Carvalho Gomes.

Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade Vila Velha, 2014.

Inclui bibliografias.

1. Robalo (peixe). 2. Stress (fisiologia). 3. Proteínas na nutrição animal. I. Gomes, Levy de Carvalho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.08527

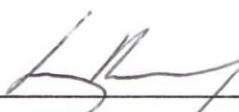
**LORENA CRISTINA O'REILLY SEPULCHRO**

**USO DO TRIPTOFANO COMO MITIGADOR DE ESTRESSE  
DURANTE O TRANSPORTE DE JUVENIS DE ROBALO PEVA  
(*Centropomus parallelus*).**

Dissertação apresentada à  
Universidade Vila Velha, como pré-  
requisito do programa de pós-  
graduação em Ciência Animal, para a  
obtenção do grau de Mestre em  
Ciência Animal

Aprovada em 27 de fevereiro de 2014,

**Banca Examinadora,**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes - UFES**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Douglas Haese - UVV**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Levy de Carvalho Gomes - UVV**  
**(orientador)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Levy de Carvalho Gomes, pela confiança e apoio.

A todos os professores da Universidade Vila Velha, que contribuíram para a minha obtenção do grau de mestre.

Às colegas de turma, que me acompanharam nesta jornada: Elaine Cruz, Maritza Gurgel, Rogéria Erlacher e Jessica Pereira, nossa amizade ficará para sempre.

Aos colegas de laboratório, que me ajudaram na realização deste trabalho: Vinícius Dadalto, Alexandra, Priscyla Pavione, Larissa Simões, Frederico Delunardo, Caroline, Raphaelle e David.

Aos meus pais, pelo amor, apoio incondicional e que acima de tudo, sempre acreditaram no meu potencial.

À minha avó, por ter sido uma inspiração de dedicação aos estudos e de sempre buscar alçar voos cada vez mais altos.

Ao meu noivo, por estar sempre comigo, em todos os momentos, me incentivando, compreendendo e apoiando.

A todos os funcionários da UVV e aqueles que sempre estiveram dispostos a prestar favores, ou apenas serem gentis em momentos difíceis.

Projeto financiado pelo CNPQ/FAPES – projeto Recaper.

Obrigada a todos !

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. Introdução.....	13
2. Fundamentação Teórica.....	14
2.1. Panoramas da produção de peixes no mundo e no Brasil.....	14
2.2. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura.....	15
2.3. Uso de mitigadores de estresse.....	17
2.4. Utilização do triptofano como mitigador de estresse.....	19
2.5. Triptofano e excreção.....	20
2.6. Robalo peva.....	21
3. Material e Métodos.....	23
3.1. Aquisição dos animais e aclimação.....	23
3.2. Delineamento experimental.....	23
3.2.1. Experimento 1: excreção.....	24
3.2.2. Experimento 2: animais transportados e não transportados.....	25
3.3. Análises estatísticas.....	27
4. Resultados e discussão.....	28
4.1. Experimento 1: excreção.....	28
4.2. Experimento 2: animais transportados e não transportados.....	30
4.2.1. Cortisol e Lactato plasmático.....	30
4.2.2. Glicose sanguínea e Glicogênio hepático.....	35
4.2.3. Enzimas GST e Catalase.....	38
5. Conclusões.....	46
REFERÊNCIAS .....	47

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Taxa de excreção de ureia dos peixes em  $\mu\text{g/g/L}$  presentes nos aquários dos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p<0,05$ ). 29
- Figura 2:** Taxa de excreção de amônia dos peixes em  $\mu\text{g/g/L}$  presentes nos aquários dos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p<0,05$ ). 30
- Figura 3:** Níveis de cortisol plasmático em  $\mu\text{g/dl}$  em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, para os seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais demonstram que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p<0,05$ ). 31
- Figura 4:** Níveis de cortisol plasmático em  $\mu\text{g/dl}$  em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma kruskal-wallis ANOVA e teste de Tukey ( $p<0,05$ ). 32
- Figura 5:** Níveis de Lactato plasmático em  $\text{mg/dL}$  em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, para os seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras diferentes demonstram diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p<0,05$ ). 33
- Figura 6:** Níveis de Lactato plasmático em  $\text{mg/dL}$  em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma kruskal-wallis ANOVA e teste de Tukey ( $p<0,05$ ). 34

**Figura 7:** Níveis de Glicose sanguínea em mg/dL em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, para os seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais demonstram que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 35

**Figura 8:** Níveis de Glicose sanguínea em mg/dL em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, para os seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais demonstram que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 36

**Figura 9:** Níveis de Glicogenio hepático em  $\mu\text{mol}$  glicose/g tecido em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, para os seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais demonstram que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 36

**Figura 10:** Níveis de Glicogenio hepático em  $\mu\text{mol}$  glicose/g tecido em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, para os seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais demonstram que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 37

**Figura 11:** Atividade da enzima GST no tecido branquial em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 39

**Figura 12:** Atividade da enzima GST no tecido branquial em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 39

**Figura 13:** Atividade da enzima GST no tecido hepático em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 40

**Figura 14:** Atividade da enzima GST no tecido hepático em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma kruskal-wallis ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 41

**Figura 15:** Atividade da enzima Catalase no tecido branquial em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 42

**Figura 16:** Atividade da enzima Catalase no tecido branquial em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 42

**Figura 17:** Atividade da enzima Catalase no tecido hepático em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma kruskal-wallis ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 43

**Figura 18:** Atividade da enzima Catalase no tecido hepático em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma kruskal-wallis ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). 44

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Composição básica e níveis de garantia da ração base ao qual foi adicionado os seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração.

24

## RESUMO

SEPULCHRO, Lorena Cristina O'Reilly, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2014. **Uso do triptofano como mitigador de estresse durante o transporte de juvenis de robalo peva (*Centropomus parallelus*)**. Orientador: Levy de Carvalho Gomes.

O uso de aditivos na ração que melhorem a qualidade de vida dos peixes de criação tem sido cada vez mais difundido nas pisciculturas como uma forma de se minimizar o estresse causado pelas práticas de manejo. Dentre estes aditivos está o triptofano, um precursor da serotonina que atua a nível cerebral, reduzindo as respostas de estresse dos peixes. A espécie estudada, *Centropomus parallelus*, possui a particularidade de se mostrar de grande potencial para a piscicultura, por possuir características desejáveis a criação, como a fácil adaptação, ampla distribuição e apreciação da carne, além de alto valor comercial. O objetivo do trabalho foi testar a eficiência do triptofano como mitigador de estresse, de forma a prevenir efeitos adversos causados pelo transporte dos peixes. Os peixes foram submetidos a dois experimentos, com diferentes concentrações de triptofano adicionados à ração: 0g/Kg; 5g/Kg; 10g/Kg; 15g/Kg e 20g/Kg. No primeiro experimento, foram realizados testes de excreção (amônia e ureia) que demonstraram não haver diferenças significativas na quantidade excretada nos diferentes tratamentos. No segundo experimento, os peixes foram alimentados durante sete dias e a partir daí, submetidos a um transporte de 15 horas. Após o transporte foram realizados testes para averiguar a qualidade da água e coletado sangue, fígado e brânquias para análises de glicose, cortisol, lactato, glicogênio e atividade enzimática da GST e Catalase. Diferenças significativas foram encontradas apenas no lactato, na concentração de 10g/Kg de ração, no grupo submetido ao transporte e na atividade enzimática da Catalase hepática, que, a partir de 10g/kg aumentou significativamente. Nas demais análises não foram observadas diferenças estatísticas, levando à conclusão de que a concentração de triptofano adicionada a ração não influencia na excreção de produtos nitrogenados e o uso do triptofano nas concentrações testadas não apresentou um efeito redutor de estresse em robalo peva durante o transporte.

**Palavras chaves:** enzima, excreção, manuseio, peixes e piscicultura.

## ABSTRACT

SEPULCHRO, Lorena Cristina O'Reilly, M.Sc., University Vila Velha – ES, february 2014. **Using tryptophan as mitigating stress during transport of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus*)**. Advisor: Levy de Carvalho Gomes.

The use of feed additives that improve the quality of life of breeding fish has been increasingly diffused in fish farms as a way to minimise the stress caused by management practices. Among these additives is tryptophan, a precursor of serotonin which acts the cerebral level, reducing the stress responses of fish. The species studied, *Centropomus parallelus*, has the particularity to show great potential for fish farming, by possessing desirable characteristics the creation, as the easy adaptation, wide distribution and appreciation of the flesh, but high commercial value. The objective of this work was to test the efficiency of tryptophan as stress mitigation in order to prevent adverse effects caused by the transport of fish. The fish went subject two experiments with different concentrations of tryptophan added to the ration: 0 g/Kg; 5 g/Kg; 10 g/Kg; 15 g/Kg and 20 g/Kg. In the first experiment, conducted tests of excretion (ammonia and urea) that showed no significant differences in the amount excreted in the different treatments. In the second experiment, the fish were fed for seven days and thereafter, subject to a 15 hours transport. After the tests were carried out transport to determine the quality of the water and collected blood, liver and glucose analysis branquias, cortisol, lactate, glycogen and enzyme activity of GST and Catalase. Significant differences were found only in lactate concentration of 10 g/Kg of feed, the Group submitted to the transport and enzyme activity of liver Catalase, which, from 10 g/kg increased significantly. In other statistical analyses no differences were found, leading to the conclusion that the concentration of tryptophan added the feed does not influence on the excretion of nitrogen products and the use of tryptophan in the concentrations tested did not submit a stress reducer effect in fat Snook for the transport.

**Key words:** enzyme, excretion, handling, fish and fish farming.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos até hoje em dia, a pesca e a produção pesqueira de uma forma geral, é tida como uma prática tradicional considerada uma importante fonte alimentar. A prática da piscicultura vem crescendo a passos largos não só no Brasil, mas em todo mundo, e despertando cada vez mais nos produtores, o desejo de se potencializar a criação, com o objetivo de maiores lucros (Faveret Filho & Siqueira, 1997).

A partir desse desejo pela otimização da criação, os produtores investem cada vez mais em práticas de manejo que minimizem as injúrias aos animais, e, conseqüentemente, reduzem as perdas. Um investimento maior no manejo e em rações especiais para as diferentes necessidades dos animais pode representar um aumento significativo na lucratividade (Urbinati & Carneiro, 2004).

O peixe estudado no presente trabalho, robalo peva, possui alto potencial para a criação por possuir características desejáveis tanto para a criação quanto para sua comercialização: sua carne é branca e delgada, com poucas espinhas e a separação dos filés é fácil, tornando-se muito apreciável pelos consumidores; além disso, é um peixe que se adapta muito bem ao cativeiro, suporta densidades consideráveis, é resistente ao processo de criação e variações na qualidade da água, é relativamente resistente a doenças, além de possuir um alto valor de mercado, características essenciais para criação.

O transporte, mesmo sendo uma prática comum, pode ser considerado uma injúria, uma vez que leva o animal a um estado de grande estresse, por causa da alta densidade, numa quantidade mínima de água por peixe. Com o objetivo de minimizar o estresse aos animais durante essa prática, no presente trabalho foram testadas diferentes concentrações de triptofano adicionados à ração como uma forma de prevenção, ou seja, alimentando os peixes antes que esses fossem expostos ao estresse. Considerando o triptofano como um aminoácido essencial que é precursor da serotonina, buscou-se uma forma de prevenir o estresse do animal, diminuindo assim as perdas durante essa prática de manejo, dados de grande relevância, principalmente aos produtores pesqueiros.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. *Panoramas da produção de peixes no mundo e no Brasil.*

A pesca é uma das atividades econômicas mais antigas do mundo e possui uma grande relevância para a alimentação de diversas populações. A captura de pescado tem apresentado números crescentes com o passar dos anos, ocasionando cada vez mais problemas como sobrepesca, poluição, desestabilização de comunidades nativas, dentre outros (Faveret Filho & Siqueira, 1997).

A produção mundial total de organismos aquáticos, se incluída a pesca, a aquicultura e plantas aquáticas, superou 158 milhões de toneladas no ano de 2008 (Sidonio *et al.*, 2012). Por continente, a produção pesqueira se distribui em 41% na Ásia, 26% na Europa, 18% na América do Sul, 10% na América do Norte, 4% na África e 1% na Oceania, e, sendo o Oceano Pacífico o mais piscoso, este detém três das mais produtivas regiões de pesca (Faveret Filho & Siqueira, 1997).

A demanda por proteína animal vem aumentando, substituindo parte da alimentação das proteínas vegetais. Nos últimos 40 anos, o consumo *per capita* mundial passou de 33kg/ano em 1961 para 46,6kg/ano em 2009. Apesar das principais empresas brasileiras de proteínas não demonstrarem grande interesse por pescados, esta é a proteína de maior produção e consumo em todo mundo (Sidonio *et al.*, 2012).

Em detrimento da prática da pesca não sustentável em todo o mundo, que desrespeita os ciclos naturais de reprodução bem como a reposição de estoques de várias espécies aquáticas, a captura mundial em larga escala parece ter chegado ao seu limite (Sidonio *et al.*, 2012).

Com a rápida expansão da frota mundial e indústria de pesca, juntamente com a insuficiência de medidas de controle e regulamentação à fim de limitar as atividades pesqueiras indiscriminadas e potencialmente prejudiciais, a situação chegou à um ponto de quase total esgotamento de recursos (Faveret Filho & Siqueira, 1997). A produção pesqueira têm tido pouco aumento, mantendo-se relativamente constante desde 2000, ao passo que a aquicultura vem crescendo rapidamente, tornando-se uma importante alternativa para suprir essa demanda, e vem aumentando significativamente sua participação no total da produção de pescados no mundo. Adicionalmente,

a utilização de novas tecnologias e pesquisa aplicada ao setor, tem contribuído para o alcance dessas altas taxas na produtividade na aquicultura (Sidonio *et al.*, 2012).

Com o aumento da produção na aquicultura, o preço das espécies que antes só eram obtidos com a captura vem se reduzindo, se tornando um incentivo ao consumo. O setor aquícola como um todo é muito diverso e fragmentado em todo o mundo, variando de pequenos produtores a grandes empresas internacionais de alto faturamento. Dentro da aquicultura, o ramo mais importante é o da piscicultura, que corresponde a 49,5% da produção aquícola total (Sidonio *et al.*, 2012).

Mesmo dispondo de todas essas condições favoráveis, o Brasil não ocupa posição de destaque no mercado mundial de pescados, isso se dá por causa da falta de estruturação e utilização de métodos ainda muito artesanais, tanto para o cultivo quanto para a captura, havendo grande espaço para a evolução do setor (Sidonio *et al.*, 2012).

## *2.2. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura.*

Os peixes compõem um grupo muito diverso e cada um desses grupos possui particularidades eminentes, como hábitos alimentares, métodos reprodutivos, velocidade de crescimento, ciclo de vida e respostas às condições e alterações ambientais, com isso, o estudo da fisiologia da espécie requerida é de suma importância para a piscicultura, possibilitando melhores condições de cultivo para as diferentes espécies (Baldisserotto, 2002).

Com a crescente expansão da aquicultura, os produtores preocupam-se cada vez mais com prejuízos causados por mortalidade e problemas na produção (Urbinati & Carneiro, 2004), mesmo porque, o objetivo principal da atividade é alcançar uma alta produtividade com o mínimo de despesa, alcançando o maior lucro possível. Dessa forma, é imprescindível ao criador e aos seus empregados o conhecimento adequado da biologia da espécie que será utilizada no cultivo (Valenti *et al.*, 2000), à fim de se obter as maiores taxas de crescimento em menor tempo possível além de uma conversão alimentar cada vez melhor.

Para que este crescimento ocorra de forma esperada, é de suma importância que os peixes recebam manejo adequado, alimentação

balanceada que atenda às exigências da espécie cultivada e que as condições ambientais do local sejam ideais à mesma. É importante considerar a preservação do meio ambiente para que a atividade possa se estender por um longo tempo (Oba *et al.*, 2009).

Os fatores estressantes são a principal causa de redução de lucro na piscicultura, uma vez que afetam o metabolismo e conseqüentemente o crescimento e até mesmo a sobrevivência dos peixes (Oba *et al.*, 2009). Esses agentes estressores podem ser de natureza química, como a redução da concentração de oxigênio dissolvido, aumento das concentrações de amônia e nitrito (Costa *et al.*, 2004) e presença de poluentes (Rice & Arkoosh, 2002), ou de natureza física, como manuseio, alta densidade, confinamento, captura, manejo e transporte (Gomes *et al.*, 2003a).

As diferentes respostas de estresse observadas durante o processo de produção e comercialização nos fornece uma ferramenta fundamental para se formular procedimentos de boas práticas à fim de se minimizar as perdas do processo de criação (Brandão *et al.*, 2006).

Segundo Urbinati & Carneiro (2004), durante o cultivo, os peixes são submetidos a estressores, que podem ocorrer de forma rápida e aguda, ou longa e contínua (Barton *et al.*, 2002; Wedemeyer *et al.*, 1990). O estresse agudo é caracterizado por dois tipos de resposta fisiológica: a primária e a secundária. A resposta primária (ou de alarme) é hormonal, resultando do estímulo do sistema nervoso simpático e do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal. Esses hormônios liberados vão desencadear a resposta secundária (ou de resistência) onde é ativado uma série de diferentes mecanismos, responsáveis pela adaptação fisiológica do peixe à situação estressora, como resposta ao estímulo, de forma a compensar o distúrbio ocorrido (Oba *et al.*, 2009).

Quando os peixes são submetidos à agentes estressores de forma longa e contínua, o organismo dos mesmos entram num processo de exaustão da capacidade adaptativa e contínua perda da homeostase fisiológica, levando à redução da capacidade reprodutiva, crescimento e imunodeficiência, estas respostas são caracterizadas como terciárias, e podem levar o indivíduo à uma condição patológica e até mesmo à morte (Oba *et al.*, 2009).

Em situação de estresse, o sistema imunológico dos peixes também está comprometido, uma vez que, a secreção aumentada de cortisol e

catecolaminas atua, via circulação periférica, no rim cefálico, baço e timo, importantes tecidos hematopoiéticos, diminuindo a produção de linfócitos produtores de anticorpos ou imunoglobulinas, indispensáveis à defesa do organismo (Urbinati & Carneiro, 2004).

No Brasil, existem criações distintas para a reprodução, produção de juvenis e para a fase de engorda (onde os peixes são mantidos até a fase de abate), aumentando o risco de perda de animais durante o processo de transporte de um local para o outro (Brandão *et al.*, 2008). Dentro desse contexto, o transporte é uma prática fundamental, que pode acarretar conseqüências negativas ao animal após a chegada ao destino desejado, como o estresse, que desencadeia respostas como alterações nos níveis hormonais (adrenalina e cortisol), alterações osmorregulatórias e no metabolismo que aumentam a susceptibilidade à parasitas (Wedemeyer, 1996).

O manejo e transporte têm duração variada dependendo da finalidade e, em todos os casos, os animais devem chegar ao seu destino final em condições fisiológicas aceitáveis para a satisfação dos critérios estabelecidos pelo comprador (Urbinati & Carneiro, 2004).

### 2.3. *Uso de mitigadores de estresse*

Como uma forma de se reduzir as perdas ocorridas durante a produção, em detrimento das condições estressantes a que os peixes são submetidos, diversos tipos de mitigadores de estresse têm sido utilizados durante as práticas de manejo e transporte dos peixes (Oliveira *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 1999).

Dentre os diversos tipos de mitigadores podemos citar os anestésicos, que, sintéticos ou de origem natural, têm demonstrado ser uma boa alternativa para a redução do estresse nos peixes (Gomes *et al.*, 2001). Os anestésicos atuam no sistema nervoso central dos peixes, sobre o córtex cerebral, deprimindo as funções neurosensoriais (Summerfelt & Smith, 1990) e fazendo com que o peixe diminua sua atividade, conseqüentemente, suprimindo a ação negativa e estressante do manejo.

O sal de cozinha também é utilizado como redutor de estresse, igualando o gradiente osmótico entre a água e o plasma do peixe para que haja uma redução na difusão de íons para a água. Ele ainda estimula a secreção de

muco no epitélio branquial, o que dificulta a passagem de íons pelas membranas celulares (Gomes *et al.*, 2003b; Oliveira *et al.*, 2009).

De acordo com Pavanelli *et al.* (2008), a produção de dietas equilibradas e que atendam às necessidades da espécie, tendem a otimizar um bom estado nutricional, aumentando a resistência às doenças refletindo no estado geral dos peixes. O estresse provocado por uma nutrição deficiente aumenta o risco de infecções por bactérias e protozoários, conseqüentemente, aumentando também as perdas.

Outra forma muito eficiente de se mitigar o estresse nos peixes é a adição de microminerais (minerais e vitaminas) na ração, para que estes atuem de forma preventiva, melhorando o sistema imune e/ou estimulando a produção de certos hormônios que possam contribuir para a redução do efeito dos agentes estressores (Urbinati & Carneiro, 2004).

O cromo é tido como um elemento promissor em programas preventivos. Sua função está ligada à maximização da interação da insulina e seus receptores, atuando no crescimento, metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, além de melhorar a resposta imunológica à enfermidades (Anderson, 1981). Estudos realizados por Quintana (2002) mostraram que suplementação deste mineral na dieta de pacu, submetido a agentes inflamatórios, foi relacionado à diminuição dos níveis de cortisol plasmático. As vitaminas E e C também influenciam diretamente o sistema imunológico, e, além disso, oferecerem uma prevenção aos efeitos negativos causados pelo estresse (Urbinati & Carneiro, 2004).

A utilização de triptofano incorporado à rações tem sido relatado como um supressor de comportamento agressivo em espécies conhecidamente territorialistas, uma vez que este, aumenta as taxas de síntese de serotonina cerebral, fazendo com que esse comportamento agressivo seja reduzido (Johnston *et al.*, 1990; Winberg *et al.*, 2001; Hoglund *et al.*, 2005; Tejpal *et al.*, 2009)

#### 2.4. Utilização do triptofano como mitigador de estresse

O triptofano é um dos aminoácidos codificados pelo código genético, importante componente das proteínas dos seres vivos. Ele é sintetizado para criar a serotonina através de sucessivas hidroxilações e descarboxilações, sem

ele, não é possível sintetizar serotonina suficiente. Mesmo sendo pertencente ao grupo dos aminoácidos essenciais, o triptofano é um dos menos abundantes na dieta. Uma vez absorvido, ele pode ser levado para o sistema nervoso central ou permanecer na periferia. Se levado ao sistema nervoso central, será convertido em receptor de serotonina 5-HT (5-hidroxitriptamina). Quando se administra uma dieta com restrição de triptofano em animais, ocorre uma diminuição do seu nível sérico, diminuindo assim os níveis cerebrais de triptofano, 5-HT (receptor) e ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA), que é o principal metabólito de serotonina (utilizado para determinar os níveis de serotonina cerebral e corporal) (Biggio *et al.*, 1974).

Essas características são importantes quando levamos em conta o amplo papel que seus produtos finais desempenham no equilíbrio fisiológico normal, e a facilidade com que a produção destes pode ser afetada quando interrompida ou escassa oferta desse aminoácido. Os níveis plasmáticos de triptofano têm sido manipulados como um meio de potencializar os efeitos de drogas antidepressivas (Kapczinski, *et al.* 1998).

Em seres humanos, o triptofano tem sido testado como antidepressivo, em decorrência das teorias que associam a depressão à diminuição dos níveis de serotonina cerebral (Kapczinski *et al.*, 1998), sendo este, comparado com outros antidepressivos, como a imipramina (Chouinard *et al.*, 1979). Existem diversos estudos publicados sobre o efeito do triptofano como antidepressivo, mas não há consenso sobre sua eficácia (Baldisserani, 1984; Carrol, 1971; Chouinard *et al.*, 1983; Cole *et al.*, 1980; Cooper *et al.*, 1979; Young, 1984).

Desde a década de 80, estudos demonstram a influência dos níveis séricos de triptofano no comportamento agressivo. A hipótese de que a baixa concentração da serotonina cerebral pode causar agressão foi proposta por Eichelman, (1987), em estudos em animais. Estes demonstraram que níveis baixos de triptofano estão relacionados com maior agressividade e, indivíduos propensos ao comportamento agressivo, a restrição aguda do triptofano na dieta tende a aumentar a agressividade (Kapczinski *et al.*, 1998).

Winberg *et al.* (2001), em experimento com truta arco-íris, demonstraram uma supressão do comportamento agressivo de peixes que receberam ração suplementada com triptofano por um período de 7 dias. Resultados semelhantes foram encontrados por Hoglund *et al.* (2005) quando o

triptofano foi testado em juvenis de bacalhau do Atlântico, e por Tejpal *et al.* (2009) em testes com juvenis de *Cirrhinus mrigala*.

Em experimentos com ratos, o uso de triptofano na dose de 1,6g/kg ocasionou sintomas de toxicidade, inclusive levando à morte de alguns indivíduos (Young, 1986). Porém, Hoglund *et al.* (2005), observaram uma redução significativa de comportamento agressivo em bacalhau do Atlântico que foram submetidos ao tratamento com ração suplementada com triptofano na proporção de 5g TRP/kg ração. Assim como Tejpal *et al.* (2009), que, em trabalhos realizados com juvenis de *C. mrigala*, chegaram à conclusão que níveis entre 1,36% e 2,72% de suplementação de triptofano reduz o estresse nos peixes submetidos à alta densidade. Com isso, pode-se sugerir que, o triptofano não parece ser potencialmente tóxico para peixes, em concentrações mais elevadas, quando comparado a ratos.

## 2.5. Triptofano e excreção

As dietas formuladas para animais, geralmente baseiam-se no conceito de proteína bruta, que diferentemente daquelas que se baseiam no conceito de proteína ideal, resultam num conteúdo aminoacídico em excesso. Qualquer aminoácido que esteja em excesso em relação ao primeiro aminoácido limitante, será oxidado, levando à excreção de nitrogênio pelo animal, podendo se transformar em um potencial poluidor para o meio (Pinheiro, *et al.* 2008; Pereira & Mercante, 2005).

O excesso de nitrogênio e de outros nutrientes favorecem o desenvolvimento desordenado de algas. A decomposição destas algas consome o oxigênio dissolvido na água, causando a eutrofização do meio aquático. Ela compromete o crescimento de espécies aquáticas, como peixes, crustáceos, etc (Penz-Júnior, 2000; Araújo & Sobreira, 2008; Pereira & Mercante, 2005).

O triptofano, pertence à classe de aminoácidos essenciais e não é produzido pelos animais ou é produzido de forma muito lenta, não satisfazendo às suas necessidades. De acordo com o NRC (2010), o nível de exigência nutricional de triptofano para tilápias-do-nilo é de 0,43% na fase de alevino; 0,30%, para peixes de até 100g, e de 0,27% para peixes com mais de 100g (Santiago & Lovell, 1988). Como os estudos de exigências nutricionais para

robalo ainda são escassos, utiliza-se esses valores de referência como base para a formulação de rações para a espécie (Pinheiro *et al.* 2008; Araújo & Sobreira, 2008; Vidal *et al.* 2010).

## 2.6. Robalo peva

A espécie *Centropomus parallelus*, possui nome popular de robalo peva, e é conhecido como camorim no Norte e Nordeste do país, e como robalo no Sul e Sudeste. O gênero *Centropomus*, tem ampla distribuição geográfica tipicamente tropical e subtropical (Cerqueira, 2010), ocorrendo desde a Flórida (EUA) até o Rio Grande do Sul (Brasil), apresentado fácil adaptação aos mais diferentes habitats por se tratar de um peixe, que pode viver tanto em ambiente marinho quanto dulcícola (Godinho *et al.*, 2000), (Corrêa *et al.*, 2010).

Costumam penetrar em rios e adaptam-se muito bem a águas doces e salobras, utilizando áreas de manguezais estuários e lagoas para se alimentarem, porém, necessitam da água salgada para a reprodução. É uma espécie carnívora que se alimenta principalmente de peixes e camarões, podendo preda também insetos, moluscos e poliquetas quando adultos e quando juvenis, alimentam-se basicamente de pequenos crustáceos (Cerqueira, 2010).

A espécie é comercialmente valiosa, e, por causa da sua ampla distribuição na costa brasileira, desperta grande interesse para a pesca esportiva, mas também é pescado de forma artesanal (Chávez, 1963), além de possuir várias características que o tornam um peixe de grande potencial para a piscicultura: são muito apreciados por sua carne que é branca, delicada e com pouca gordura, a separação dos filés é fácil, de alto rendimento e não possuem grande quantidade de espinhas, facilitando a degustação (Tsuzuki *et al.*, 2007).

Outro fator que torna o robalo uma espécie promissora para o cultivo, é a sua fácil aceitação às dietas artificiais (rações), não apresentam grandes exigências quanto à qualidade da água e se adaptam bem à ambientes com pouco oxigênio (Godinho *et al.*, 2000). São consideravelmente resistentes às manipulações e variações de parâmetros físico-químicos da água, se comparados com outras espécies. Além disso, demonstram ser

capazes de se desenvolver também em água doce, com alta taxa de sobrevivência (Amaral Junior *et al.*, 2009).

Meza *et al.* (2006) observaram que na criação em cativeiro, os robalos aceleram seu crescimento a partir dos nove meses, sendo este alcançado de forma diferente em água doce e salgada: os robalos criados em água doce, apresentam crescimento isométrico, enquanto os robalos criados em diferentes salinidades, apresentam crescimento alométrico à medida em que se aumenta a salinidade.

De acordo com Tsuzuki *et al.* (2007), juvenis de robalo são menos tolerantes a transferência abrupta de água doce especialmente em animais em jejum, indicando que um processo de aclimatação a salinidade antes da liberação de peixes à água doce é necessário. Porém, a tolerância à essa mudança abrupta aumenta com o aumento da idade dos peixes.

Os robalos possuem células especializadas em suas brânquias eliminam o excesso de cloreto de sódio quando estão no mar, enquanto na água doce, as células epiteliais captam mais sais e assim mantêm a homeostase da concentração de sal no corpo do animal, diminuindo a sensibilidade às mudanças de salinidade (Corrêa *et al.*, 2010).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. *Aquisição dos animais e aclimação*

Os juvenis de robalo peva, num total de 280 exemplares, com comprimento médio de  $7,45 \pm 0,32$  cm e peso médio de  $7,16 \pm 0,62$  g, foram obtidos na maricultura Pandini, São Mateus-ES, e transportados para o Laboratório de Ictiologia Aplicada – Universidade Vila Velha (UVV), Boa Vista, Vila Velha-ES.

Ao chegarem ao laboratório, foram colocados em um tanque de aclimação de capacidade total de 300L, contendo 250L de água, esta, previamente tratada e ajustada em salinidade 15. O ajuste da salinidade foi feita a partir da água do mar, previamente filtrada, juntamente com a água doce tratada, proveniente do sistema de abastecimento municipal e declorada. O ajuste da salinidade foi realizado conforme proposto por Tsuzuki et al. (2007).

Após o período de aclimação, que durou 15 dias, os peixes foram redistribuídos aleatoriamente em 35 aquários estáticos de 30L, contendo 20L de água e 8 peixes por aquário, passando novamente por um período de aclimação mais 15 dias, antes do início da realização dos testes.

Durante toda a realização do experimento, foi monitorada a qualidade da água dos aquários, medidos a cada dois dias, os parâmetros físico-químicos da água, totalizando seis análises (oxigênio dissolvido:  $7,64 \pm 0,847$  mg/L; temperatura:  $26,78 \pm 1,38$  °C; salinidade:  $15,1 \pm 0,39$ ; condutividade:  $23,63 \pm 1,66$  mS/cm; pH:  $6,48 \pm 0,417$ ).

Durante a aclimação, foi realizada a aspiração dos dejetos do fundo com complementação da água ao nível normal a cada dois dias e troca total da água a cada cinco dias, enquanto durante a semana de realização do experimento, foi realizada apenas a aspiração dos dejetos do fundo com a complementação de água ao nível normal a cada dois dias, já que este durou sete dias.

#### 3.2. *Delineamento Experimental*

O experimento foi conduzido testando-se diferentes concentrações de triptofano incluídos na ração: 0, 5, 10, 15 e 20g de triptofano/Kg de ração),

com o objetivo de atenuar os efeitos estressantes do transporte, que é uma prática comum, realizada em pisciculturas.

Cada tratamento teve 7 repetições, destas, 5 foram utilizadas para o transporte e 2 foram utilizadas para controle positivo, onde não passaram pelo transporte. A ração utilizada para o experimento foi uma ração extrusada com 45% de proteína, e o triptofano foi introduzido “on top” por meio de aspersão, em uma mistura de triptofano, água e aglutinante comercial (bredol) e posterior secagem em estufa ventilada a 40°C. A composição básica e níveis de garantia da ração, estão mostradas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Composição básica e níveis de garantia da ração base ao qual foi adicionado os seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração.

<b>Composição Básica</b>	<b>Níveis de Garantia/Kg Ração</b>
Óleo de peixe	Proteína Bruta - 450g
Farina de Peixe	Extrato Etéreo - 120g
Farina de Vísceras	Fibra Bruta - 30g
Farinha de Carne e Ossos	Matéria Mineral - 120g
Proteína Concentrada de Soja	Cálcio - 20g
Farelo de Arroz	Fósforo - 8g
Farelo de Soja	Umidade - 100g
Gordura de Frango	
Milho Integral Moído	
Mananligossacarídeos	
Premix mineral vitamínico	

### 3.2.1. Experimento 1: excreção

No primeiro experimento, o objetivo foi testar se as diferentes concentrações de triptofano causariam efeito na excreção de metabólitos nitrogenados (amônia e ureia), de acordo com os níveis incluídos na ração.

Nesta fase, todos os peixes foram deixados em jejum por 48hs, a fim de que o trato intestinal fosse completamente esvaziado. Após esse período,

os aquários foram completamente limpos e foi realizada uma troca total da água.

A partir daí foi coletada uma amostra de água para análises, e logo após, foi oferecido aos peixes rações dos diferentes tratamentos, numa quantidade equivalente a 0,5% da biomassa total de cada aquário. Coletas de água foram realizadas após 6, 12 e 24h da ofertada da ração aos peixes, para se verificar o aumento da taxa de excreção dos mesmos nas diferentes concentrações de triptofano. Foram mensurados os níveis crescentes de amônia e ureia ao longo das 24h, após a oferta da ração.

A amônia da água foi medida utilizando o método do endofenol (APHA, 1998), e medido em microplaca, no espectrofotômetro Spectra Max 190 – Molecular Devices, no comprimento de onda de 640nm.

A ureia foi mensurada a partir de protocolo descrito em APHA (1998) e realizada a leitura em cubetas de quartzo, em espectrofotômetro da marca Biospectro SP- 220, em comprimento de onda de 525nm.

A taxa de excreção foi calculada pela fórmula descrita por Altinok & Grizzle, 2004:

$$\text{Excreção total} = \{[(\text{NH}_f - \text{NH}_i / g_{\text{total}}) / L]\}$$

Onde  $\text{NH}_f$ = amostra calculada de amônia final;  $\text{NH}_i$ = amônia inicial; dividido pela média da biomassa do aquário e por último dividido por 20, que foi a quantidade de água dentro de cada aquário (em L).

### 3.2.2. *Experimento 2: animais transportados e não transportados*

No segundo experimento, foram ofertadas aos peixes as rações nas diferentes concentrações de triptofano, numa quantidade equivalente a 0,5% da biomassa total de cada aquário durante sete dias, uma vez ao dia, tomando cuidado para que os peixes comessem toda a ração disponibilizada no aquário.

Após sete dias de alimentação, 25 aquários do total de 35, foram submetidos a um transporte simulado de 15h, em sacos plásticos de capacidade total de 5L, contendo 2,5L de água. Os sacos foram inflados com oxigênio puro e lacrados. Todos os peixes de cada aquário foram transportados em um único saco plástico, totalizando 8 peixes por saco. Posteriormente, os peixes transportados foram levados ao laboratório para serem sacrificados.

Ao final do transporte, os sacos foram abertos e os parâmetro físico-químicos da água (oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade, pH, oxigênio saturado e salinidade) foram imediatamente medidos com um medidor multiparâmetro YSI550. Foi também coletada uma amostra da água para a realização de testes de amônia e nitrito, de acordo com APHA (1998).

Nos 10 aquários restantes, os peixes não foram submetidos ao transporte, sendo sacrificados diretamente dos aquários, sem passarem por situação estressante anterior para a realização de um controle positivo em relação aos peixes transportados, também em todos os tratamentos.

Os peixes foram sacrificados por meio de dose letal de anestésico (Eugenol), pesados, medidos e submetidos à extração de sangue (punção do veio cudal), fígado (extração) e brânquias (extração) para a realização de análises de cortisol plasmático, lactato plasmático, glicose sanguínea, glicogênio hepático e análises enzimáticas de GST (Glutathione S-Transferase) e Catalase hepático e branquial.

O cortisol plasmático ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) foi mensurado a partir de teste ELISA por competição, para a determinação quantitativa do cortisol em plasma sanguíneo, para diagnóstico In Vitro, disponível em forma de kit (Human), para ensaio em microplaca, o CV intraensaio foi de 2,5%. Foi realizada a leitura em um leitor de microplaca Spectra Max 190 – Molecular Devices .

O Lactato plasmático foi determinado por método enzimático colorimétrico, disponível na forma de kit (Katal), para diagnóstico In Vitro, e a leitura foi realizada em leitor de microplaca Spectra Max 190 – Molecular Devices.

A Glicose sanguínea foi determinada a partir do sangue recém-extraído, em aparelho medidor de glicose Accu Check®. O glicogênio hepático foi determinado a partir do método proposto por Dubois *et al.* (1956), e a leitura foi realizada em espectrofotômetro da marca Biospectro SP- 220, em comprimento de onda de 480nm.

Para análises enzimáticas de GST (Glutathione S-Transferase) e Catalase, o fígado dos animais foram descongelados e homogeneizados com tampão fosfato (pH 7,0) e centrifugados (13.000g / RPS) por 30 min a 4°C, para a retirada do sobrenadante. A atividade enzimática da GST foi determinada pelo método descrito por Habig *et al.* (1974); Habig & Jakoby (1981), utilizando tampão fosfato (pH 7,0), 1 mM GSH e 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

(CDNB) como substrato. A atividade cinética da GST foi calculada a partir da leitura da absorbância em comprimento de onda de 340 nm, em espectrofotômetro Spectra Max 190 – Molecular Devices. A atividade absoluta foi estimada usando o coeficiente de extinção do CDNB.

A catalase foi estimada por meio da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Aebi, 1984), em 240 nm em um espectrofotômetro BioSpectro.

A quantificação de proteínas totais nos extratos foi realizada de acordo com método descrito por Lowry *et al.* (1951), que consiste na redução do reagente Folin-Ciocalteu, quando reage com proteínas, na presença de cobre, produzindo um composto com absorção máxima em 750 nm.

### 3.3. Análises estatísticas

Para os dados que tiveram distribuição não paramétrica, foi realizado uma Kruskal-Wallis ANOVA, seguido de teste Tukey ( $p < 0,05$ ), que ocorreram nas análises de cortisol, lactato, GST hepática e catalase hepática dos grupos submetidos ao transporte e na análise de catalase hepática no grupo não transportado.

Para as análises de cortisol, lactato, glicose, glicogênio, GST branquial, GST hepática e catalase branquial dos grupos que não foram submetidos ao transporte, bem como glicose, glicogênio, GST branquial e catalase branquial dos grupos submetidos ao transporte que tiveram distribuição normal, paramétrica, foram analisadas por uma ANOVA seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Amônia e ureia foram analisadas por uma ANOVA seguida do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Todas as análises estatísticas foram realizadas com os programas Sigma Stat 3.5 e Sigma Plot 11.0.

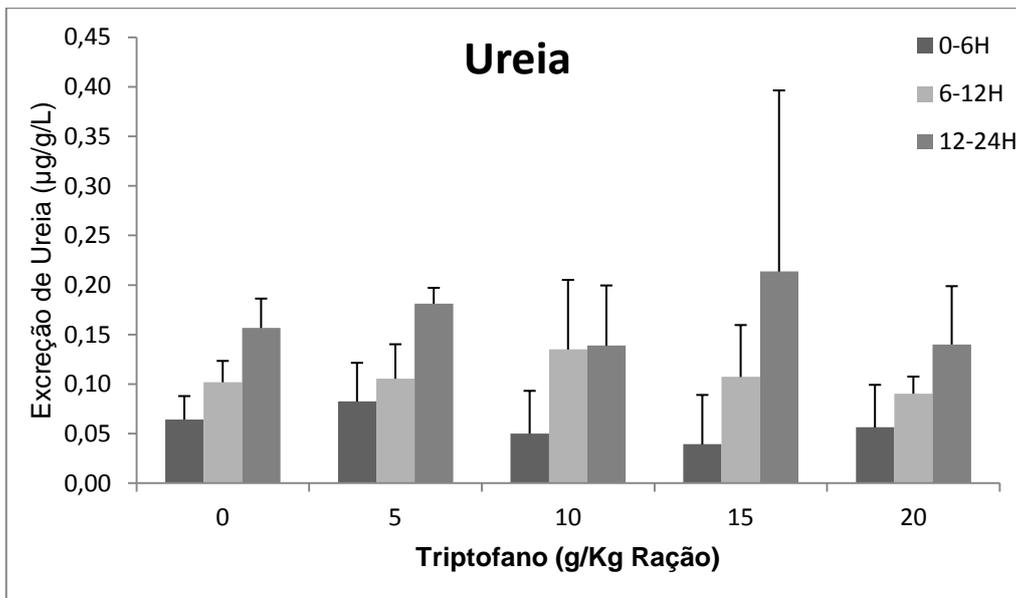
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Experimento 1: Excreção

O balanço proteico-aminoacídico de uma ração, é de suma importância para que o animal tenha um melhor aproveitamento da ração, e conseqüentemente excrete menores quantidades de produtos nitrogenados. De acordo com Wilson (1994), quando um aminoácido está em níveis satisfatórios na dieta, a maior parte dele será utilizado para a síntese de proteínas, e uma parte relativamente pequena será oxidada. Ao mesmo passo que, quando um aminoácido está em excesso, uma maior parte será oxidada, aumentando os produtos nitrogenados na excreção dos peixes, o que pode acarretar num desbalanço na qualidade da água no qual o animal está inserido (Pereira & Mercante, 2005).

No presente trabalho, observou-se que, independente do tratamento ao qual o peixe foi submetido (com a ingestão maior ou menor de triptofano), não houve diferenças significativas na taxa de excreção de produtos nitrogenados presentes na água (ureia e amônia) durante o mesmo intervalo de tempo. Mas, como já seria de se esperar, com o passar do tempo, os níveis de amônia e ureia presentes na água foram aumentando gradativamente.

Nos diferentes tempos, a taxa de excreção de ureia foi de  $0,064 \pm 0,024$  mg/L,  $0,102 \pm 0,22$  mg/L e  $0,157 \pm 0,30$  mg/L, nos tempos de 0 a 6h, 6 a 12h e 12 a 24h após a alimentação, respectivamente, para o tratamento 0, ao qual não houve a suplementação de triptofano na ração. No tratamento 5, onde foi suplementada a ração com 5g de triptofano/kg de ração, os níveis ficaram em  $0,082 \pm 0,029$  mg/L,  $0,106 \pm 0,035$  mg/L e  $0,181 \pm 0,016$  mg/L nos tempos de 0 a 6h, 6 a 12h e 12 a 24h, respectivamente. Para o tratamento que foi adicionado 10g de triptofano/Kg de ração, as médias foram de  $0,050 \pm 0,043$  mg/L,  $0,135 \pm 0,070$  mg/L e  $0,139 \pm 0,061$  mg/L, na mesma ordem crescente de tempo. Nos tratamentos com a adição de 15 e 20g de triptofano/Kg de ração, no tempo de 0 a 6h, as médias foram de  $0,039 \pm 0,050$  mg/L e  $0,056 \pm 0,043$  mg/L; no tempo de 6 a 12h, as médias foram de  $0,107 \pm 0,052$  mg/L e  $0,090 \pm 0,017$  mg/L e no tempo de 12 a 24h, médias em  $0,214 \pm 0,183$  mg/L e  $0,140 \pm 0,059$  mg/L, respectivamente. Estes resultados podem ser observados na figura 1.

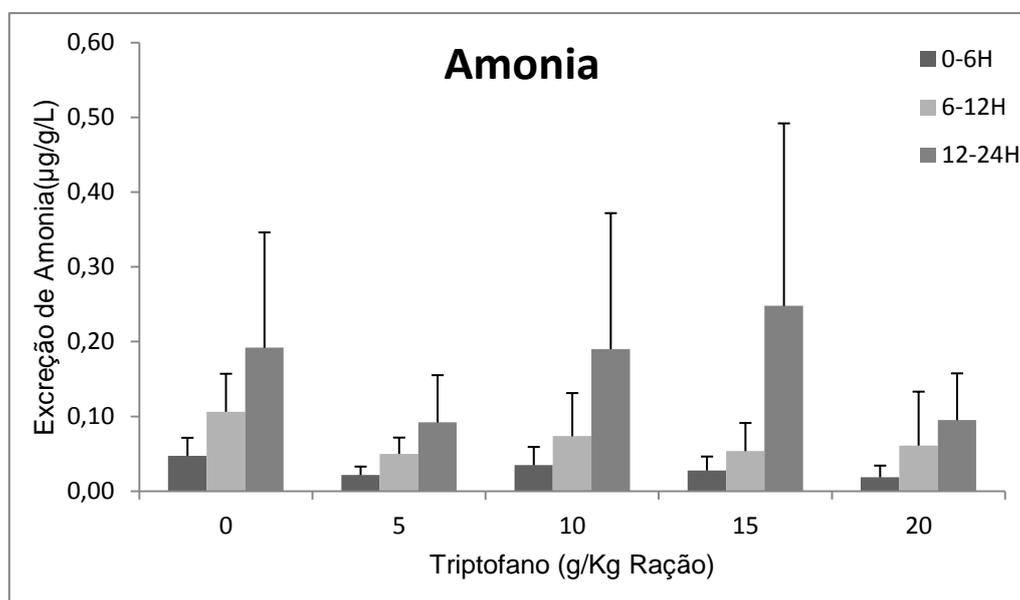


**Figura 1:** Taxa de excreção de ureia dos peixes em  $\mu\text{g/g/L}$  presentes nos aquários dos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Considerando a taxa de excreção durante o período de 24hs, resultados diferentes foram relatados em trabalhos realizados por Ismiño-Orbe *et al* (2003) avaliando as taxas de excreção em juvenis de tambaqui (*Clossoma macropomum*), quando submetidos ao estresse por variação da temperatura da água e adensamento dos peixes. Os níveis de ureia, tiveram uma média de 0,0032mg/L. No presente trabalho, os peixes não foram submetidos ao estresse, porém, de uma forma geral, excretaram mais. Isso se deve ao fato de que, peixes carnívoros, como é o caso do robalo, excretarem mais, por terem uma dieta mais rica em nitrogênio, diferentemente do tambaqui, que é uma espécie onívora (Gerin-Ancey, 1976; Porter et al, 1987).

As taxas de excreção de amônia, como já relatado, seguram os mesmos padrões das taxas de ureia: não houve diferença significativa entre os tratamentos, porém, com o passar do tempo as taxas foram subindo gradativamente. Nos períodos de 0-6h e 6-12h, as taxas de excreção de amônia foram de  $0,047 \pm 0,024$  mg/L e  $0,105 \pm 0,051$  mg/L, para o tratamento 0, sem a adição de triptofano;  $0,022 \pm 0,011$  mg/L e  $0,050 \pm 0,022$  mg/L, para o tratamento 5;  $0,035 \pm 0,024$  mg/L e  $0,074 \pm 0,058$  mg/L, para o tratamento 10;  $0,028 \pm 0,019$  mg/L e  $0,054 \pm 0,038$  mg/L, para o tratamento 15 e  $0,019 \pm 0,016$  mg/L e  $0,061 \pm 0,072$  mg/L para o tratamento 20, respectivamente. No tempo de

12-24hs, nos tratamentos 0,5,10,15 e 20, as médias foram de  $0,192 \pm 0,154$  mg/L;  $0,092 \pm 0,063$  mg/L;  $0,190 \pm 0,182$  mg/L;  $0,248 \pm 0,244$  mg/L e  $0,095 \pm 0,063$  mg/L, respectivamente. Estes resultados podem ser observados na figura 2.



**Figura 2:** Taxa de excreção de amônia dos peixes em  $\mu\text{g/g/L}$  presentes nos aquários dos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O padrão crescente de excreção de amônia e ureia encontrado no presente trabalho foi diferente do encontrado por Ismiño-Orbe *et al* (2003), em experimentos com tambaqui previamente submetidos a estresse de variação de temperatura da água e massa de peixe, onde as taxas de excreção de amônia apresentaram picos ao longo do dia, não obedecendo um padrão crescente.

#### 4.2. Experimento 2: Animais transportados e não-transportados

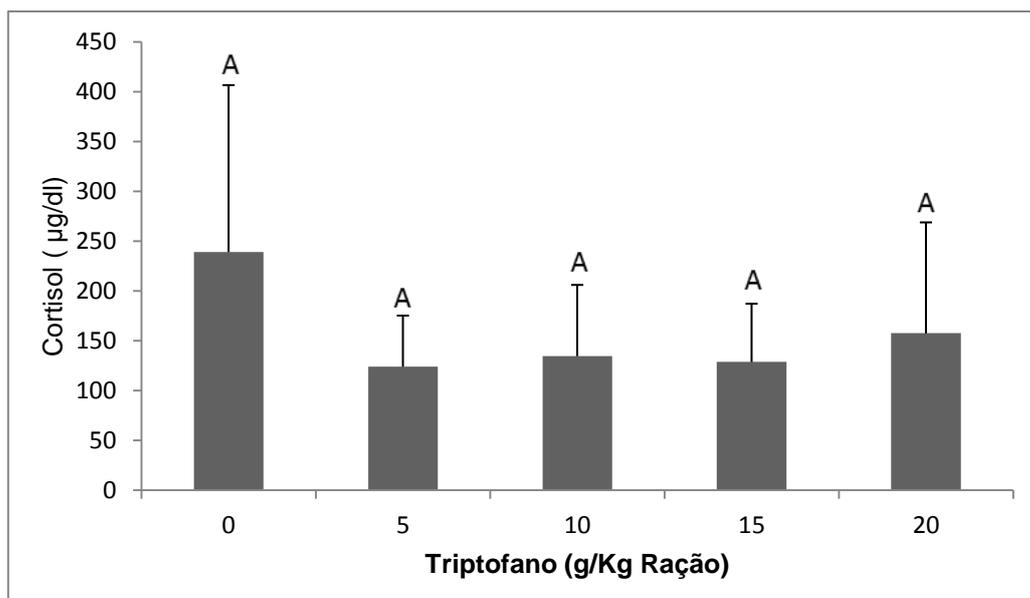
Os parâmetros de qualidade da água após o transporte foram: oxigênio dissolvido:  $11,48 \pm 3,22$  mg/L; temperatura:  $25,46 \pm 1,28$  °C; salinidade:  $15,1 \pm 0,58$ ; condutividade:  $25,02 \pm 0,74$  mS/cm; pH:  $6,14 \pm 0,08$ .

##### 4.2.1. Cortisol e Lactato plasmático

O cortisol plasmático é considerado resposta primária de estresse, uma vez que, a submissão a uma situação estressante, resulta em um rápido

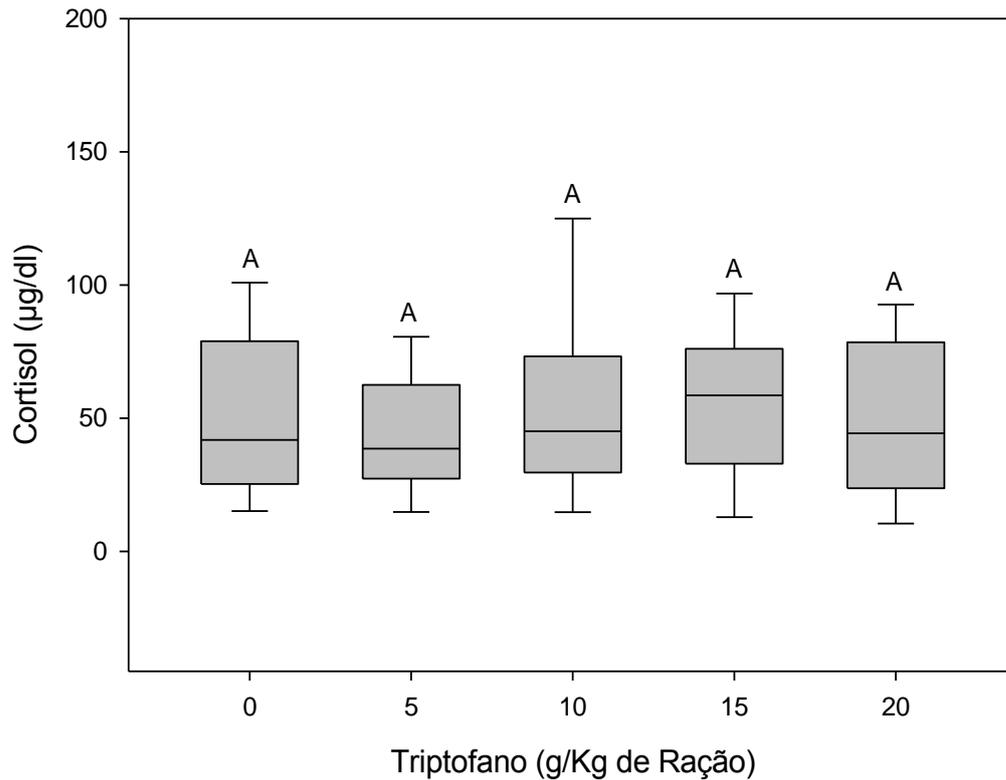
aumento dos níveis, interferindo diretamente no balanço hidromineral e metabolismo energético (Oba, *et al.* 2009).

Os níveis de cortisol plasmático dos peixes que não foram transportados tiveram uma média de  $156,87 \pm 92,07 \mu\text{g/dl}$ . Os diferentes tratamentos tiveram uma distribuição normal paramétrica e não houve diferença significativa entre os dados obtidos dos diferentes tratamentos com e sem a adição de triptofano (figura 3).



**Figura 3:** Níveis de cortisol plasmático em  $\mu\text{g/dl}$  em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, para os seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais demonstram que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para os peixes transportados, a distribuição foi não paramétrica, sem diferença estatística entre os tratamentos e os resultados expressos em mediana: para os tratamentos 0, 5, 10, 15 e 20, respectivamente os valores  $41,84\mu\text{g/dl}$ ;  $38,54\mu\text{g/dl}$ ;  $45,06\mu\text{g/dl}$ ;  $58,52\mu\text{g/dl}$  e  $44,28\mu\text{g/dl}$ . Esses dados também não demonstraram diferenças significativas entre si, mesmo com o tratamento no qual não foi adicionado triptofano na ração, conforme mostrado na figura 4.



**Figura 4:** Níveis de cortisol plasmático em  $\mu\text{g/dl}$  em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma kruskal-wallis ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Trabalhos realizados por Inoue *et al.* (2005) com o matrinxã (*Brycon cephalus*) demonstraram que, ao serem submetidos a uma situação de estresse, com uso de mitigadores (anestésicos), os níveis de cortisol plasmático aumentaram em relação ao controle.

Em estudos promovidos por Hoseini *et al.* (2012), a suplementação de triptofano na dieta de carpa comum (*Cyprinus carpio*), quando esta foi exposta a níveis tóxicos de cobre, mostrou que os níveis de cortisol se elevaram logo no início da exposição ao metal, porém, após 72h, os níveis baixaram e foram significativamente mais baixos em relação ao grupo controle.

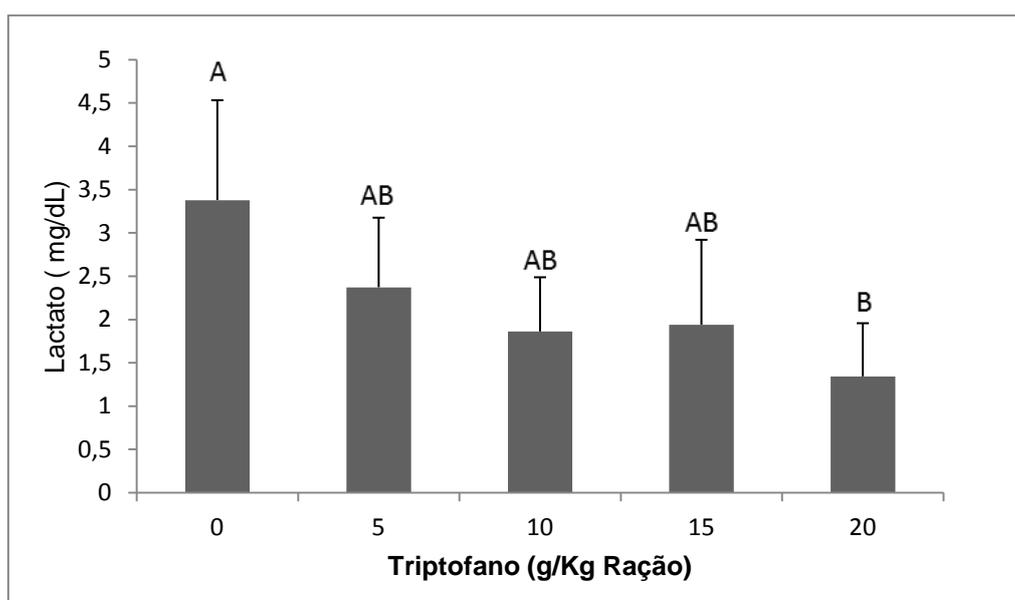
Herrero *et al.* (2007), ao testarem a suplementação de triptofano nas rações de *Dicentrarchus labrax*, demonstrando as repostas dos níveis de absorção após 15, 180 e 480 min após a ingestão, mostraram que, nas dietas suplementadas, os níveis de cortisol plasmático ficaram em níveis menores

( $P < 0,05$ ) do que o grupo controle, mesmo 480min após a ingestão, porém, não houve diferenças significativas nos demais tratamentos com triptofano.

Winberg *et al.*, (2001) e Lepage *et al.* (2002), testando a suplementação de triptofano na alimentação de tuta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), com a intenção de suprimir o comportamento agressivo dos animais, mostraram que, os níveis de cortisol plasmático não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos com triptofano, porém, em análises cerebrais, pode-se concluir que o triptofano agiu de forma a atenuar o comportamento agressivo dos peixes. O mesmo resultado para cortisol foi encontrado por Wolkers *et al.* (2012) em juvenis de matrinxã, submetidos ao estresse em contato com um peixe invasor.

O aumento do lactato geralmente ocorre quando o oxigênio não está disponível para o metabolismo celular aeróbico (Iversen *et al.* 2003) e geralmente ocorre após eventos estressantes que envolvem atividade muscular elevada, como natação e/ou exercício de grande gasto energético (Barton *et al.* 2002).

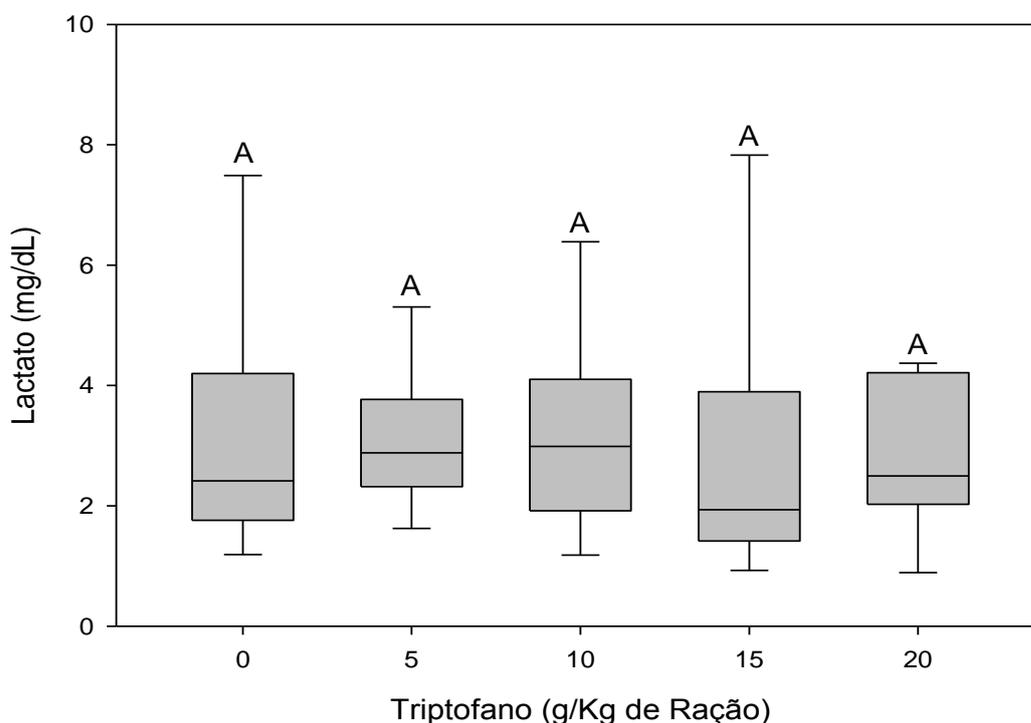
Os níveis de lactato plasmático do grupo que não foi transportado tiveram distribuição normal paramétrica, e houve diferença significativa para o tratamento 0 ( $3,37 \pm 1,15$  mg/dL), que demonstrou níveis maiores de triptofano em relação ao tratamento 20 ( $1,34 \pm 0,61$  mg/dL) (figura 5).



**Figura 5:** Níveis de Lactato plasmático em mg/dL em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, para os seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de

Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras diferentes demonstram diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O grupo transportado assim como no cortisol, para o lactato também houve distribuição não paramétrica, sem diferença estatística. Os resultados, expressos em mediana, foram os seguintes: 2,41mg/dL; 2,88mg/dL; 5,38mg/dL; 1,93mg/dL e 2,49mg/dL; para os tratamentos 0, 5, 10, 15, e 20 respectivamente. (figura 6).



**Figura 6:** Níveis de Lactato plasmático em mg/dL em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma kruskal-wallis ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

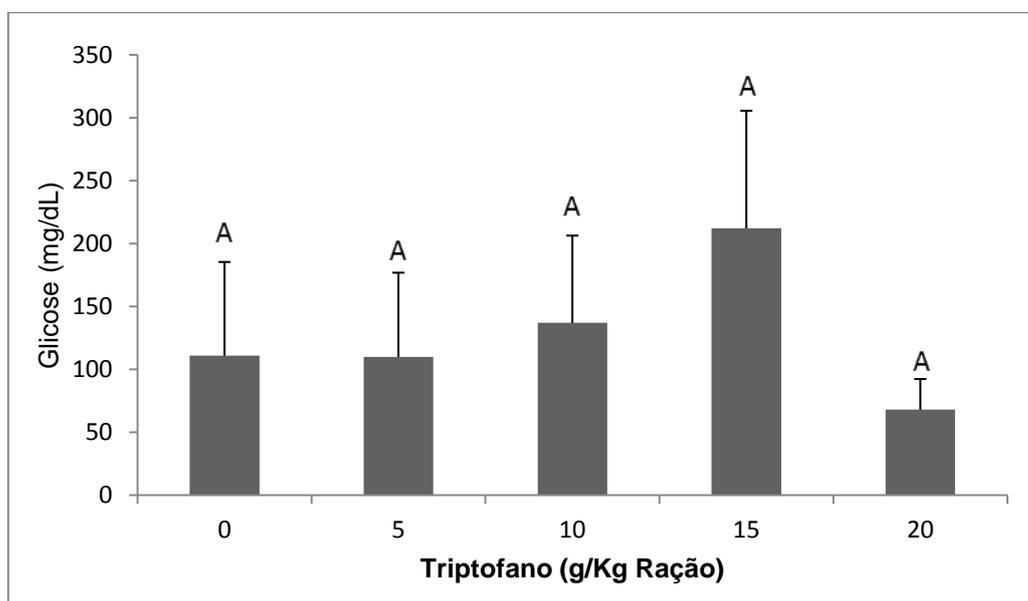
Trabalhos realizados por Inoue *et al.* (2005), no transporte de matrinxã, observaram que os níveis plasmáticos de lactato de peixes transportados com mitigadores de estresse (anestésico), foram significativamente menores do que o grupo controle, porém, Brandão *et al.* (2008) trabalhando com o transporte de juvenis de pirarucu, com o uso de sal

como mitigador, os níveis de lactato não apresentaram diferenças significativas dentre os tratamentos comparativamente com o controle.

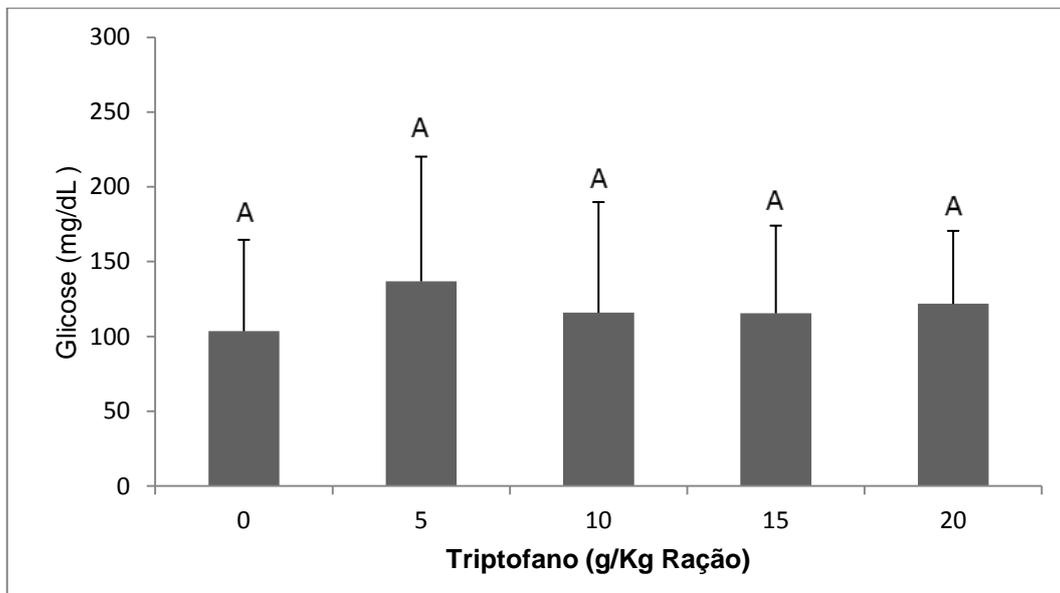
Laranja-Jr *et al.* (2010) observaram que os níveis de triptofano que melhor mitigaram o estresse em *Scylla serrata* (carangueijo), em experimentos com estresse, foram as concentrações de 0,75% e 1,0% de triptofano incluídos na ração, a partir de 15 dias de alimentação, onde a intensidade e a frequência de atos agressivos tiveram redução significativa.

#### 4.2.2. Glicose sanguínea e Glicogênio hepático

Os níveis médios de glicose e glicogênio apresentaram distribuição normal, paramétrica, sem diferença estatística entre os tratamentos. Para a glicose, os diferentes tratamentos Triptofano, dentre os animais que não foram submetidos ao transporte, foram obtidas as médias entre 212,25±93,43 mg/dL e 68±24,50 mg/dL (figura 7), enquanto para os animais submetidos ao transporte, as médias ficaram entre 136,9±83,38 mg/dL e 103,55±61,14 mg/dL (figura 8).

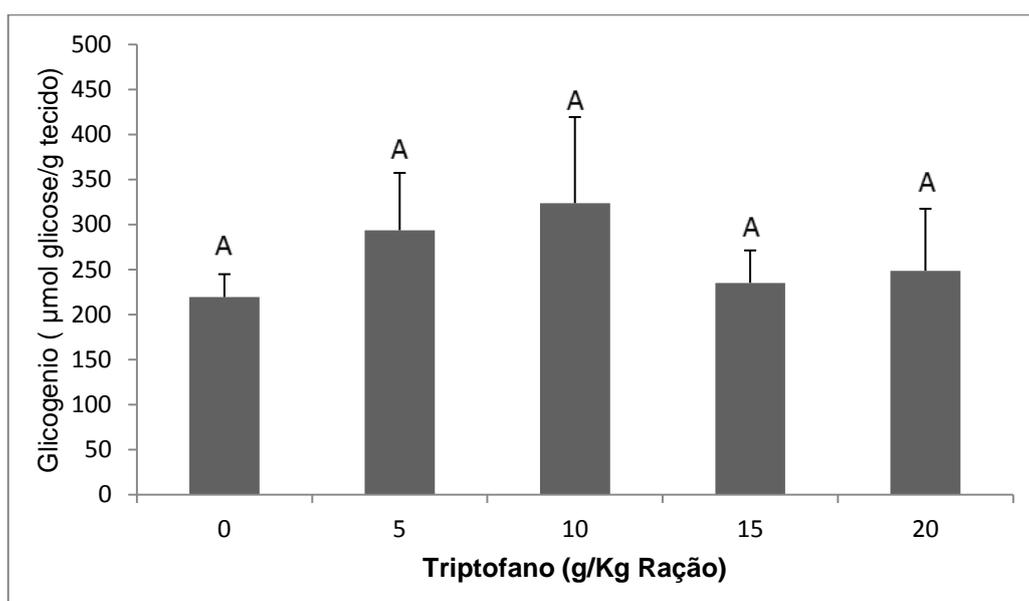


**Figura 7:** Níveis de Glicose sanguínea em mg/dL em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, para os seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais demonstram que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

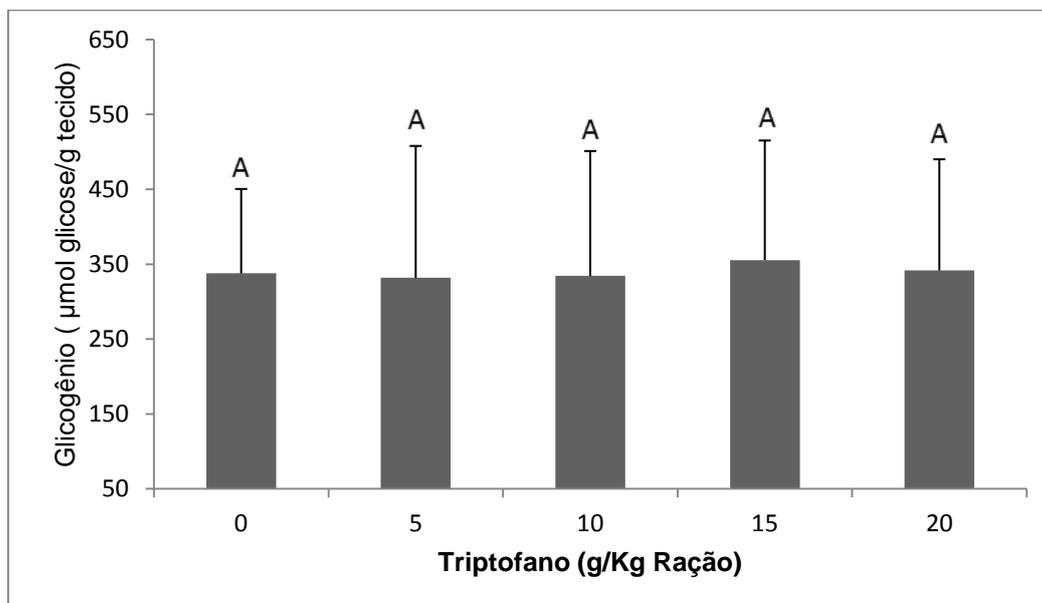


**Figura 8:** Níveis de Glicose sanguínea em mg/dL em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, para os seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais demonstram que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os valores de glicogênio tiveram uma média de  $263,97 \pm 57,91$   $\mu\text{mol}$  glicose/g tecido, para os animais que não foram submetidos ao transporte (figura 9) e de  $340,26 \pm 152,79$   $\mu\text{mol}$  glicose/g tecido nos animais que foram submetidos ao transporte (figura 10).



**Figura 9:** Níveis de Glicogenio hepático em  $\mu\text{mol}$  glicose/g tecido em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, para os seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais demonstram que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 10:** Níveis de Glicogenio hepático em  $\mu\text{mol}$  glicose/g tecido em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, para os seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais demonstram que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Wolkers *et al.* (2012) utilizando ração suplementada com diferentes níveis de triptofano, também demonstraram que não houveram diferenças significativas nem para glicose, nem para glicogenio, em trabalho com juvenis de matrinxã submetidos a estresse ocasionado pela invasão de um outro peixe no aquário.

Gomes *et al.* (2003b), observaram que no transporte com o uso de sal como mitigador de estresse, houve uma diferença significativa nas taxas de glicose sanguínea logo após o transporte (comparativamente com o tratamento controle), para juvenis de tambaqui.

No transporte de matrinxã, utilizando-se óleo de cravo como mitigador de estresse, Inoue *et al.* (2005), observaram que não houve diferença

significativa entre os níveis de glicose dos peixes não-estressados (não transportados) com aqueles submetidos ao transporte, ao mesmo passo que, nas análises de glicogenio, não houveram diferenças significativas entre os peixes transportados com ou sem o uso do mitigador de estresse.

#### 4.2.3. Enzimas GST e Catalase

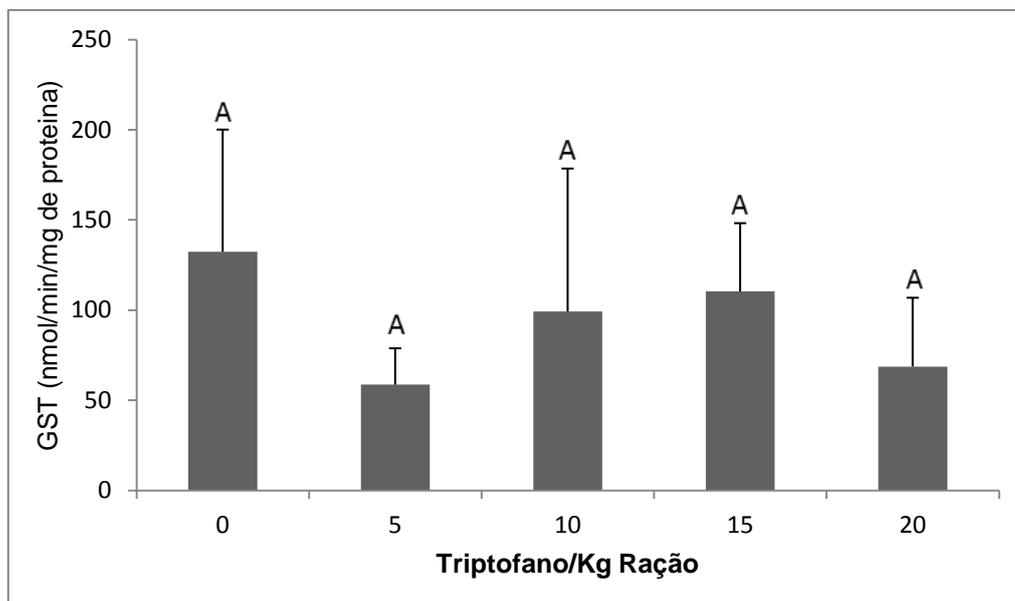
A GST (Glutathione S-Transferase) representa uma importante família de enzimas, primariamente citosólicas, que catalisam a conjugação de vários compostos com o tripeptídeo glutathione, além de desempenharem papéis adicionais no processo de detoxificação. O fígado é a principal fonte de GST em peixes, onde essa enzima corresponde a uma grande fração das proteínas hepáticas solúveis, porém, a atividade da GST já foi descrita em tecidos extra-hepáticos de peixes, entretanto, a atividade nesses tecidos geralmente é menor do que no fígado (Garcia & Martinez, 2012).

Na literatura, existem relatos tanto de atividade aumentada da GST, que pode estar associado ao processo adaptativo do organismo à uma variedade de compostos orgânicos no ambiente (Gallacher *et al.*, 2001), quanto de redução da GST em peixes de lugares poluídos ( Van Der Oost *et al.*, 2003), demonstrando os diferentes resultados de GST devem ser analisados de forma cuidadosa, e sempre comparados a outros.

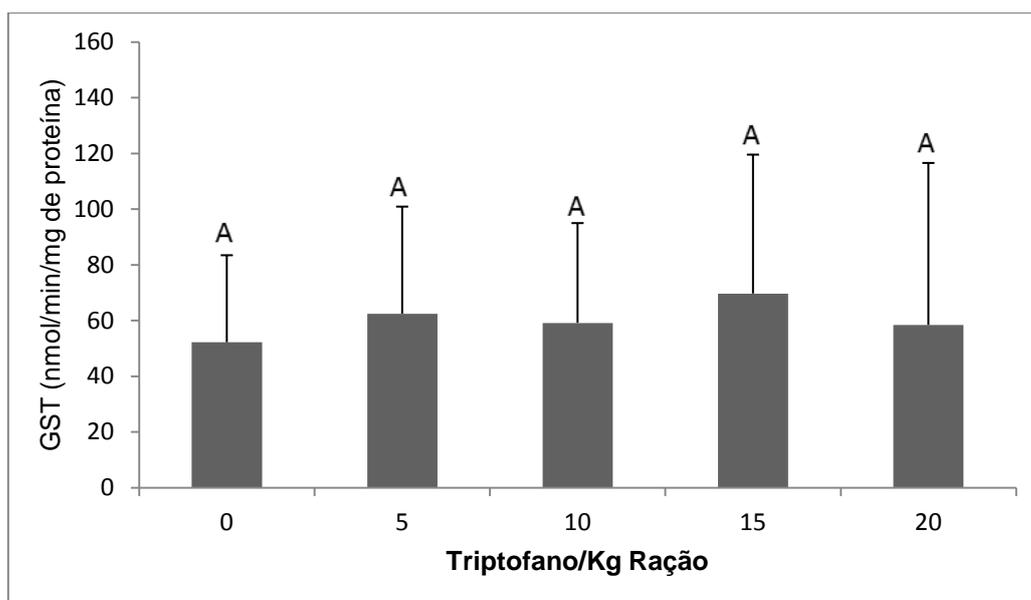
A catalase está presente em todos os tecidos dos vertebrados, com atividade relativamente alta nos eritrócitos e no fígado, porém, a atividade catalásica no cérebro é relativamente baixa. Essa enzima, também está relacionada com o hábito alimentar dos peixes, onde, geralmente sua atividade tende a ser menor nos herbívoros do que nos onívoros e carnívoros (Lackner, 1998)

As enzimas GST e Catalase, foram mensuradas em dois órgãos dos peixes: fígado e branquias. Para a GST branquial, os dados tiveram distribuição normal, paramétrica e não houve diferença significativa entre os tratamentos nem no grupo transportado, nem no grupo que não foi submetido ao transporte. No grupo que não foi submetido ao transporte, as médias tiveram valores entre  $132,36 \pm 0,07$  nmol/min/mg de proteína e  $58,65 \pm 20,19$  nmol/min/mg de proteína (figura 11). No grupo transportado, as médias ficaram

69,67±49,86 µg/min/mg de proteína e 52,20±31,21 µg/min/mg de proteína (figura 12).



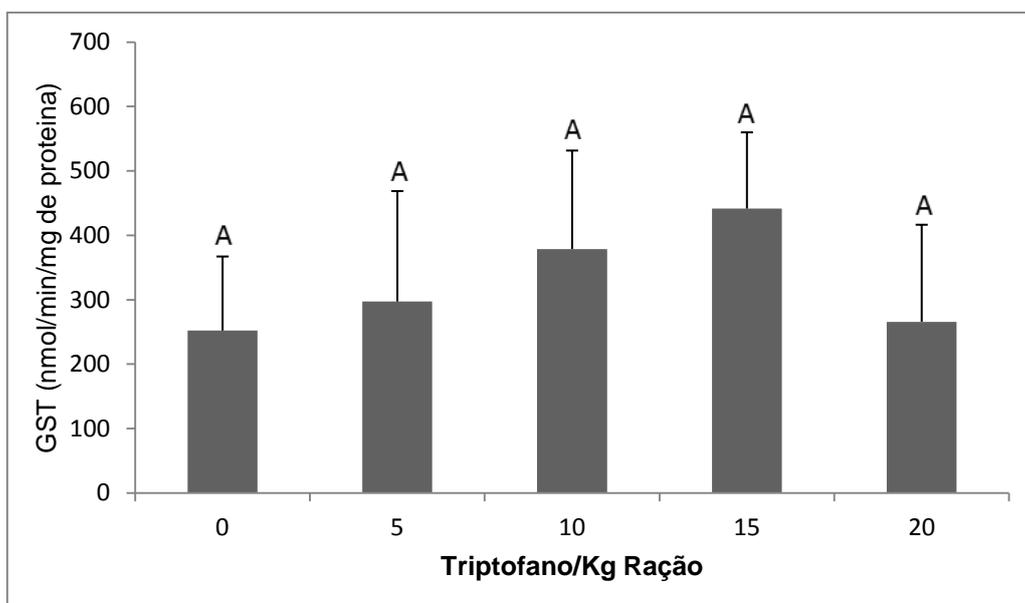
**Figura 11:** Atividade da enzima GST no tecido branquial em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



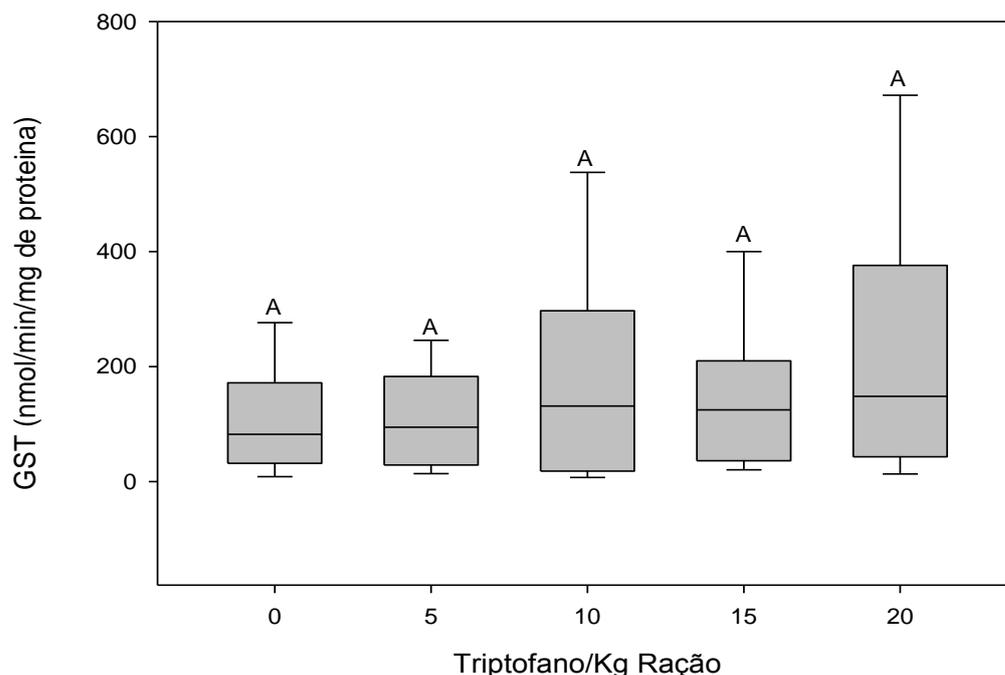
**Figura 12:** Atividade da enzima GST no tecido branquial em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na GST hepática, no grupo não transportado observou-se distribuição normal paramétrica, sem diferença estatística entre os tratamentos, com os valores médios entre  $441,42 \pm 118,34$  nmol/min/mg de proteína e  $252,07 \pm 114,92$  nmol/min/mg de proteína; (figura 13). Já para o grupo transportado, houve uma distribuição não paramétrica, sem diferença estatística dentre os tratamentos, sendo assim, valores expressos com mediana, para os tratamentos 0= 81,966 nmol/min/mg de proteína; 5= 94,65 nmol/min/mg de proteína; 10= 131,44 nmol/min/mg de proteína; 15= 124,58 nmol/min/mg de proteína e 20= 148,2 nmol/min/mg de proteína (figura 14).

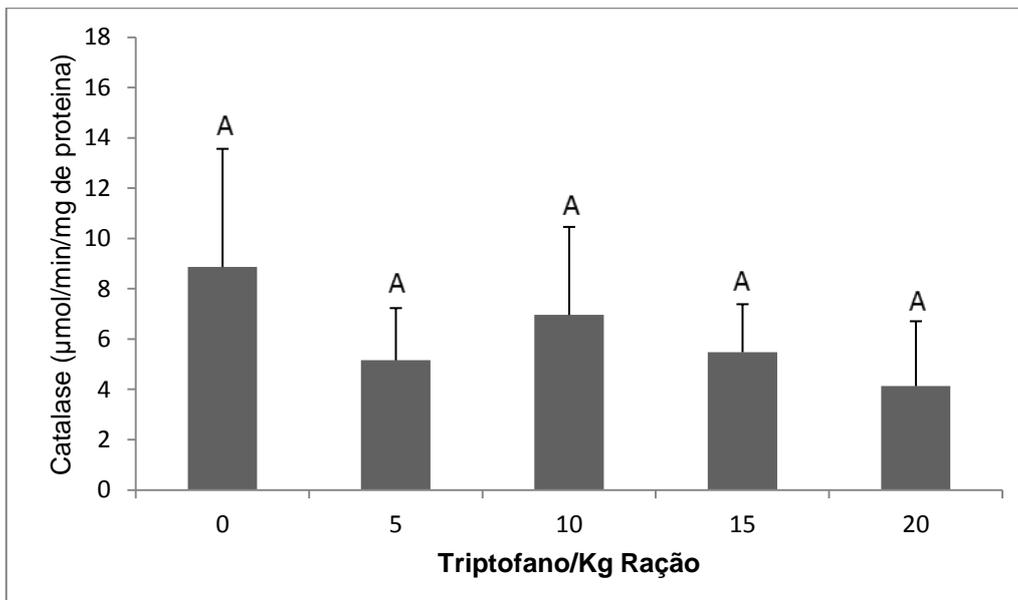


**Figura 13:** Atividade da enzima GST no tecido hepático em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

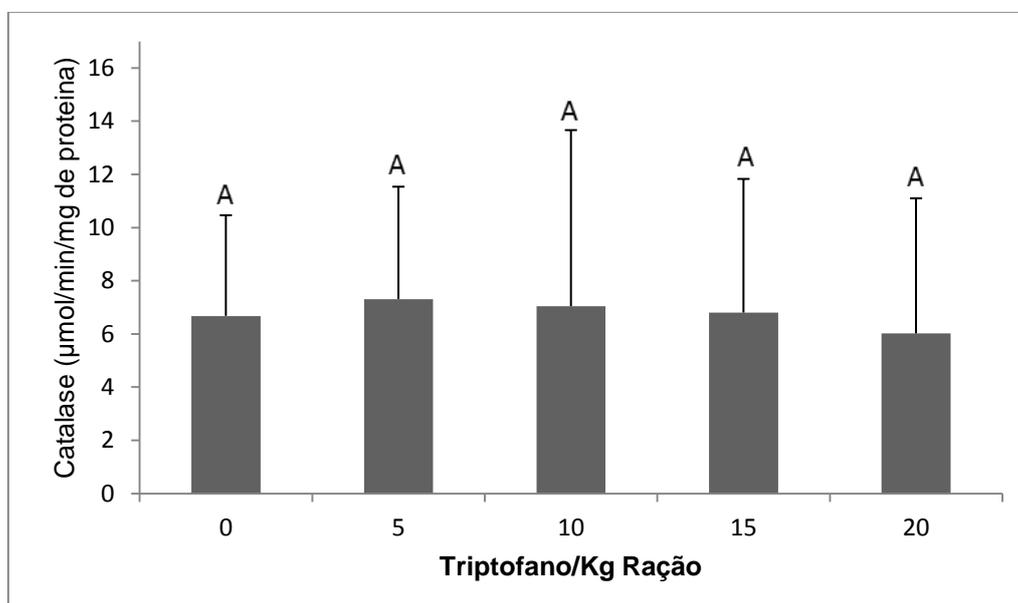


**Figura 14:** Atividade da enzima GST no tecido hepático em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma kruskal-wallis ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na Catalase branquial, os dados tiveram distribuição normal, paramétrica e sem diferença estatística dentre os tratamentos, para os transportados e não transportados. As médias seguidas de desvio padrão ficaram entre  $8,87 \pm 4,69$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína e  $4,13 \pm 2,58$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para o grupo não transportado (figura 15) e entre  $7,30 \pm 4,22$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína e  $6,01 \pm 5,07$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína para o grupo transportado (figura 16).



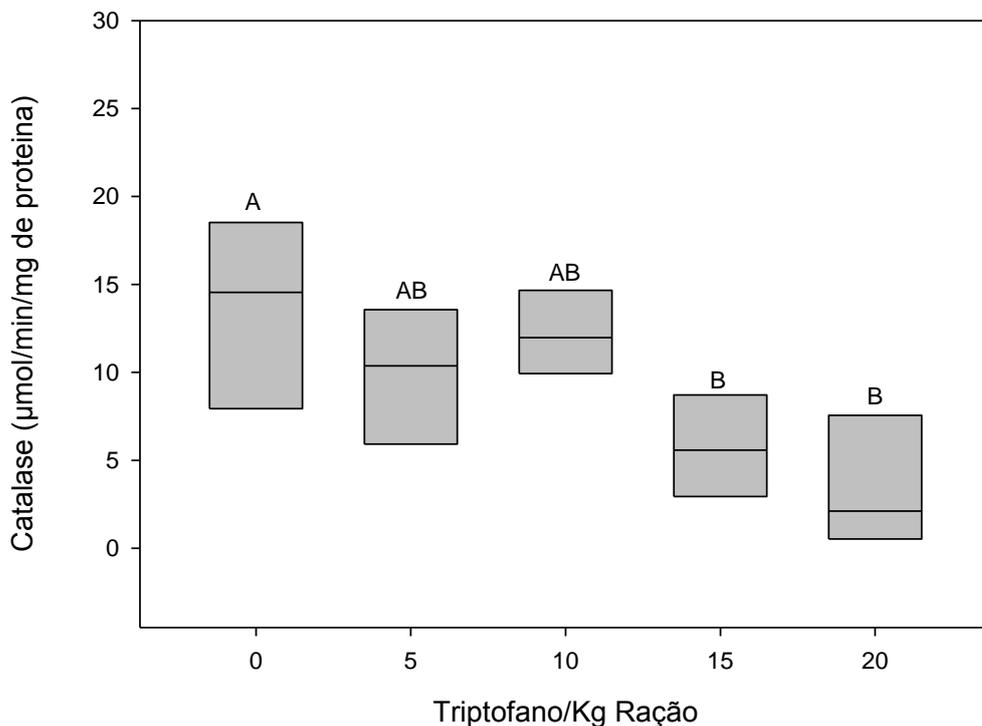
**Figura 15:** Atividade da enzima Catalase no tecido branquial em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



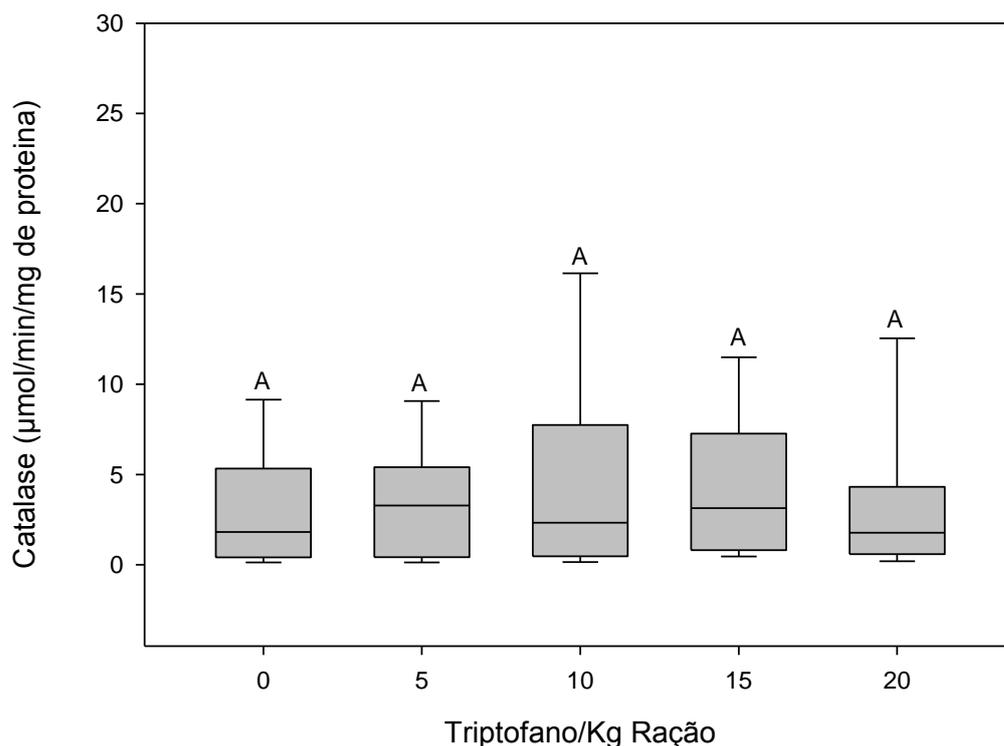
**Figura 16:** Atividade da enzima Catalase no tecido branquial em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para a Catalase hepática, tanto o grupo transportado quanto o grupo não transportado tiveram distribuição não paramétrica, porém, no grupo não transportado, pode-se observar uma diferença significativa de redução da atividade da enzima, nos tratamentos 15 e 20. As medianas tiveram valores de 14,54  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; 10,37  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; 11,47  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; 5,57  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína e 2,12  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína (figura 17).

No grupo transportado, não houve diferença significativa dentre os tratamentos e as medianas foram de 1,81  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; 3,28  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; 2,33  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; 3,13  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína e 1,77  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; para os tratamentos 0, 5, 10, 15 e 20 respectivamente (figura 18).



**Figura 17:** Atividade da enzima Catalase no tecido hepático em *Centropomus parallelus*, no grupo não submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma kruskal-wallis ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 18:** Atividade da enzima Catalase no tecido hepático em *Centropomus parallelus*, no grupo submetido ao transporte, expostos aos seguintes tratamentos: 0= 0g de Triptofano/Kg de Ração; 5= 5g de Triptofano/Kg de Ração; 10= 10g de Triptofano/Kg de Ração; 15= 15g de Triptofano/Kg de Ração e 20= 20g de Triptofano/Kg de Ração. Os dados estão expressos em mediana com interquartil máximo de 75% e mínimo de 25%. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os tratamentos. Os dados foram analisados por uma kruskal-wallis ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Pereira-da-Silva *et al.* (2012), realizando trabalhos com tilápias submetidas ao estresse de confinamento, observaram uma redução da atividade enzimática da enzima catalase, tanto na musculatura branca, quanto na musculatura vermelha dos peixes, enquanto para os peixes não estressados, a atividade manteve-se a níveis basais. Essa característica foi inversa ao apresentado no presente trabalho pois, a atividade enzimática hepática dos peixes não transportados (não submetidos ao estresse), mostraram níveis decrescentes com o aumento da quantidade de triptofano. As concentrações de 15 e 20g/Kg de ração demonstraram redução significativa em relação aos demais tratamentos de níveis menores de introdução de triptofano.

De acordo com estudos realizados por Almeida *et al.* (2009), em testes de agressividade com tilápias do nilo, observou-se que, peixes expostos

a cádmio reduziram significativamente a atividade da enzima catalase em tecido hepático (em relação ao controle, não contaminado), reduzindo também a agressividade dos peixes testados.

Carvalho-Neta & Abreu-Silva (2010), relataram em trabalhos com *Sciades herzbergii*, expostos a um estresse oxidativo, que houve um aumento significativo tanto na enzima Catalase, quanto na GST, em relação a organismos controle, não submetidos ao estresse. No presente trabalho, a enzima catalase no tecido hepático demonstrou um padrão inverso, enquanto a enzima GST, não apresentou diferenças significativas em nenhum dos tecidos testados, nem nos organismos transportados ou não transportados nos diferentes tratamentos.

Trabalhos realizados por Garcia & Martinez (2012), expondo peixes da espécie *Prochilodus lineatus* à *Microcystis aeruginosa*, que correspondem a metabólitos tóxicos produzidos por cianobactérias que provocam alterações no ambiente natural, revelaram que a atividade da enzima GST nas brânquias não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, independentemente do tempo de exposição (assim como no presente estudo), porém, demonstraram aumento significativo no tecido hepático em relação ao seu respectivo controle.

## **5. CONCLUSÕES**

A concentração de triptofano adicionada a ração não influencia na excreção de produtos nitrogenados.

O uso do triptofano nas concentrações testadas não apresentou um efeito redutor de estresse em robalo peva durante o transporte.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 105, 121-126.
- ALTINOK, I.; GRIZZLE, J.M. 2004. Excretion of ammonia and urea by phylogenetically diverse fish species in low salinities. *Aquaculture*. 238: 499–507.
- ALMEIDA, J.A.; BARRETO, R.E.; NOVELLI, E.L.; CATRO, F.J.; MORON, S.E. 2009. Oxidative stress biomarkers and aggressive behavior in fish exposed to aquatic cadmium contamination. *Neotropical Ichthyology*. 7(1): 103-108.
- AMARAL-JUNIOR, H.; SANTOS, J.J.; GERHARDINGER, R.C. 2009. Monocultivo de robalo *Centropomus parallelus* em água doce. *Revista Eletrônica de Veterinária*. 10(10):157-165.
- ANDERSON, R.A. 1981. Nutritional role of chromium. *The Science of the Total Environment*. 17:13-19.
- APHA. 1998. Standard Methods for examination of water and the wastewater. *American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation*, 20<sup>o</sup>ed. Washington.
- ARAÚJO, W.A.G.; SOBREIRA, G.F. 2008. Proteína ideal como estratégia na alimentação de suínos. *Revista Eletrônica Nutritime*. 5(2): 537-545.
- BALDISSEROTTO, B. 2002. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria, RS. Editora UFSM. 212 p.
- BARTON, B.A.; MORGAN, J.D.; VIJAYAN, M.M. 2002. Physiological and Condition-Related Indicators of Environmental Stress in Fish. In: ADAMS, S.M. (Ed), Biological indicator of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda. 4:111-148.
- BALDESSARINI, R.J. 1984. Treatment of depression by altering monoamine metabolism: precursors and metabolic inhibitor. *Psychopharmacol Bull* 20: 224-239.

- BIGGIO, G.; FADDA, F.; FANNI, P.; TAGLIAMONTE, A.; GESSA, G.L. 1974. Rapid depletion of serum tryptophan, brain tryptophan, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid by tryptophan-free diet. *Life Science*. 14:1321-1329.
- BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C. 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica*. Manaus. AM. 36(3):349-356.
- BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CRESCÊNCIO, R.; CARVALHO, E.S. 2008. Uso de sal durante o transporte de juvenis (1Kg) de pirarucu (*Arapaima gigas*). *Acta Amazonica*. Manaus. AM. 38(4):767-771.
- CARVALHO-NETA, R.N.F.; ABREU-SILVA, A.L. 2010. *Sciades herzbergii* oxidative stress biomarkers: an *in situ* study of an estuarine ecosystem (São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil). *Brazilian Journal Oceanography*. 58(4): 11-17.
- CERQUEIRA, V.R. 2010. Cultivo do robalo-peva (*Centropomus parallelus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Eds.) *Espécies Nativas para piscicultura no Brasil*. 2 ed. Santa Maria. RS. Editora da UFSM. 470p.
- CHOUINARD, G.; YOUNG, S.N.; BRADWEJ, J.; ANNABLE, L. 1979. Tryptophan-nicotinamide, imipramine and their combination in depression: a controlled study. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 59:395-414.
- CHOUINARD, G., YOUNG, S.N., BRADWEJ, J.; ANNABLE, L. 1983. Tryptophan in the treatment of depression and mania, In: VAN PRAAG, H.M. & MENDLEWICZ, J. (eds.). *Management of Depression with Monoamine Precursors: Advances in Biological Psychiatry*. 10:47-66.
- COLE, J.; HARTMANN, E.; BRIGHAM, P. 1980. L-tryptophan: clinical studies. In: COLE, J. (ed.) – *Psychopharmacology New York, Update*. Lexington, The Collamore Press. p. 119-148.
- COOPER, A.J. 1979. Tryptophan antidepressant "physiological sedative": fact or fancy?. *Psychopharmacol* 61: 97-102.

- CORREA, C.F.; LEONARDO, A.F.G.; TACHIBANA, L.; CORRÊA-JUNIOR, L. 2010. Frequência Alimentar para juvenis de robalo-peva criados em água doce. *Revista Acadêmica de Ciência Agrária e Ambiental*. Curitiba. PR. 8(4):429-436.
- COSTA, O.F.T.; FERREIRA, D.J.S.; MENDONÇA, F.L.P.; FERNANDES, M.N. 2004. Susceptibility of the Amazonian fish, *Clossoma macropomum* (Serrasalminae) to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*. 232:627-636.
- DUBOIE, M.G.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; ROBERTS, P.A.; SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-358.
- EICHELMAN B. 1987. Neurochemical and psychopharmacologic aspects of aggressive behavior, in *Psychopharmacology: The third generation of progress*. Edited by Meltzer HY. New York, Raven. p. 697-704.
- FAVERET FILHO, P.; SIQUEIRA, S.H.G. 1997. Panorama da pesca no mundo e no Brasil. *Agroindústria - BNDES Setorial*. 12 p. Disponível em: [bndes.gov.br](http://bndes.gov.br). Acesso em: out 2012.
- GALLAGHER, E.P.; GROSS, T.S.; SHEEHY, K.M. 2001. Decreased glutathione S-transferase expression and activity and altered sex steroids in lake Apopka brown bullheads (*Ameirus nebulosus*). *Aquat. Toxicol.*, 55: 223-237.
- GARCIA, C.Z.; MARTINEZ, C.B.R. 2012. Biochemical and genetic alterations in the freshwater neotropical fish *Prochilodus lineatus* after acute exposure to *Microcystis aeruginosa*. *Neotropical Ichthyology*. 10(3): 613-622.
- GODINHO, H.M.; SERRALHEIRO, P.C.S.; FERRAZ, E.M.; PIMENTEL, C.M.M.; OLIVEIRA, I.R.; PAIVA, P. 2000. Reprodução induzida em robalo, *Centropomus parallelus* *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. São Paulo. SP. 37(1). 5p.
- GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; CHIPPARI-GOMES, A.R.; BALDISSEROTTO, B. 1999. Effect of salt in the water for transport on Survival and on Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> body levels of Silver Catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. *Journal of Applied Aquaculture*. 9(4):1-9.

GOMES, L.C.; CHIPPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAÚJO-LIMA, C.A.R. M. 2001. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui, *Clossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32:426-431.

GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R.; CHIPPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P. 2003a. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Clossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 34:76-84.

GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E.C. 2003b. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 38(2):283-290.

GUERIN-ANCEY, O. 1976. Etude experimentale de l'excrétion azotée du bar (*Dicentrarchus labrax*) em cours de croissance- I: effets de la température et du poids du corps sur l'excrétion d'ammoniac et d'urée. *Aquaculture*, 9(1):71-80.

HABIG, W.H., PABST, W.B., JAKOBY, W.B., 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249, 7130-7139.

HABIG, W.H., JAKOBY, W.B., 1981. Assays for differentiation of Glutathione S-transferases. *Methods Enzymol*. 77, 398-405.

HERRERO, M.J.; MARTÍNEZ, F.J.; MÍGUEZ, J.M.; MADRID, J.A. 2007. Response of plasma and gastrointestinal melatonin, plasma cortisol and activity rhythms of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to dietary supplementation with tryptophan and melatonin. *Journal of Comparative Physiology B*. 177: 319-326.

HOGLUND, E.; BAKKE, M.J.; OVERLI, O.; WINBERG, S.; NILSSON, G.E. 2005. Suppression of aggressive behavior in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by L-tryptophan supplementation. *Aquaculture*. 249:525-531.

HOSEINI, S.M.; HOSEINI, S.A.; SOUDAGAR, M. 2012. Dietary tryptophan changes serum stress markers, enzyme activity, and ions concentration of wild

common carp *Cyprinus carpio* exposed to ambiente copper. *Fish Physiology Biochemistry*. 38: 1419-1426.

INOUE, L.A.K.A.; AFONSO, L.O.B.; IWAMA, G.K.; MORAES, G. 2005. Efeitos do óleo de cravo na resposta de estresse do matrinxã (*Brycon cephalus*) submetido ao transporte. *Acta Amazonica*. 35:2.

ISMIÑO-ORBE, R.A.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; GOMES, L.C. 2003. Excreção de amônia por tambaqui (*Colossoma macropomum*) de acordo com variações na temperatura da água e massa do peixe. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. (38)10: 1243-1247.

IVERSEN, M.; FINSTAD, B.; MCKINLEY; ELIASSEN, R. 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, aqui-s and benzoak as anesthetics in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, 221: 549-566.

JOHNSTON, W.L.; ATKINSON, J.L.; HILTON, J.W.; WERE, K.E. 1990. Effect of dietary tryptophan on plasma and brain tryptophan, brain serotonin, and brain 5-hydroxyindole-acetic acid in rainbow trout. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 1:49-54.

KAPCZINSKI, F.; BUSNELLO, J.; ABREU, M.R.; CARRÃO, A.D. 1998. Aspectos da Fisiologia do Triptofano. *Revista de Psiquiatria Clínica*. 25(4):158-165.

LACKNER, R. 1998. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (eds.) *Fish ecotoxicology*. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, p. 203-224.

LARANJA-JR, J.L.Q.; QUINTIO, E.T.; CATACUTAN, M.R.; COLOSO, R.M. 2010. Effects of dietary L-tryptophan on the agonistic behavior, growth and survival of juvenile mud crab *Scylla serrata*. *Aquaculture*. 310:84-90.

LEPAGE, O.; TOTTMAR, O.; WINBERG, S. 2002. Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology*. (205) 3679–3687.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological of chemical*. 193, 265-275.

MEZA, E.A.Z.; VILLALOBOS, J.M.B.; PELÁEZ, C.V.; TORRES, P.A. 2006. Cultivo experimental de Robalo *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) y Chucumite *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) (Perciformes: *Centropomidae*) em água Dulce em um estanque de concreto em Alvarado. *Veterinaria México*. Veracruz, Mexico. 37(3):327-333.

OBA, E.T.; MARIANO, W.S.; SANTOS, L.R.B. 2009. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. Embrapa Amapá, Macapá. 8:226-247.

OLIVEIRA, J.R.; CARMO, J.L.; OLIVEIRA, K.K.C.; SOARES, M.C.F. 2009. Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo-da-índia na água de transporte de tilápia-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*. Viçosa. MG. 38(7):1163-1169.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. 2008. *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. 3 ed. Maringá. PR. EDUEM. 311p.

PEREIRA, L.P.F.; MERCANTE, C.T.J. 2005. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água. Uma Revisão. *Boletim do Instituto de Pesca*. 31(1):81-88.

PEREIRA-DA-SILVA, E.M.; MELO, M.P.; OLIVEIRA, R.H.F.; PUGINE, S.M.P. 2012. Efeito da Catalase e da Lactato desidrogenase em tilápias submetidas a estresse de confinamento: efeito da cor do ambiente. *Ciência Rural*. 42(5):894-899.

PENZ-JÚNIOR, A.M. 2000. A influência da nutrição na preservação do meio ambiente. *5º Seminário internacional de Suinocultura, São Paulo*. p.53-69.

- PINHEIRO, S.R.F.; BARRETO, S.L.T.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S.; UMIGI, R.T.; BRITO, C.O. 2008. Efeito dos níveis de triptofano digestível em dietas para codornas japonesas em postura. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 37(6): 1012-1016.
- PORTER, C.B., KROM, M.D.; ROBBINS, M.G.; BRICKELL, L. DAVIDSON, A. 1987. Ammonia excretion and total –N budget for githead seabream (*Sparus auratus*) and its effect on water quality conditions. *Aquaculture*, 66(2): 287-297.
- QUINTANA, C.F. 2002. *Resposta locais e sistemicas induzidas por endotoxina em Piaractus mesopotamicus (Holmberg,1887) tratados com cromo*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP. Jaboticabal, SP.
- RICE, C.D.; ARKOOSH, M.R. 2002. Immunological Indicators of Environmental Stress and Disease Susceptibility in Fishes. In: ADAMS, S.M. (Ed), Biological indicator of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda. 6:187-220.
- SANTIAGO, C.B. e R.T. LOVELL. 1988. Amino acids requirements for growth of Nile tilapia. *The Journal of Nutrition* 118: 1540-1546. In: FURUYA, W.M. (Eds). 2010. *Tabelas Brasileiras para nutrição de tilápias*. Toledo: GFM. 100 p.
- SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; ALVES JÚNIOR, A.J.; MUNGIOLI, R. 2012. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. *Agroindústria - BNDES Setorial*. 35:421-463.
- SUMMERFELT, R.C.; SMITH, L.S. 1990. Anesthesia, surgery and related techniques. In: SCHERECK, C.B.; MOYLE, P.B. (Eds) *Methods for fish biology*. American Fisheries Society. Maryland, USA. 213-278.
- TEJPAL, C.S.; PAL, A.K.; SAHU, N.P.; KUMAR, J.A.; MUTHPPA, N.A.; VIDYA, S.; RAJAN, M.G. 2009. Dietary supplementation of L-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerlings. *Aquaculture*. 293:272-277.

TSUZUKI, M.Y.; CERQUEIRA, V.R.; TELES, A.; DONEDA, S. 2007. Tolerância à salinidade de juvenis de robalo peva, *Centropomus parallelus* criados em laboratório. *Revista Brasileira de Oceanografia*. São Paulo. SP. 55(1):1-5.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. 2004. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALLOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Eds.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. Sociedade Brasileira de Aquicultura e biologia Aquática. Editora TecArt. São Paulo.SP. 171-193.

VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. 2000. Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico, CNPq: Ministério da Ciência e Tecnologia*. Brasília, DF. 399p.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology Pharmacology*. 13:57-149.

VIDAL, T.Z.B.; FONTES, D.O.; SILVA, F.C.O.; VASCONCELLOS, C.H.F.; SILVA, M.A.; KILL, J.L.; SOUZA, L.P.O. 2010. Efeito da redução da proteína bruta e da suplementação de aminoácidos para suínos machos castrados, dos 70 aos 100k. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 62(4):914-920.

WEDEMEYER, G.A. 1996. Physiology of fish in intensive culture systems. *Chapman and Hall*. New York, USA. 232p.

WEDEMEYER, G.A.; BARTON, B.A.; MC LEAY, D.J. 1990. Stress and Acclimation. In: SCHERECK, C.B.; MOYLE, P.B. *Methods for fish biology*. (Eds.). Bethesda, Maryland, USA. 14:451-489.

WILSON, R. P. 1994. Amino acid requirements of fish. In: D'MELLO, J. P. F. (Ed). *Amino acids in farm animal nutrition*. Wallingford: CAB International.

WINBERG, S.; OVERLI, O.; LEPAGE, O. 2001. Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. *The Journal of Experimental Biology*. 204:3867-3876.

WOLKERS, C.P.B.; SERRA, M.; HOSHIBA, M.A.; URBINATI, E.C. 2012. Dietary L tryptophan alters aggression in juvenile matrinxã *Brycon amazonicus*. *Fish Physiology Biochemistry*.38: 819-827.

YOUNG, S.N.1984. Monoamine precursors in the affective disorders. In: Burrows, G.D. & Werry, J.S. (eds.). *Advances in Human Psychopharmacology*. vol 3. Greenwich, Connecticut, JAI Press, p. 251-258.

YOUNG, S.N. 1986. The clinical psychopharmacology of tryptophan. In: WURTMAN, R.J. & WURTMAN, J.J. (eds.). *Nutrition and the Brain*. New York, Raven Press. 7:49-88.