



PEDRO LEITE DE CASTRO UZEDA

**ENRIQUECIMENTO DE *Artemia salina* COM TRIPTOFANO E
SUA INFLUÊNCIA SOBRE O CANIBALISMO EM LARVAS DE
PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*)**

**LAVRAS-MG
2021**

PEDRO LEITE DE CASTRO UZEDA

**ENRIQUECIMENTO DE *Artemia salina* COM TRIPTOFANO E SUA INFLUÊNCIA
SOBRE O CANIBALISMO EM LARVAS DE PIRACANJUBA (*Brycon orbignyana*)**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Orientador

Prof. Dr. Paulo dos Santos Pompeu

Coorientador

Dr. William Franco Carneiro

Coorientador

LAVRAS-MG

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Uzeda, Pedro Leite de Castro.

Enriquecimento de *Artemiasalina* com triptofano e sua influência sobre o canibalismo em larvas de Piracanjuba (*Brycon orbignyana*) / Pedro Leite de Castro Uzeda. - 2021.

32 p. : il.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Coorientador(a): Paulo dos Santos Pompeu, William Franco Carneiro.

Monografia (graduação) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Canibalismo larval em *Brycon orbignyana*. 2. Serotonina. 3. Enriquecimento de *Artemia salina*. I. Murgas, Luis David Solis. II. Pompeu, Paulo dos Santos. III. Carneiro, William Franco. IV.

PEDRO LEITE DE CASTRO UZEDA

**ENRIQUECIMENTO DE *Artemia salina* COM TRIPTOFANO E SUA
INFLUÊNCIA SOBRE O CANNIBALISMO EM LARVAS DE PIRACANJUBA
(*Brycon orbignyanus*)**

***Artemia salina* TRYPTOPHAN ENRICHMENT AND ITS EFFECTS ON
PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*) CANNIBALISM**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 23 de março de 2021.
Dr. Luis David Solis Murgas UFLA
Dr. Paulo dos Santos Pompeu UFLA
Ma. Naiara Melo UFLA
Ma. Tássia Flávia Dias Castro UFLA

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador
Prof. Dr. Paulo dos Santos Pompeu
Coorientador
Dr. William Franco Carneiro
Coorientador

**LAVRAS-MG
2021**

AGRADECIMENTOS

À Naiara, Tássia e William pela imprescindível ajuda durante a elaboração deste trabalho;

ao CNPq, CAPES, FAPEMIG e Rede Mineira de Bioterismo pelo apoio financeiro, bolsa de iniciação científica e infraestrutura necessárias durante a elaboração do presente trabalho;

e aos membros do NEPAD e Lab ECOPeixes pela constante ajuda em minha iniciação à carreira científica, construção de conhecimento e amizade;

meus sinceros agradecimentos.

À MM e HW, por me mostrarem a luz em meio à escuridão, iluminando o caminho para a aceitação de minha vulnerabilidade;

à minha família de sangue;

aos meus irmãos João Victor, Pagani, Vinícius e Natasha;

e à minha família em Lavras: Vitor, Gabriel, Bárbara, Yuri, Gabriela, Nathália e Júlia;

meu amor incondicional. Vocês são a razão pela qual me encontro respirando, fazendo planos... vivendo. Independentemente do caminho seguido por cada um, num futuro próximo ou distante, nada muda o fato de que cada sorriso em minha boca ou porção de ar em meus pulmões, só estarão sendo vivenciados em consequência de seu amor e persistência. Sempre poderão me encontrar. Obrigado.

RESUMO

Com a constante ocupação e exploração humana sobre os ambientes naturais, além da introdução de espécies exóticas, ecossistemas têm sido cada vez mais ameaçados, causando fragmentação de habitats e perda de espécies; eventos, estes, retroalimentados. Dentre as diversas espécies ameaçadas de extinção no Brasil, está a Piracanjuba (*Brycon orbignyana*), um peixe migrador de grande importância ecológica e potencial econômico. Apesar de apresentar alta qualidade de carne, taxa reprodutiva e fácil manejo, o cativo da espécie apresenta altas taxas de mortalidade (>90%), e isso se deve ao fato de suas larvas apresentarem comportamento canibal durante a primeira semana pós-eclosão, tornando a prática economicamente inviável. No presente trabalho foi realizada a alimentação de larvas de *B. orbignyana* com suplementação de diferentes quantidades do aminoácido triptofano (T1, T2, T3 e T4), precursor do neurotransmissor serotonina, através do enriquecimento de metanúplios de *Artemia salina*, de modo a reduzir a incidência de comportamentos antagonísticos e, consequentemente, o canibalismo entre os indivíduos. Além disso, os tratamentos T2 e T4 apresentavam triptofano encapsulado com lipossomos de lecitina de soja, de modo a avaliar diferenças durante a absorção e digestão do aminoácido. Com duração de 14 dias, as larvas foram alimentadas 6 vezes ao dia e monitoradas, de forma que as ocorrências de comportamento canibal fossem registradas. Foram coletados indivíduos no 7º e 14º dias experimentais, com o objetivo de avaliar dados de crescimento, peso e atividade enzimática das enzimas lipase, fosfatase alcalina e lactato desidrogenase. O tratamento T3 se mostrou o mais eficaz na redução do comportamento ($p < 0,05$), apresentando uma incidência 4,25 vezes menor em relação ao tratamento controle, além da maior taxa de crescimento entre a primeira e segunda coletas. T3 e T4 influenciaram a atividade da lipase dos animais de modo a se manter mais baixa em relação aos outros tratamentos. Não houve diferença significativa entre a atividade enzimática da fosfatase alcalina nos tratamentos ($p > 0,05$), podendo ser um indicativo de que o comportamento canibal não é diretamente causado por *stress*, uma vez que este processo fisiológico levaria à produção de metabólitos secundários, como o ácido lático. O protocolo T3 se mostrou promissor à aplicação comercial, resultando em uma mortalidade pelo menos 8 vezes inferior ao tratamento controle, com animais potencialmente maiores.

Palavras-chave: Canibalismo. Piscicultura. Espécie ameaçada. Atividade enzimática. Morfometria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 – Bacia Hidrográfica do Rio da Prata.	2
Figura 2 – <i>Brycon orbignyana</i>	4
Figura 3 – Canibalismo larval.	5
Figura 4 – Ciclo de vida de <i>Artemia</i>	7
Figura 5 – Desenho experimental.	9
Figura 6 – Identificação visual pós-canibalismo.	10
Figura 7 – Utilização do software ImageJ.	11
Figura 8 – Extrato proteico analisado em espectrofotometria	12
Figura 9 – Análise da filtração de carvão em pó em microscopia de luz.	23

GRÁFICOS

Gráfico 1 – Incidência de canibalismo a partir do segundo dia experimental.....	13
Gráficos 2 e 3 – Pesos médios na primeira e segunda semanas.	13
Gráfico 4 – Ganho de peso entre tratamentos.	14
Gráficos 5 e 6 – Comprimento total dos peixes ao fim da primeira e segunda semanas.	14
Gráficos 7 e 8 – Atividade da lipase durante a primeira e segunda semanas.	15
Gráficos 9 e 10 – Atividade da fosfatase alcalina durante a primeira e segunda semanas.....	16
Gráficos 11 e 12 – Atividade da desidrogenase láctica na primeira e segunda semanas.....	16

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	1
2.1 Bacia do Prata.....	1
2.2 Piracanjuba.....	3
2.3 Canibalismo.....	5
2.4 Agressividade, Serotonina e Triptofano.....	6
2.5 <i>Artemia sp.</i>	6
3 OBJETIVOS	7
3.1 Objetivos específicos	7
4 MATERIAL E MÉTODOS	7
4.1 Enriquecimento.....	8
4.2 Obtenção e estocagem do plantel.....	8
4.3 Tratamentos	9
4.4 Quantificação do canibalismo.....	10
4.5 Análises morfológicas	11
4.6 Análises enzimáticas	11
4.7 Análises estatísticas	12
5. RESULTADOS	12
5.1 Canibalismo.....	12
5.2 Crescimento e morfometria	13
5.3 Atividade enzimática	15
6. DISCUSSÃO	16
7. CONCLUSÃO	19
8. REFERÊNCIAS	19
9. ANEXO I	23
10. ANEXO II	24

1. INTRODUÇÃO

A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é um peixe onívoro nativo da Bacia do Prata; alimentando-se majoritariamente de frutas e sementes, apresenta grande importante importância ecológica como dispersor de sementes e carreador de matéria orgânica para tributários de rios durante seus ciclos anuais de migração reprodutiva (LIMA et al., 2003; AGOSTINHO et al., 2003). Devido aos impactos ambientais da alta pressão antrópica sobre a região, como fragmentação de habitats por implantações de barragens, e introdução de espécies exóticas, *B. orbignyanus* encontra-se ameaçada de extinção, sob categoria “Em Perigo” (EN) no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, do ICMBio (ICMBio, 2018).

Devido a seu tamanho corporal e qualidade de carne, a espécie tem despertado interesse econômico no mercado de carne nas últimas décadas (MURGAS et al., 2003). Apesar seu fácil manejo em cativeiro, existe uma dificuldade no seu cultivo durante a primeira semana de vida, devido à presença de comportamento canibal entre suas larvas, elevando as taxas de mortalidade, as quais podem atingir 99% do plantel (MACIEL et al., 2010; SENHORINI et al., 2002), causando alto prejuízo financeiro, tornando a prática economicamente pouco viável.

Uma vez que a predação é caracterizada como um comportamento antagonístico, conforme demonstrado por Winberg e Nilsson (1993), a mesma pode ser inibida ou reduzida com o aumento da atividade serotoninérgica cerebral, principalmente através do aumento da síntese do neurotransmissor serotonina (5-HT), cujo fator limitante está na disponibilidade do aminoácido triptofano (TRP). O triptofano é, portanto, o principal precursor metabólico do metabolismo serotoninérgico, podendo ser suplementado na alimentação de vertebrados como forma de aumentar a produção de 5-HT, reduzindo os comportamentos agressivos (Leathwood, 1987).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bacia do Prata

Drenando territórios do Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai, de suas nascentes à sua foz, a Bacia Hidrográfica do Rio da Prata (FIGURA 1) constitui a segunda maior bacia hidrográfica do Brasil e da América do Sul, drenando uma área de cerca de 3 200 000 Km², o equivalente a cerca de um quinto da área total do continente (OTEIZA *et al.*, 2014). A Bacia é dividida em três sub-bacias, sendo elas a Bacia do Paraguai, Bacia do Paraná e Bacia do Uruguai, cujos nomes representam os três maiores tributários do Rio da Prata. O Rio Paraguai, após percorrer os estados brasileiros de Mato Grosso (MT) e Mato Grosso do Sul

(MS), porções da Bolívia e Paraguai, deságua no Rio Paraná, próximo à cidade de Corrientes, na Argentina; esta confluência demarca a divisão de duas porções do Rio Paraná, constituindo o Alto Paraná à montante, e Baixo Paraná (ou apenas Paraná) à jusante da mesma.

Figura 1 – Bacia Hidrográfica do Rio da Prata.



Bacia Hidrográfica do Rio da Prata e seus principais afluentes.
Ilustração por MUSSER, K.

As bacias do Alto Paraná e do Uruguai, porções brasileiras da Bacia do Prata onde é encontrada a piracanjuba, estão localizadas nas regiões de maior densidade populacional do país, havendo alta demanda por recursos naturais, perda de hábitat natural por expansão urbana e agropecuária. Além disso, a bacia do Alto Paraná apresenta grande potencial hidroelétrico, se mostrando como a bacia hidrográfica com o maior número de barragens da América do Sul, contando com mais de 400 barragens ao longo de toda a bacia em território brasileiro (ANEEL, 2018). A bacia conta com cerca de 40% de toda a produção de carne de peixe do Brasil, totalizando cerca de 320 mil toneladas apenas no ano de 2020 (PEIXE BR, 2021), sendo 60% desta produção composta pela tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*), principalmente por seu

rápido crescimento e qualidade de carne. A espécie, porém, oferece conhecidas ameaças e impactos sobre os ambientes naturais fora de sua área de ocorrência natural, com alto potencial invasivo, taxa reprodutiva e comportamento agressivo (CASSEMIRO *et al.*, 2018), tendo um constante incremento de suas populações em ambientes naturais por introdução proposital ou acidental, as últimas representadas principalmente por escapes pela produção em tanques-rede em reservatórios (AZEVEDO-SANTOS *et al.*, 2011; CHARVET *et al.*, 2021), presentes ao longo de toda a bacia hidrográfica. Os fatores citados provocam a fragmentação de populações, inviabilidade reprodutiva, alterações na dinâmica hidráulica dos corpos d'água, diminuição do influxo de matéria orgânica, introdução de espécies exóticas, dentre diversos impactos ambientais (OLIVEIRA *et al.*, 2017) que levaram *Brycon orbignyanus* à categoria “Em Perigo” (EN) por declínio de população e população em número reduzido, no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) no ano de 2013 (ICMBio, 2018).

2.2 Piracanjuba

De nome científico *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850), a piracanjuba (Ostariophysi: Bryconidae) (FIGURA 2) é um teleósteo endêmico da Bacia do Prata. O nome Piracanjuba, proveniente da língua tupi, apresenta como significado do nome “peixe de cabeça amarela”, formado através da junção das palavras “pirá” (peixe), “akanga” (cabeça) e “îuba” (amarela) (AGOSTINHO *et al.*, 2003). Apresentando alimentação de perfil onívoro, o conteúdo estomacal dos indivíduos da espécie é composto majoritariamente de frutas e sementes, seguido de insetos e pequenos peixes, o que a torna altamente dependente de ecossistemas ripários (GODOY, 1975). Inversões entre as proporções destes alimentos em conteúdo estomacal podem indicar escassez no influxo de matéria orgânica vegetal alóctone nos corpos d'água (AGOSTINHO *et al.*, 1997).

Figura 2 – *Brycon orbignyanus*.



Imagem por TIMM, C.D.

Disponível em: <<https://www.fishbase.se/summary/48557>>.

B. orbignyanus é uma espécie de comportamento migratório, se deslocando, durante o período de cheia, das calhas dos rios de maior ordem em direção a seus tributários, onde ocorrem as desovas, caracterizando-a como uma espécie reofílica (LIMA *et al.*, 2003).

A reprodução da espécie ocorre apenas uma vez ao ano, caracterizada como desova total e periódica (VAZZOLER e MENEZES, 1992). De acordo com Agostinho *et al.* (2003), durante o período reprodutivo, fêmeas podem ter acima de 20% de seu peso corporal composto por ovários, apresentando mais de 850 000 ovócitos por indivíduo, com taxa de fecundidade média de 230 000 ovócitos a cadaquilograma de fêmea (ZANIBONI FILHO *et al.*, 2004). Os fatos citados reforçam o importante papel da espécie como dispersora de sementes e carreadora de matéria orgânica para tributários em ciclos anuais.

Podendo ultrapassar 50 cm de comprimento e 4 kg (AGOSTINHO *et al.*, 2005), aliados a uma carne de alta qualidade, crescimento rápido, baixa manutenção e aceitação a dietas formuladas (MURGAS *et al.*, 2003), além de sua importância no turismo de pesca, devido a seu comportamento agressivo (AGOSTINHO *et al.*, 2003), a piracanjuba tem despertado interesse comercial entre piscicultores nas últimas décadas. Porém, a maior barreira encontrada na criação da espécie em cativeiros ocorre entre aproximadamente 26 a 72 horas pós-eclosão (MACIEL *et al.*, 2010; SENHORINI *et al.*, 2002). Neste período, as larvas apresentam comportamento canibal (FIGURA 3), podendo causar até 99% de perda em relação ao número inicial de larvas eclodidas (SENHORINI *et al.*, 2002). A grande mortalidade durante

o estágio larval causada pelo canibalismo em *B. orbignyanus* representa um grande empecilho para criações em cativeiro, sejam voltadas ao mercado de carne ou a programas de reintrodução ou “peixamento”, estes realizados principalmente por companhias de geração de energia hidrelétrica (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Figura 3 – Canibalismo larval.



Canibalismo entre larvas de *B. orbignyanus*, envolvendo três larvas subsequentes. A interação causou a morte de todos os indivíduos na imagem.

Fonte: Do autor (2020)

2.3 Canibalismo

O canibalismo, comportamento presente em diversos grupos animais, é uma relação intraespecífica desarmônica, caracterizada como predação intraespecífica, em que pais, irmãos ou não-correlatos se alimentam de indivíduos de uma mesma espécie (FOX, 1975). Em peixes teleósteos, o comportamento canibal é conhecido em mais de 35 famílias, incluindo diversas espécies de interesse econômico, causando grande prejuízo financeiro (SMITH e REAY, 1991). Diante deste problema, diversos métodos de prevenção ou redução do canibalismo em peixes em cativeiro foram propostos, principalmente alterações ambientais, como a influência do fotoperíodo, densidade de estocagem e presença de abrigos (HECHT e PIENAAR, 1993). Devido à natureza, muitas vezes agressiva, deste tipo de interação, foram propostos métodos endógenos/fisiológicos de prevenção da interação canibal, atuando diretamente no comportamento agressivo dos animais estudados, como através da manipulação de dietas formuladas (HSEU *et al.*, 2003).

2.4 Agressividade, Serotonina e Triptofano

Conforme demonstrado por Winberg e Nilsson (1993), o comportamento agressivo (antagonista) em vertebrados é inibido com o aumento da atividade serotoninérgica cerebral, com destaque para a serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT). Experimentos realizados por Munro (1986) e Maler e Ellis (1987) apontam que a administração de 5-HT por injeção intracerebral em peixes inibiu o comportamento agressivo das espécies submetidas ao teste. Leathwood (1987) demonstrou que o fator limitante na síntese de 5-HT está na reação de hidroxilação do aminoácido triptofano (TRP), sendo este, portanto, o principal precursor do sistema serotoninérgico, podendo ser inserido em dietas com a finalidade de inibir comportamentos antagonísticos através do aumento da síntese de 5-HT.

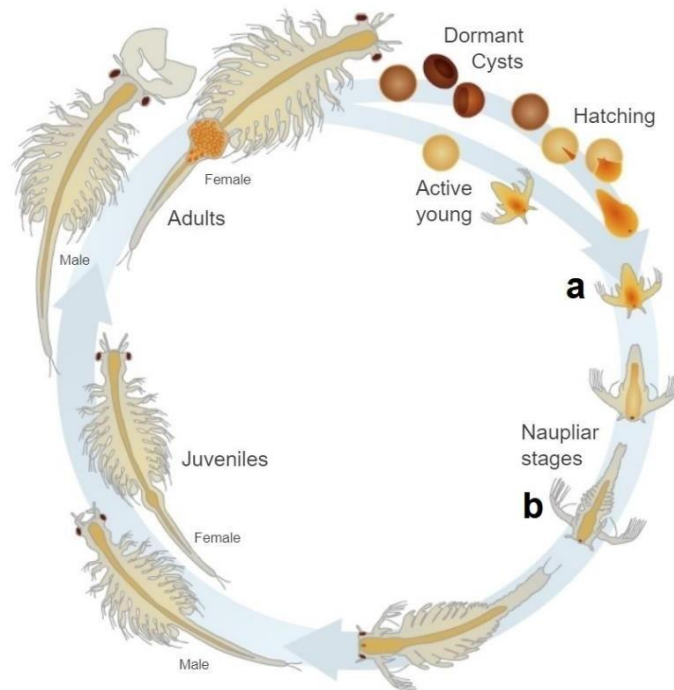
O triptofano é um dos aminoácidos essenciais ao metabolismo de animais, exercendo diversas funções fisiológicas, modulando os sistemas imune e antioxidante, a resposta ao stress e comportamento (CIJI *et al.*, 2015; HÖGLUND *et al.*, 2005; TEJPAL *et al.*, 2009). Apesar de sua importância fisiológica, este aminoácido não é produzido pelo metabolismo animal, devendo ser adquirido via alimentação exógena (WILSON, 2002). Estudos apontam que peixes alimentados com dietas suplementadas com TRP apresentam maior taxa de crescimento (CIJI *et al.*, 2015; TEJPAL *et al.*, 2009). A inserção deste aminoácido na dieta de peixes apresenta eficácia na redução de interações antagonísticas, reduzindo a mortalidade por predação no plantel (HSEU *et al.*, 2003; HÖGLUND *et al.*, 2005; PREM KUMAR *et al.*, 2017).

2.5 *Artemia sp.*

As “artêmias” (FIGURA 4) em escrita popular, são crustáceos representantes da ordem Anostraca. Devido a seus movimentos altamente chamativos a peixes durante a natação, juntamente a um alto teor de proteína e vitaminas, estes animais tornaram-se a principal fonte de alimento vivo na aquicultura ao redor do mundo, sendo alimento exclusivo de alevinos de diversas espécies de peixes marinhos (BENGTSON, 1991).

O primeiro instar da espécie, assim como o de crustáceos em geral, é chamado de náuplio, amplamente utilizado na alimentação de alevinos pela presença de um saco vitelínico ainda com reservas, que se esgotam em cerca de 8 a 10 horas pós-eclosão (BENGTSON, 1991). A seguinte fase de desenvolvimento ao náuplio, chamada de metanáuplio, possui aplicação de interesse no campo da pesquisa devido ao fato de se alimentar por comportamento filtrador, podendo ser inserido em meios com substâncias de interesse, atuando posteriormente como carreadores destas substâncias, ao serem ingeridos, a organismos de interesse; um processo conhecido como enriquecimento (BENGTSON, 1991).

Figura 4 – Ciclo de vida de *Artemia*.



Estágios de náuplio (a) e metanúplio (b).

Ilustração por Genetic Science Learning Center, University of Utah.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo realizar a suplementação de triptofano a larvas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) através do enriquecimento de metanúplios de artêmia.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar o canibalismo de larvas de piracanjuba alimentadas com metanúplios de artêmia enriquecidas com soluções de triptofano (25 e 125 mg ml⁻¹), com ou sem presença de lecitina de soja;
- Avaliar os possíveis efeitos dos tratamentos sobre o crescimento, relações morfométricas, ganho de peso e comprimento das larvas;
- Avaliar a atividade das enzimas lipase, fosfatase alcalina e desidrogenase láctica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram realizados em estrita conformidade com as normas institucionais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil, sob o nº 029/2017, e atende às diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação.

4.1 Enriquecimento

Anteriormente ao experimento, foram realizados ensaios para a determinação do tempo de enriquecimento dos metanúplios de artêmia em solução; definido como 30 minutos antes de cada alimentação, garantindo uma maior quantidade possível de TRP não metabolizado a ser carregado aos peixes (ANEXO I).

Um segundo ensaio foi realizado com o objetivo de definir o método de encapsulação das partículas de triptofano com lipossomos de lecitina. As proporções encontradas foram de 8 mg de lecitina para cada miligrama de triptofano (ANEXO II).

De forma a obter náuplios eclodidos em 24 horas, cistos de artêmia comercial eram diariamente desencapsulados, tendo suas cascas dissolvidas em solução de NaClO para facilitar o processo de eclosão, e em seguida encubados, conforme protocolo definido por Agh & Sorgeloos (2005). Através de diluições seriadas, a taxa de eclosão e concentração das artêmias eram diariamente calculadas, de modo a serem oferecidas igualmente entre as repetições.

O processo de enriquecimento iniciava-se 30 minutos antes de cada alimentação, conforme definido pelo Ensaio 1 (Anexo I), com 100 ml de solução para cada tratamento (com exceção do tratamento controle), com concentração de 500 artêmias ml⁻¹. Após este período, as artêmias de cada solução eram lavadas em água corrente com utilização de rede de zooplâncton e devolvidas a 100 ml de água pura, e então distribuídas às repetições de seus respectivos tratamentos.

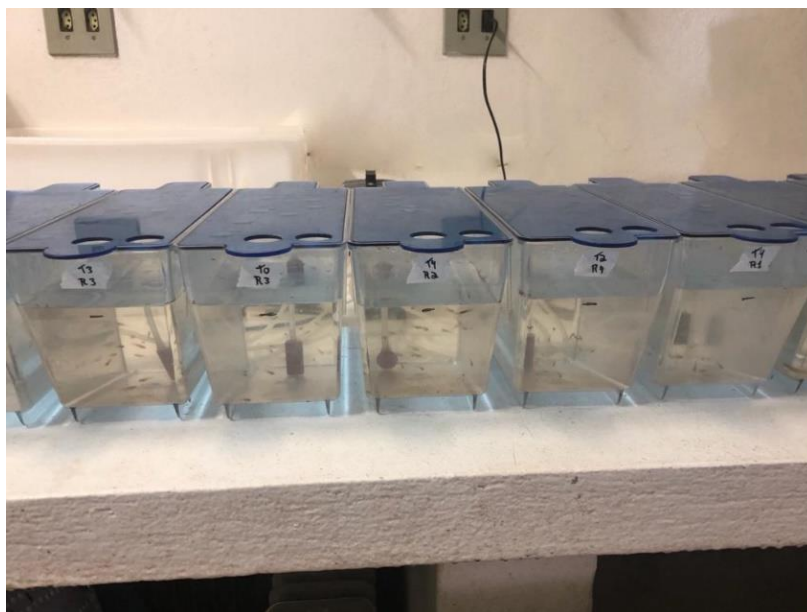
4.2 Obtenção e estocagem do plantel

Foram obtidas 1500 larvas de piracanjuba (*B. orbignyana*) da estação ambiental da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) localizada em Itutinga - MG, através da reprodução induzida de matrizes de piracanjuba, segundo metodologia descrita por Woynarovich e Horvath (1980). A eclosão das larvas ocorreu entre 18 e 19 horas pós-fertilização (hpf), momento em que foram coletadas e transportadas ao Biotério Multiusuário da UFLA - Universidade Federal de Lavras, onde os animais foram mantidos e conduzidos os ensaios.

Os animais foram aclimatados em baldes com aeração por 5 horas a 27°C, e após isso, distribuídos entre 20 aquários (FIGURA 5), cada um com capacidade de 2 litros, abrigando 60 larvas. A densidade de estocagem inicial de 30 larvas/l foi adaptada de Saccol-Pereira e Nuñez (2003), de modo que a densidade se mantivesse elevada após a constante mortalidade ao longo do período experimental. Os aquários representaram 5 tratamentos com 4 replicatas cada, os quais foram mantidos com aeração mecânica em sala com controle de temperatura e

fotoperíodo, mantendo a água em $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, pH $7 \pm 0,5$ e fotoperíodo de 12h/12h.

Figura 5 – Desenho experimental.



Aquários com controle de temperatura ambiente e oxigenação.
Fonte: Do autor (2020).

4.3 Tratamentos

Os protocolos desenvolvidos no presente trabalho foram adaptados a partir das metodologias e resultados de Wolkers (2011) e Tonheim (2000). Os tratamentos do experimento foram definidos como:

- T0; caracterizado pela alimentação com artêmia não enriquecida.
- T1; caracterizado pela alimentação com artêmia enriquecida em solução de 25 mg ml^{-1} TRP.
- T2; caracterizado pela alimentação com artêmia enriquecida em solução de 25 mg ml^{-1} TRP encapsulado com 0,2 g de lecitina de soja.
- T3; caracterizado pela alimentação com artêmia enriquecida em solução de 125 mg ml^{-1} TRP.
- T4; caracterizado pela alimentação com artêmia enriquecida em solução de 125 mg ml^{-1} TRP encapsulados com 1 g de lecitina de soja.

Os peixes foram alimentados seis vezes ao dia (8, 10, 12, 14, 16 e 18h). Para que fosse garantida a alimentação *ad libitum*, foi estabelecida a concentração de $500 \text{ artêmias ml}^{-1}$, sendo oferecidas a cada repetição (aquário) em 25 ml de água em cada alimentação. Diariamente, após a última alimentação, os aquários eram limpos, com renovação de 20% de água, para retirada de eventuais peixes mortos, sobras de alimento e fezes. O experimento teve duração de 14 dias.

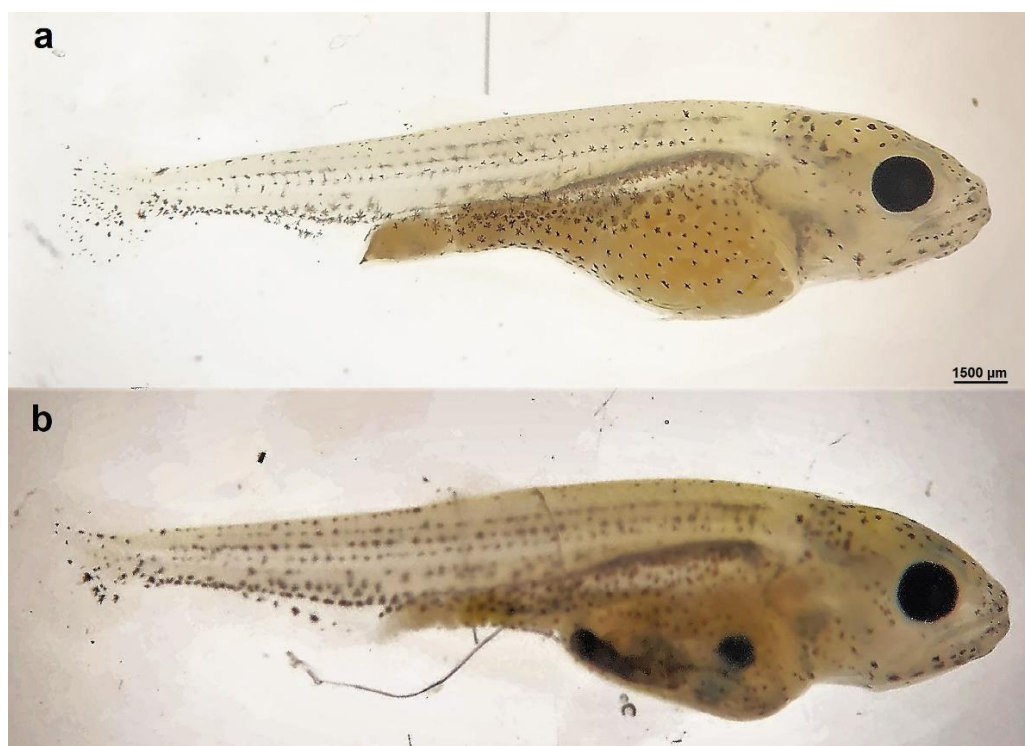
4.4 Quantificação do canibalismo

Diariamente, entre a primeira e última alimentação, os aquários eram verificados a cada 30 minutos, com observação de 30 segundos por aquário, como modo de monitoramento visual e registro do comportamento canibal. Em caso de ocorrência durante a observação, os indivíduos envolvidos eram imediatamente coletados e eutanasiados em solução de eugenol 300 mg l⁻¹ (Vidal *et al.*, 2008), e armazenados em formalina 10%, para posterior análise de relações morfométricas entre canibais e suas respectivas presas.

Interações canibais ocorridas fora dos períodos de monitoramento visual eram identificadas através da coloração do abdômen semitransparente dos animais, que se apresentavam alaranjados devido à alimentação com artêmia, e negros quando alimentados de outros indivíduos de *B. orbignyanus* (FIGURA 6). Estes casos eram quantificados, porém, os indivíduos predadores eram mantidos nos aquários.

Os animais de cada aquário eram contabilizados diariamente após a última alimentação do dia e anteriormente à primeira; caso houvesse indivíduos a menos no início do dia, foi considerada a ocorrência de canibalismo durante o período noturno, em que não há observação, e os indivíduos predados haviam sido completamente digeridos. Estas situações também foram contabilizadas como ocorrência entre observações.

Figura 6 – Identificação visual pós-canibalismo.



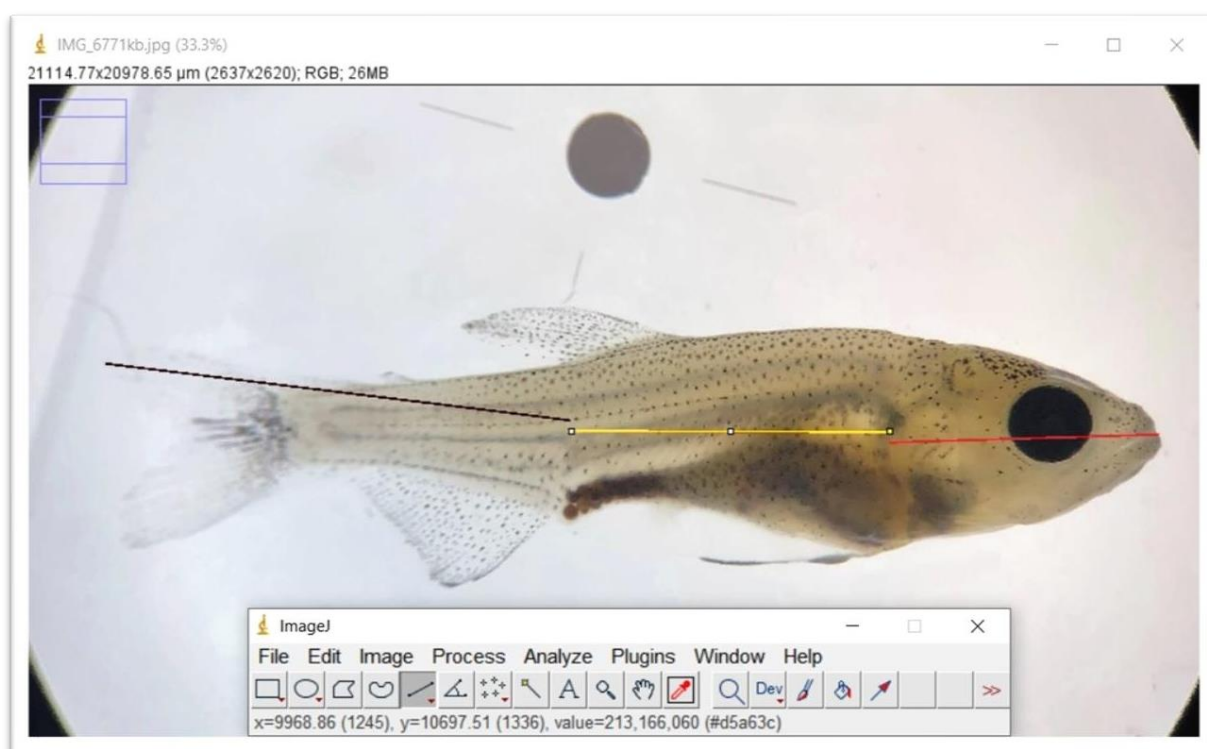
Indivíduo com apenas artêmias no trato gastrointestinal (a) e indivíduo canibal (b).

Fonte: Do autor (2020)

4.5 Análises morfológicas

Para as análises morfológicas, foram coletados indivíduos no 7º e 14º dias experimentais. Em ambas as coletas, foram registrados o comprimento total e peso dos indivíduos. Na primeira coleta, foram selecionados 4 indivíduos por repetição, utilizados também para análises enzimáticas. Na segunda, foram selecionados 10 indivíduos por repetição, os quais foram pesados e eutanasiados em solução de eugenol 300 mg L⁻¹ e armazenados em formalina 10%. O comprimento total, comprimento da cabeça, comprimento do tronco e comprimento pós-anal (cauda) foram medidos com a utilização do software ImageJ (FIGURA 7) (Nogueira *et al.*, 2012).

Figura 7 – Utilização do software ImageJ.



Após calibração, software converte a distância selecionada em pixels para micrômetros (µm).

Fonte: Do autor (2020)

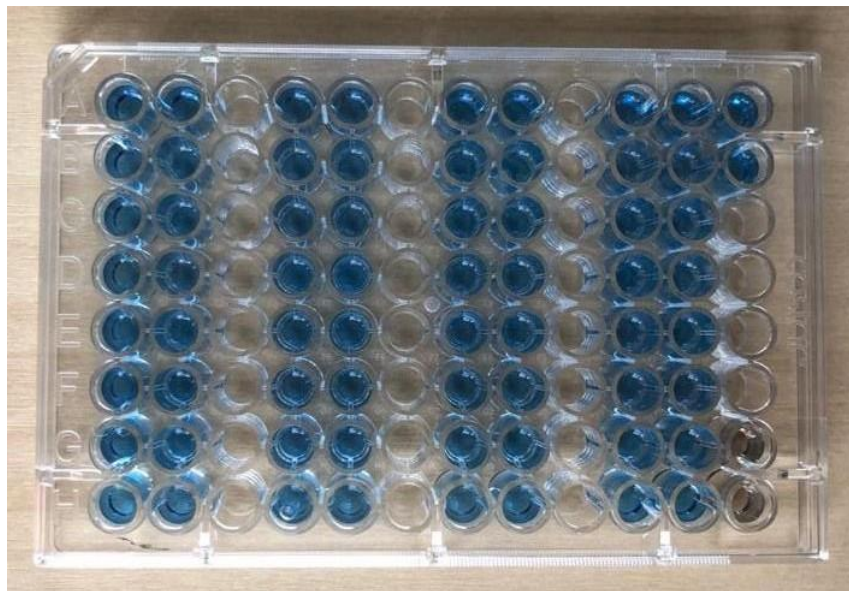
4.6 Análises enzimáticas

Foram realizadas duas coletas de indivíduos; no 7º e 14º dias experimentais, com 4 e 3 indivíduos por repetição respectivamente. Os animais coletados foram eutanasiados em solução de eugenol 300 mg L⁻¹, medidos (comprimento total), pesados e imediatamente armazenados em criotubos, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C. Os animais coletados foram inteiramente macerados e tamponados em solução tampão fosfato-salino

(PBS). Os extratos foram centrifugados a 4°C e 15000 rpm por 30 minutos, e os sobrenadantes coletados e armazenados em freezer -80°C até análises posteriores. Foram avaliadas as atividades enzimáticas das enzimas lipase, fosfatase alcalina e desidrogenase láctica (LDH). As concentrações de proteína foram determinadas em duplicata pela metodologia de Bradford, com utilização de albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976).

As análises enzimáticas foram realizadas em triplicata, com a utilização de kits comerciais Bioclin, e os protocolos foram seguidos de acordo com as recomendações do fabricante. Após a preparação (FIGURA 8), foi realizada a leitura dos extratos em espectrofotometria.

Figura 8 – Extrato proteico analisado em espectrofotometria.



Fonte: Do autor (2020).

4.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguidos de teste ANOVA caso se adequassem à distribuição paramétrica, As análises estatísticas foram realizadas no software Minitab 19.

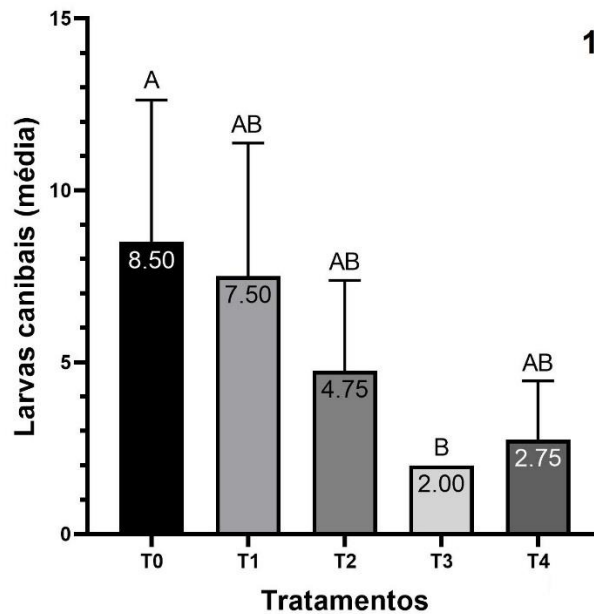
5. RESULTADOS

5.1 Canibalismo

Quando comparados a partir do segundo dia experimental, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, com T0 apresentando uma incidência de canibalismo 4,25

vezes maior que T3, a menor média dentre os mesmos (GRÁFICO 1).

Gráfico 1 – Incidência de canibalismo a partir do segundo dia experimental.



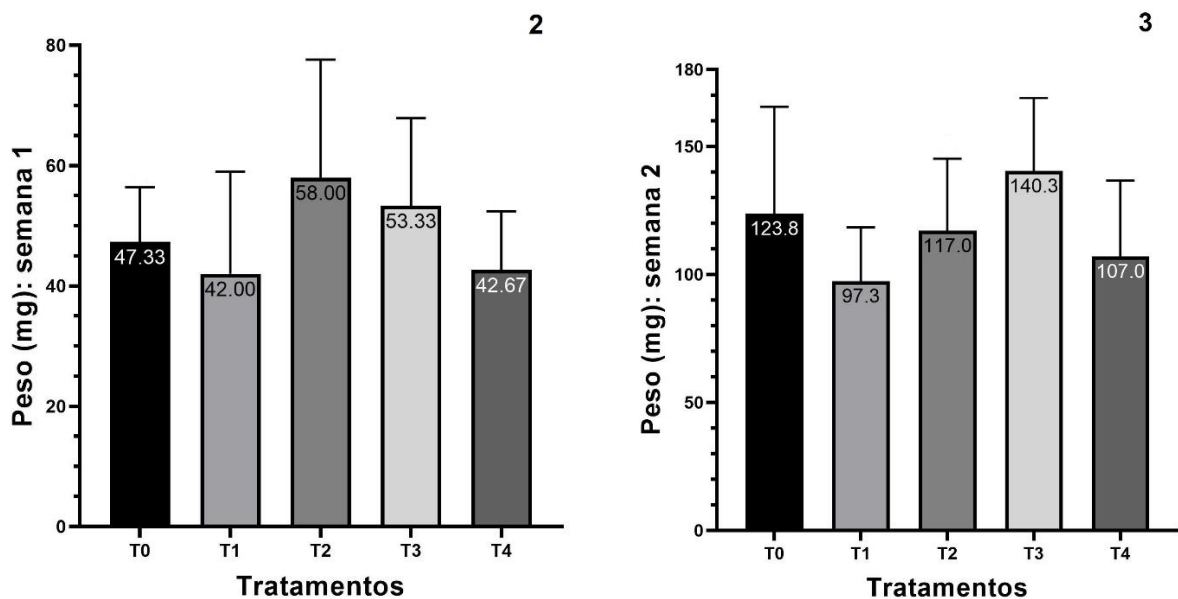
Médias de animais canibais em cada tratamento. Letras diferentes sobre as barras representam médias diferentes sob Teste de Tukey.

Fonte: Do autor (2020).

5.2 Crescimento e morfometria

Não houve diferenças significativas entre os pesos médios dos tratamentos na primeira ou segunda semanas (GRÁFICOS 2 e 3).

Gráficos 2 e 3 – Pesos médios na primeira e segunda semanas.

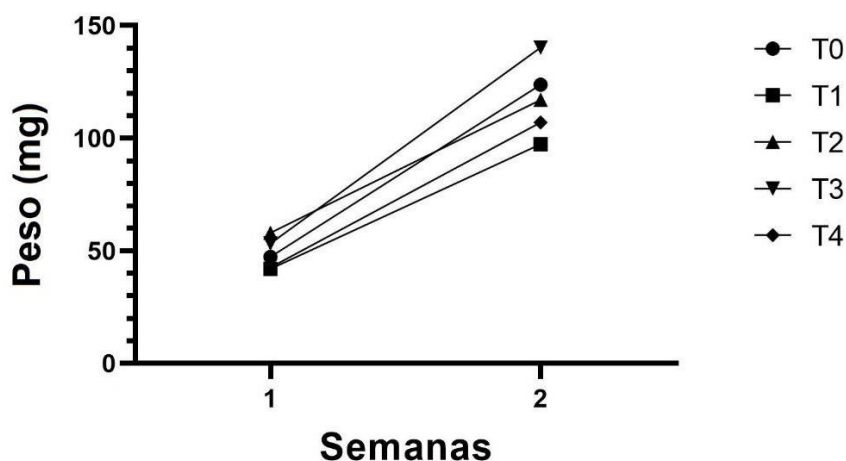


Letras diferentes sobre as barras representam médias diferentes sob Teste de Tukey.

Fonte: Do autor (2020).

Apesar da diferença entre grupos não ser estatisticamente significativa entre as mesmas semanas, animais alimentados com a dieta T3 apresentaram maior taxa de ganho de peso durante todo o período experimental (GRÁFICO 4).

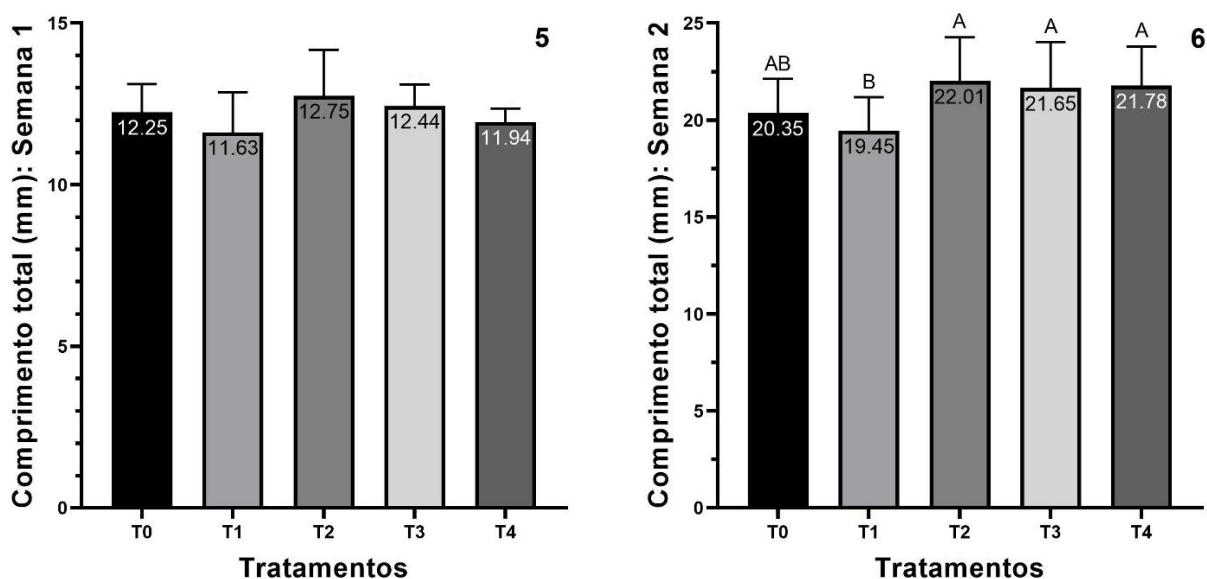
Gráfico 4 – Ganho de peso entre tratamentos.



Fonte: Do autor (2020).

Em relação ao comprimento total dos animais, não foram encontradas diferenças significativas entre tratamentos durante a primeira semana experimental (GRÁFICO 5). Porém, ao fim da segunda semana, os peixes dos tratamentos T2, T3 e T4 apresentaram maior comprimento total, quando comparados aos peixes de T1 (GRÁFICO 6).

Gráficos 5 e 6 – Comprimento total dos peixes ao fim da primeira e segunda semanas.



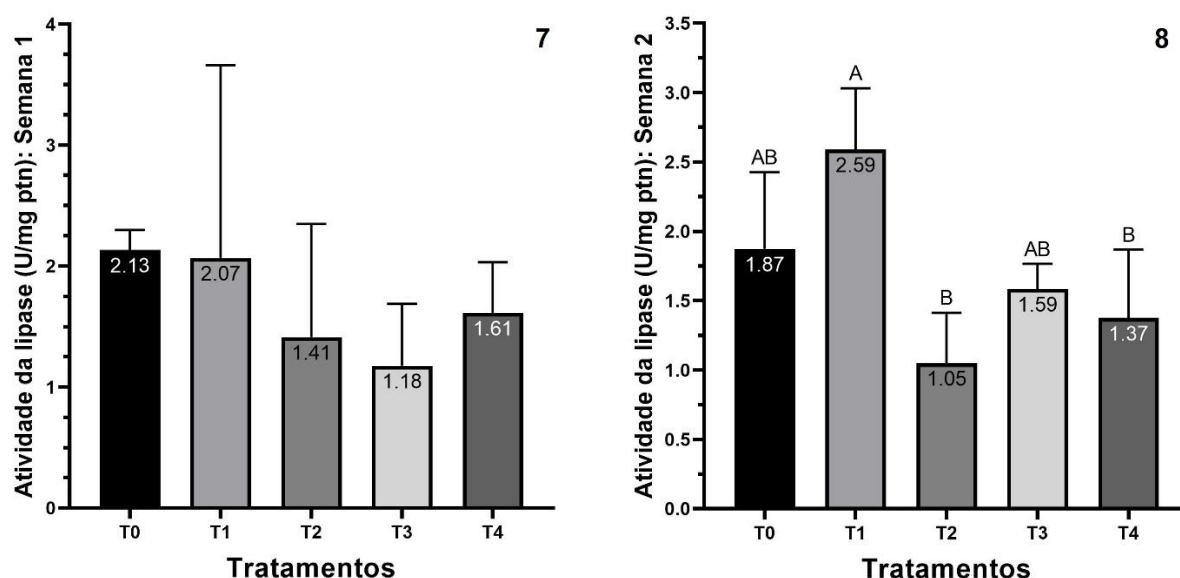
Letras diferentes sobre as barras representam médias diferentes sob Teste de Tukey.

Fonte: Do autor (2020).

5.3 Atividade enzimática

Não foram observadas diferenças significativas na atividade da lipase durante a primeira semana de desenvolvimento larval (GRÁFICO 7). Todavia, diferenças significativas na atividade da lipase foram observadas ao final da segunda semana experimental ($p < 0,01$); peixes do T1 apresentaram as maiores atividade de lipase quando comparado aos peixes do T4 e T2 (GRÁFICO 8).

Gráficos 7 e 8 – Atividade da lipase durante a primeira e segunda semanas.

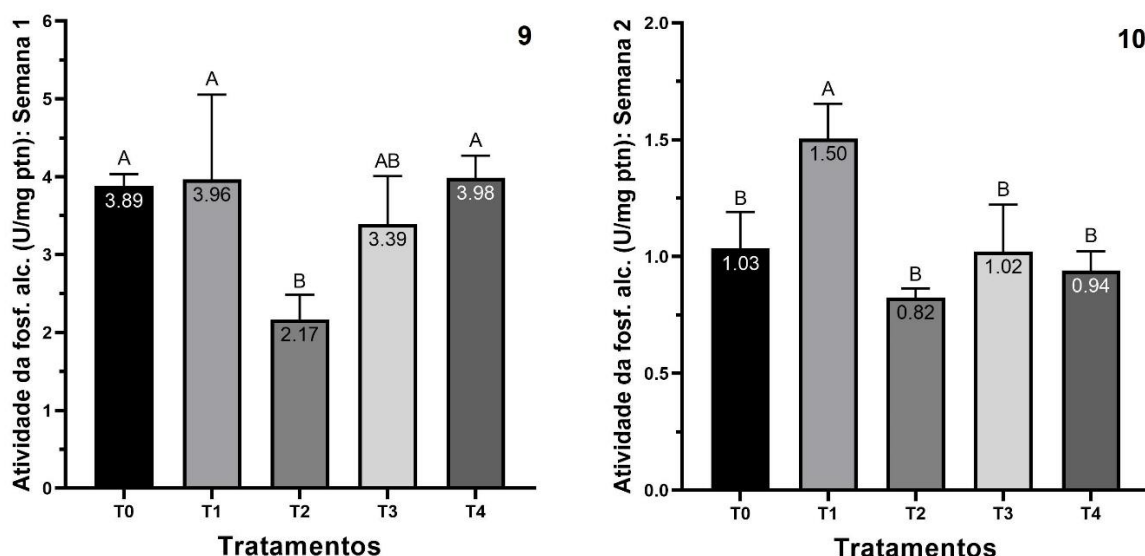


Letras diferentes sobre as barras representam médias diferentes sob Teste de Tukey.

Fonte: Do autor (2020).

Em relação à atividade da fosfatase alcalina durante a primeira semana sob as diferentes dietas, os tratamentos T1 e T4 apresentaram atividade estatisticamente semelhante ao tratamento controle, sendo maior que T2 ($p < 0,05$) (GRÁFICO 9). Na segunda semana (GRÁFICO 10), foi detectada uma atividade, em média, 3 vezes menor em relação à primeira, com apenas T1 sendo maior que os demais ($p < 0,05$), apresentando média de 1,50 U/mg ptn, cerca de 50% maior em relação à segunda maior média (T0).

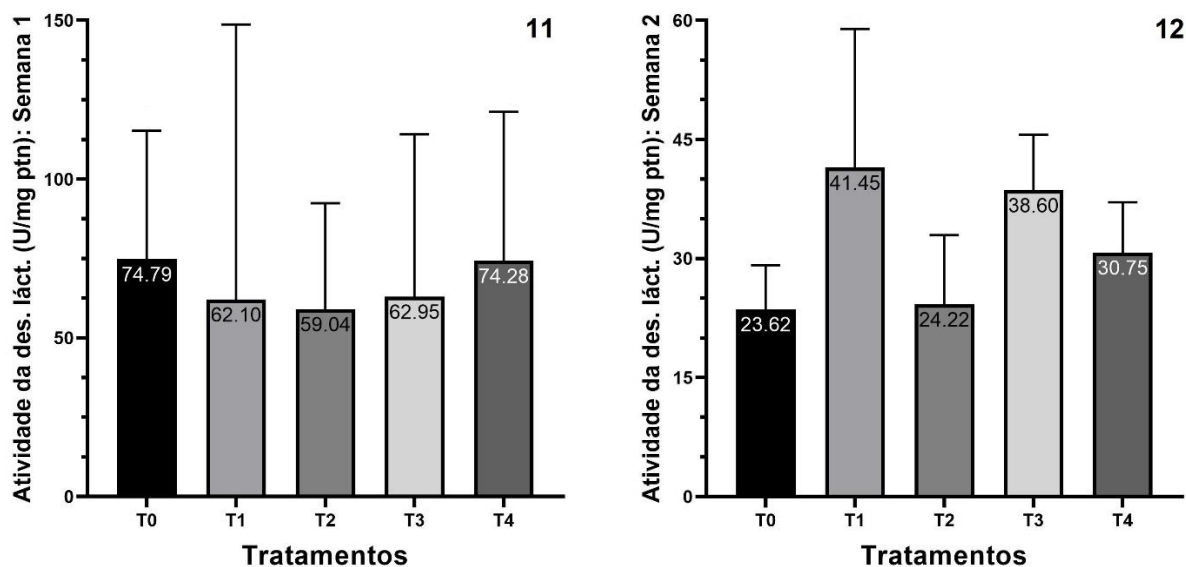
Gráficos 9 e 10 – Atividade da fosfatase alcalina durante a primeira e segunda semanas.



Letras diferentes sobre as barras representam médias diferentes sob Teste de Tukey.
Fonte: Do autor (2020).

A atividade da desidrogenase láctica não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$) nas semanas avaliadas. (GRÁFICOS 11 e 12).

Gráficos 11 e 12 – Atividade da desidrogenase láctica na primeira e segunda semanas.



Letras diferentes sobre as barras representam médias diferentes sob Teste de Tukey.
Fonte: Do autor (2020).

6. DISCUSSÃO

A avaliação da incidência de canibalismo apenas a partir do segundo dia experimental pode ser explicada pelas discussões de Leathwood (1987), em que experimentos realizados

pelo autor com ratos, alimentados após 18 horas em jejum, indicaram que alimentos ricos em carboidratos aumentam a produção de 5-HT cerebral, enquanto aqueles ricos em proteína poderiam apresentar efeito contrário. Entretanto, ratos alimentados *ad libitum* não apresentaram tais diferenças (LEATHWOOD, 1987). Devido ao alto teor proteico da alimentação com metanúplios de artêmia, oferecida como a primeira alimentação exógena das larvas, seriam necessárias ao menos 12 horas para que a suplementação com TRP, aliada à alimentação *ad libitum*, exercesse influência positiva sobre o metabolismo serotoninérgico, diminuindo, assim, o comportamento antagonístico.

Os dados morfológicos obtidos no presente trabalho apontam para o fato de o canibalismo não ser um fator determinante em um maior desenvolvimento dos indivíduos, uma vez que os tratamentos T3 e T4 apresentaram simultaneamente menor incidência de animais canibais e maior comprimento total final, além de pesos estatisticamente indiferentes ao tratamento controle.

A influência da concentração de aminoácidos na dieta sobre o crescimento de peixes segue uma função quadrática gaussiana (COLOSSO *et al.*, 1992; SANTIAGO E LOVELL, 1988), com concentrações abaixo ou acima das exigidas por cada espécie influenciando negativamente o crescimento dos animais devido a desequilíbrios nutricionais. Uma vez que as exigências de triptofano de *B. orbignyana* não se encontram na literatura científica, pode-se inferir que T3 e T4 apresentam concentrações de TRP mais próximas às exigências da espécie em relação a T1 e T2.

As diferenças significativas encontradas entre as atividades da lipase podem ser explicadas por uma provável ação da lecitina como facilitador de carreamento de nutrientes para o interior das células intestinais dos animais no momento da digestão, através da formação de micelas, exigindo menor atividade metabólica da enzima lipase (LIU *et al.*, 2020; LASIC, 1998). Dos diferentes aspectos analisados, T3 e T4 só diferiram significativamente entre si em relação à atividade desta enzima, durante a segunda semana.

Durante a primeira semana, os tratamentos T0, T1 e T4 apresentaram a maior atividade da enzima fosfatase alcalina dentre os grupos. Na segunda semana, porém, foi detectada uma atividade, em média, 3 vezes menor em relação à primeira, com tendência de estabilização entre os grupos, com apenas T1 mostrando atividade maior aos demais. Uma vez que os grupos encontrados na primeira semana não apresentam ligação direta entre si, como a presença ou ausência de lecitina, ou concentração de triptofano aplicado, os resultados encontrados podem ter sido causados por efeitos de interações metabólicas, não havendo testes realizados durante

o presente trabalho ou respaldo na literatura científica que os elucidem diretamente, sendo necessárias análises mais profundas para melhor investigação dos resultados.

Conforme demonstrado por Schreck (2016), um dos produtos secundários do *stress* crônico se dá no aumento do ácido lático corporal, sendo possível identificar este desequilíbrio fisiológico através do aumento da atividade da enzima desidrogenase lática, a fim de realizar o catabolismo deste produto secundário. Uma vez que os tratamentos apresentaram taxas diferentes de canibalismo, mas estatisticamente a mesma atividade da enzima citada, pode-se inferir que este comportamento não está diretamente ligado ao *stress* gerado por fatores do cativeiro, mas sim de um comportamento natural independente dos mesmos; resultados semelhantes foram observados por Wolkers et al. (2011) em matrinxã (*Brycon amazonicus*). Uma vez não provocado por *stress*, o canibalismo *per se* não influenciou a produção do metabólito secundário ácido lático.

Os protocolos definidos em T3 e T4 se mostraram mais os eficientes na redução do canibalismo e taxa de crescimento dos animais, com a maior taxa presente em T3, apresentando grande vantagem comercial em relação ao tratamento controle.

Com as alarmantes crises ambientais, fortemente ligadas à perda de espécies, o desenvolvimento sustentável e proteção do meio ambiente têm sido tópicos de alta prioridade em decisões políticas entre as maiores economias do mundo. Visto isso, a criação da piracanjuba em cativeiro com aplicação do protocolo alimentar T3 apresenta forte potencial de balanço socioeconômico-ambiental, representando baixo custo e mão-de-obra ao produtor, resultando em um plantel pelo menos oito vezes maior em relação ao padrão obtido atualmente, e indivíduos potencialmente maiores. Aliado a isso, como alternativa à piscicultura da tilápia-do-nilo na Bacia do Prata, devido às características eco e fisiológicas de *B. orbignyana*, sua criação em tanques-rede apresentariam impactos ambientais potencialmente inferiores em relação à primeira, uma vez que eventuais escapes da espécie ameaçada resultariam na liberação de indivíduos nativos ao sistema, ocupando funções e nichos ecológicos já estabelecidos, além de oferecerem baixo risco de provocarem superpopulação, uma vez que, conforme citado, necessitam de ambientes lóticos para o devido desenvolvimento gonadal. Além disso, com a produção desenvolvida em cada região e sub-bacia, há um potencial aumento de estoques de germoplasma e programas de repovoamento.

7. CONCLUSÃO

Do ponto de vista prático comercial, seria recomendada a utilização de T3 (125 mg ml⁻¹ TRP); mais simples, menos custoso financeiramente e igualmente eficiente na redução da mortalidade e incrementado crescimento, se apresentando altamente promissor para a prática comercial.

8. REFERÊNCIAS

AGH, N., SORGELOOS, P. **Handbook of Protocols and Guidelines for Culture and Enrichment of Live Food for Use in Larviculture**. Artemia & Aquatic Animals Research Center, Urmia University, Iran, 1^a Ed, 60 p., 2005.

AGOSTINHO, A.A., GOMES, L.C., SUZUKI, H.I., JÚLIO JÚNIOR, H.F. **Migratory fish from the upper Paraná river basin, Brazil**. In: CAROLSFELD, J., HARVEY, B., ROSS, C., BAER, A. **Migratory Fishes of South America: Biology, social Importance and Conservation Status**. World Fisheries Trust, The World Bank and the International Development Research Centre, Victoria, Canadá, p.19-99, 2003.

AGOSTINHO, A.A., HAHN, N.S., GOMES, L.C., BINI, L.M. Estrutura trófica. In: VAZZOLER, A.E.A.M., AGOSTINHO, A.A., HAHN, N.S. **A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá, Editora da Universidade Estadual de Maringá, p.229-248, 1997.

AGOSTINHO, A.A., ZANIBONI FILHO, E., LIMA, F.C.T. Os Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção. In: INATITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília, v. 1, p. 54-56, 2005.

ANEEL. AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA. **Relatório de Resultados sobre Classificação de Barragens - Ciclo 2018**. Disponível em: http://www.aneel.gov.br/seguranca-de-barragens-informacoes/-/asset_publisher/rtVzRmuMmPFC/content/classificacao-das-barragens/655816?inheritRedirect=false. Acesso em 10 de dezembro de 2020.

AZEVEDO-SANTOS, V.M., RIGOLIN-SÁ, O., PELICICE, F.M. **Growing, losing or introducing? Cage aquaculture as a vector for the introduction of non-native fish in Furnas Reservoir, Minas Gerais, Brazil**. Neotropical Ichthyology, 9(4), p. 915-919, 2011.

BENGTSON, D.A., LÉGER, P., SORGELOOS, P. **Use of Artemia as a food source for aquaculture**. Artemia Biology 29, 1991.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical Biochemistry, v. 72, Issues 1-2, p. 248-254, 1976.

CASSEMIRO, F.A.S., BAILLY, D., DA GRAÇA, W.J., AGOSTINHO, A.A. **The invasive potential of tilapias (Osteichthyes, Cichlidae) in the Americas**. Hydrobiologia 817, p. 133-154, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3471-1>.

- CHARVET, P., OCCHI, T., FARIA, L., CARVALHO, B., PEDROSO, C., CARNEIRO, L., FREITAS, M., PETRERE, M., VITULE, J. **Tilapia farming threatens Brazil's waters.** *Science*, 371, p. 356-356, 2021. 10.1126/science.abg1346.
- CIJI, A., SAHU, N.P., PAL, A.K., AKHTAR, M.S. **Dietary L-tryptophan modulates growth and immuno-metabolic status of *Labeo rohita* juveniles exposed to nitrite.** *Aquaculture Research* 46: p. 2013–2024, 2015.
- COLOSO, R.M., TIRO, L.B., BENITEZ, L.V. **Requirement for tryptophan by milkfish (*Chanos chanos* Forsskal) juveniles.** *Fish Physiol. Biochem.* 10, p. 35– 41, 1992.
- FOX, L.R. **CANNIBALISM IN NATURAL POPULATIONS.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.* p. 87-106, 1975.
- GODOY, M.P.** Peixes do Brasil, subordem Characoidei. Bacia do rio Mogi Guassu. Piracicaba, Brasil. Editora Franciscana, 4 vols, 1975.
- HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. **Induced breeding in tropical fish culture.** 1. ed. Ontario, Canada: International Development Research Centre, p. 87-88, 1993.
- HECHT, T., PIENAAR, A.G. **A review of cannibalism and its implications in fish larviculture.** *J. World Aquac. Soc.* 24, p. 246– 261, 1993.
- HÖGLUND, E., BAKKE, M.J., ØVERLI, Ø., WINBERG, S., NILSSON, G.E. **Suppression of aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by l-tryptophan supplementation.** *Aquaculture*, v. 249, (1–4), p. 525-531, 2005.
- HSEU, J.R., LU, F.I., SU, H.M., WANG, L.S., TSAI, C.L., HWANG, P.P. **Effect of exogenous tryptophan on cannibalism, survival and growth in juvenile grouper, *Epinephelus coioides*.** *Aquaculture*, v. 218, p. 251-263, 2003.
- INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção – 2018.** Brasília, v. 1, 495 p., 2018.
- LASIC, D.D. **Novel applications of liposomes.** *Trends Biotechnol.*, 16(7), p. 307-321, 1998. doi: 10.1016/s0167-7799(98)01220-7. PMID: 9675915.
- LEATHWOOD, P.D. **Tryptophan availability and serotonin synthesis.** *Proc. Nutr. Soc.* 46, p. 143–156, 1987.
- LIMA, F.C.T. Subfamily Bryconinae. *In*: REIS, R.E., KULLANDER, S.O., FERRARIS, C.J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America.** EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 174-181, 2003.
- LIU, W., HOU, Y., JIN, Y., WANG, Y., XU, X., HAN, J. **Research progress on liposomes: Application in food, digestion behavior and absorption mechanism.** *Trends in Food Science & Technology*, 104, p. 177–189, 2020. doi:10.1016/j.tifs.2020.08.012

- MACIEL, C.M.R.R., LANNA, E.A.T., MACIEL JUNIOR, A., DONZELE, J.L., NEVES, C.A., MENIN, E. Morphological and behavioral development of the piracanjuba larvae. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, n.5, p. 961-970, 2010.
- MALER, L., ELLIS, W.G. **Inter-male aggressive signals in weakly electric fish are modulated by monoamines.** *Behav. Brain. Res.* 25, p. 75– 81, 1987.
- MUNRO, A.D. **Effects of melatonin, serotonin, and naloxone on aggression in isolated cichlid fish (*Aequidens pulcher*).** *J. Pineal Res.* 3, p. 257–262, 1986.
- MURGAS, L.D.S., FRANCISCATTO, R.T., SANTOS, A.G.O. **Avaliação espermática pós-descongelamento em piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849).** *Reista Brasileira de Zootecnia*, 32(6 suppl 2), p. 1810–1814, 2003.
- NOGUEIRA, L.B., GODINHO, A.L., GODINHO, H.P. **Early development and allometric growth in hatcheryreared characin *Brycon orbignyanus*.** *Aquaculture Research*, 1–8, p. 1004–1011, 2012. doi:10.1111/are.12041
- OLIVEIRA, D.J., ASHIKAGA, F.Y., FORESTI, F., SENHORINI, J.A. **Conservation Status of the “Piracanjuba” *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes, Bryconidae): Basis for Management Programs.** *Biodiversidade Brasileira*, 7(1): p. 18-33, 2017.
- OTEIZA, D. et al. **Río de la Plata.** *Encyclopædia Britannica*. 2014.
- PEIXE BR. Associação Brasileira de Piscicultura. **Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2021.** 1ª Ed, São Paulo, Brasil, 2021.
- PREM KUMAR, KAILSASAM, M., SETHI, S.N., SUKUMARAN, K., BISWAS, G., SUBBURAJ, R., THIAGARAJAN, G., GHOSHAL, T.K., VIJAYAN, K.K. **Effect of dietary L-tryptophan on cannibalism, growth and survival of Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) fry.** *Indian J. Fish.*, 64(2): p. 28-32, 2017.
- REYNALTE-TATAJE, D., ZANIBONI-FILHO, E., ESQUIVEL, J.R. **Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae).** *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, v. 26, no. 1, p. 67-71, 2004.
- SACCOL-PEREIRA, A., NUÑER, A.P.O. **Utilização de diferentes densidades, dietas e formatos de tanque na larvicultura da piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Characiformes, Characidae).** *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, Maringá, v. 25, n. 1, p. 55-61, 2003.
- SANTIAGO, C.B., LOVELL, R.T. **Amino acid requirements for growth of Nile tilapia.** *J. Nutr.* 118, p. 1540– 1546, 1988.
- SENHORINI, J.A., GASPAR, L.A., FRANSOZO, A. **Crescimento, sobrevivência e preferência alimentar das larvas de matrinxã (*Brycon cephalus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) em viveiros.** *Boletim Técnico do CEPTA*, Pirassununga, v. 15, p. 9-21, 2002.
- SCHRECK, C.B., TORT, L. **The Concept of Stress in Fish.** *In: Biology of Stress in Fish. Fish Physiology*, v. 35, p. 1–34, 2016. doi:10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1.

SMITH, C., REAY, P. **Cannibalism in teleost fish**. Reviews in Fish Biology and Fisheries, v. 1, p. 41-64, 1991.

TEJPAL, C.S., PAL, A.K., SAHU, N.P., ASHISH KUMAR J., MUTHAPPA, N.A., VIDYA, S. *et al.* **Dietary supplementation of l-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerlings**. Aquaculture 293: p. 272–277, 2009.

TONHEIM, S.K., KOVEN, W., RØNNESTAD, I. **Enrichment of Artemia with free methionine**. Aquaculture, 190(3-4), p. 223–235, 2000. doi:10.1016/s0044-8486(00)00402-6.

VAZZOLER, A.E.A.M., MENEZES, N.A. **Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei: Ostariophysi)**. Revta. Brasil. Biol. 52:627-640, 1992.

VIDAL, L.V.O. *et al.* **Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000800017>.

VON IHERING, R., AZEVEDO, P.A. **desova e a hipofiseação dos peixes. Evolução de dois Nematognathas**. Arch Inst Biol, v.7, p.107-18, 1936.

WILSON, R.P. **Amino acids and proteins**. In: HALVER, J., HARDY, R.W. (eds) Fish Nutrition, p. 143–179, 2002. Academic Press, New York, NY.

WINBERG, S., NILSSON, G.E. **Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish**. Comp. Biochem. Physiol., C 106, p. 597– 614, 1993.

WOLKERS, C.P.B., SERRA, M., HOSHIBA, M.A., URBINATI, E.C. **Dietary-tryptophan alters aggression in juvenile matrinxã *Brycon amazonicus***. Fish Physiol Biochem 38(3), p. 819–827, 2012. doi:10.1007/s10695-011-9569-x.

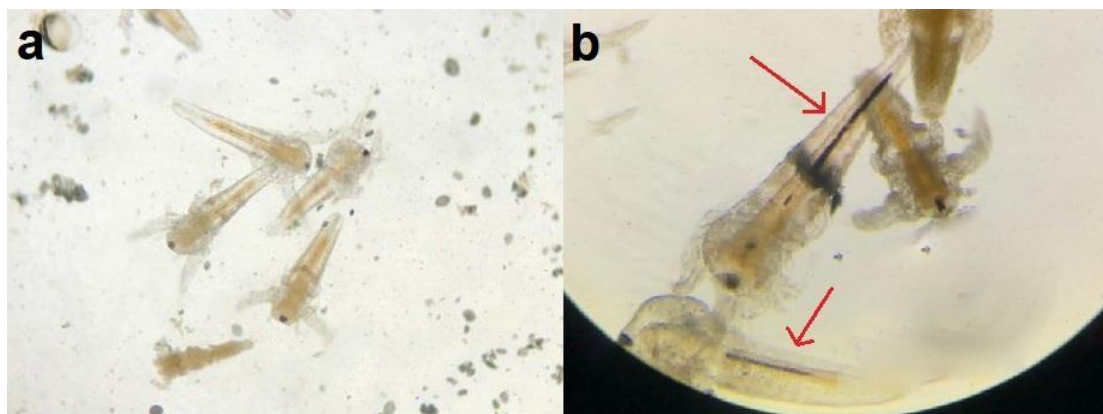
ZANIBONI FILHO, E., MEURER, S., SHIBATTA O.A., NUÑER, A.P.O. **Catálogo ilustrado de peixes do alto rio Uruguai**. Florianópolis: Editora da UFSC/Tractebel Energia. 128p, 2004.

ANEXO I

ENSAIO 1 - DETERMINAÇÃO DO PERÍODO DE ENRIQUECIMENTO DOS METANÁUPLIOS.

Em um ensaio realizado anteriormente ao experimento, foi avaliado o tempo necessário para que os metanáuplios apresentassem o tubo digestivo preenchido com material particulado, sob as mesmas condições físico-químicas do período experimental; devido ao forte contraste durante análise em microscopia de luz, foi escolhido o carvão em pó. O carvão foi diluído em água a uma concentração de 25 mg ml^{-1} , sendo esta solução acrescida de artêmias a uma concentração de $500 \text{ artêmias ml}^{-1}$. A cada 10 minutos, amostras eram retiradas em triplicata e analisadas em microscopia, de modo a avaliar o trato digestório dos crustáceos (FIGURA 9). O período de preenchimento total do TGI foi avaliado em 30 minutos, sendo este definido como o tempo de enriquecimento pré-alimentação. Conforme discutido por Tonheim *et al.* (2000), em um experimento realizado com artêmias enriquecidas com metionina, após 16 horas em enriquecimento, aproximadamente 50% da metionina absorvida havia sido convertida em outros metabólitos sulfurados. Uma vez que o presente trabalho objetiva avaliar os efeitos do triptofano em sua forma de aminoácido, o período de enriquecimento de 30 minutos garante a maior quantidade possível a ser carregada aos peixes, com a menor proporção do mesmo sendo metabolizada em outros compostos pelas artêmias.

Figura 9 – Análise da filtração de carvão em pó em microscopia de luz.



Metanáuplios de artêmia com trato digestório vazio (a) e preenchido com carvão em pó, indicado por setas vermelhas (b).

Fonte: Do autor (2020).

ANEXO II

ENSAIO 2 – METODOLOGIA DE ENCAPSULAÇÃO DO TRIPTOFANO COM LIPOSSOMOS DE LECITINA.

Além do chamado enriquecimento direto, em que o triptofano é diretamente filtrado metanúplios e subsequentemente pelos peixes, serão avaliados os efeitos do triptofano encapsulado por lipossomos de lecitina, visto que fosfolipídios, através da formação de micelas, facilitam o transporte de substâncias do meio extra para intracelular (LASIC, 1998; LIU *et al.*, 2020). De modo a obter a equidade e controle das substâncias, foi escolhida a lecitina de soja comercial.

Um segundo ensaio foi realizado com o objetivo de definir o método de formação de lipossomos através da lecitina. Sobre cada uma das duas concentrações de soluções aquosas de triptofano a serem avaliadas (25 e 125 mg ml⁻¹) a lecitina de soja foi gradativamente adicionada e homogeneizada em *vortex*, até que cada solução apresentasse aspecto de emulsão, e as micelas se apresentassem homogêneas sob microscopia de luz. As proporções encontradas foram de 8 mg de lecitina para cada miligrama de triptofano.