

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**FÓSFORO DISPONÍVEL NA NUTRIÇÃO E SAÚDE ÓSSEA DE
PEIXES TELEÓSTEOS**

Ludmila Lopes de Castro Menezes
Orientador: Prof. Dr. Igo Gomes Guimarães

GOIÂNIA
2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

LUDMILA LOPES DE CASTRO MENEZES

3. Título do trabalho

FÓSFORO DISPONÍVEL NA NUTRIÇÃO E SAÚDE ÓSSEA DE PEIXES TELEÓSTEOS

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
 - b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
- O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Igo Gomes Guimarães, Usuário Externo**, em 18/11/2024, às 13:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ludmila Lopes De Castro Menezes, Discente**, em 18/11/2024, às 17:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4974521** e o código CRC **8766E0CB**.

LUDMILA LOPES DE CASTRO MENEZES

FÓSFORO DISPONÍVEL NA NUTRIÇÃO E SAÚDE ÓSSEA DE PEIXES TELEÓSTEOS

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Zootecnia junto ao Programa de Pós- Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

Área de concentração:

Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Igo Gomes Guimarães- UFG/REJ

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Guilherme Wolff Bueno

UNESP/ SP

GOIÂNIA
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Menezes, Ludmila Lopes de Castro
FÓSFORO DISPONÍVEL NA NUTRIÇÃO E SAÚDE ÓSSEA DE PEIXES
TELEÓSTEOS [manuscrito] / Ludmila Lopes de Castro Menezes. -
2023.
88 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Igo Gomes Guimarães; co-orientadora Dra.
Guilherme Wolff Bueno.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Goiânia, 2023.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Peixes teleósteos . 2. Fósforo disponível . 3. Nutrição mineral. 4.
black cachama. 5. Formação óssea. I. Guimarães, Igo Gomes, orient. II.
Título.

CDU 635



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata nº 77 da sessão de Defesa de Tese de **Ludmila Lopes de Castro Menezes** que confere o título de **Doutora em Zootecnia** pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na área de concentração em Produção Animal.

Aos **vinte e um dias do mês de setembro de dois mil e vinte e três (21/09/2023)** às **08h00min** por videochamada pelo link: <https://meet.google.com/vdy-cfxy-otq>, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “**FÓSFORO DISPONÍVEL NA NUTRIÇÃO E SAÚDE ÓSSEA DE PEIXES TELEÓSTEOS**”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador **Igo Gomes Guimaraes** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Adalberto Luis Val – INPA, Crístielle Nunes Souto - Ciagra/UFJ e Denise Silva de Oliveira - UFJ**, membros titulares externos; **Heloisa Helena de Carvalho Mello - EVZ/UFG**, membro titular interna. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **Aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Orientador e Presidente da Banca Examinadora **Igo Gomes Guimarães**, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Heloisa Helena De Carvalho Mello, Professora do Magistério Superior**, em 21/09/2023, às 11:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Igo Gomes Guimarães, Usuário Externo**, em 21/09/2023, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **CRISTIELLE NUNES SOUTO, Usuário Externo**, em 21/09/2023, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Denise Silva De Oliveira, Usuário Externo**, em 21/09/2023, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adalberto Luis Val, Usuário Externo**, em 21/09/2023, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4061706** e o código CRC **66A6E62E**.

Referência: Processo nº 23070.047939/2023-12

SEI nº 4061706

À minha mãe e irmã, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a minha amada família, que são os suportes da minha vida, que sempre me amparam com amor e afeto em todas as situações. Sempre serei grata.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Igo Gomes Guimarães, pelo exemplo de profissional competente e dedicado. Sou grata por ter um orientador que sempre me apoiou e acredita no meu trabalho.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Guilherme Wolff Bueno, e a Prof. Dra. Delma Machado Cantisani Padua por toda colaboração, apoio e ensinamentos.

À Universidade Federal de Jataí por ter cedido às instalações do Setor de Piscicultura e Laboratório de Pesquisa em Aquicultura para a realização do projeto e desenvolvimentos de todas as atividades experimentais.

À professora. Dr. Vania Maria de Vasconcelos Machado do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ da UNESP, pelo carinho e inestimado auxílio nas análises de tomografia computadorizada. *Aos funcionários, técnicos e pós-graduandos, em especial ao Heraldo, pela ajuda e comprometimento.*

A professora Juliana Fatima Sales e aos alunos e estagiários do laboratório de sementes da IF Goiano, Campus Rio Verde pelo auxílio nas análises de raio- X.

As professoras Ana Paula Perez e Tracy Martina pelo comprometimento, dedicação e atenção no auxílio às análises histológicas.

A todos os colegas que me auxiliaram nas etapas de desenvolvimento da pesquisa e na finalização dos experimentos, que de maneira direta ou indireta contribuíram com a execução dos experimentos, coletas e análises.

A todos os meus queridos amigos. Agradeço o suporte emocional, as palavras de incentivo e por me ajudarem a enfrentar todos os momentos difíceis com leveza e alegria. Em especial a minha querida amiga Cristielle Nunes e minha querida estagiária Priscilla Couto. A todos os estagiários que estiveram comigo durante todo esse período, obrigada! Agradeço por poder compartilhar e aprender com vocês. Vocês são demais!

Aos professores do programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, pela disponibilidade e profissionalismo. À capes pela concessão da bolsa de estudos.

Meu sincero e fraterno agradecimento a todos que participaram dessa etapa da minha vida, vocês foram muito importantes.

O que se tornará o mundo se nossas mulheres tiverem medo?

Ele desmoronará!

O céu cairá

e as estrelas que o constelam

vão se misturar a poeira das estradas.

Maryse Condé

SUMÁRIO

Capítulo 1- Considerações iniciais	1
Capítulo 2- Artigo adaptado as normas da revista Animal Feed Science and Technology:	12
Dietary phosphorus requirement for tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>, in the grow-out phase	12
Abstract	13
Introduction	14
Materials and Methods	15
Results	18
Discussion	19
Conclusions	24
Acknowledgments	25
References	25
Tables	31
Appendix 1	40
Capítulo 3- Artigo adaptado as normas do Journal of Fish Biology	41
Perfil de mineralização da carcaça associada a recuperação da deficiência de fósforo em diferentes espécies de peixes	41
Resumo	42
Introdução	43
Material e métodos	45
Resultados	52
Discussão	64
Referências	69
Anexo 1.	73
Anexo 2.	74
Anexo 3.	75
Anexo 4.	76
Capítulo 4- Considerações finais	77

LISTA DE TABELAS

Table 1. Experimental diets and chemical composition of the experimental feeds.....	31
Table 2. Apparent digestibility coefficients (ADC) of dry matter, crude protein and phosphorus of tambaqui fed diets containing graded levels of available phosphorus (AP) (n = 8).	32
Table 3. Final weight, daily feed intake, daily weight gain, feed conversion ratio, phosphorus utilization rate and protein efficiency rate of tambaqui fed diets containing graded available P (AP) levels for 180 days.....	33
Table 4. Whole-body chemical composition (dry matter basis) of tambaqui fed de tambaquis fed diets containing graded available P (AP) levels for 180 days (n=8).....	34
Table 5. Whole-body, vertebrae and scales mineral composition of tambaqui fed de tambaquis fed diets containing graded available P (AP) levels for 180 days (n=8).....	35
TABELA I. Dietas experimentais e composição química das rações experimentais	46
TABELA II. Coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) de proteína bruta, e fósforo de juvenis de tilápia, pirapitinga e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta (n = 12)	53
TABELA III. Composição corporal (100%MS) de juvenis de tilápia, pirapitinga, e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta (média ±DP)	53
TABELA IV. Composição mineral do corpo inteiro, das escamas, das vertebrae, e dos ossos da cabeça de juvenis de tilápia alimentadas com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta (média± DP)	55
TABELA VI. Composição mineral do corpo inteiro, das nadadeiras, das vertebrae, e dos ossos da cabeça de juvenis de panga alimentadas com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta (média± DP)	58
TABELA VII. Densitometria do conjunto de vertebrae peitoral, dorsal e caudal de juvenis de tilápia, pirapitinga e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta (média ± DP)	62

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1.** Phosphorus content in the head bones of tambaquis fed with different levels of available phosphorus (n=8) 37
- Figure 2.** Albumin (A), total proteins (B), triglycerides (C) of tambaquis fed with different levels of available phosphorus (n=12) 38
- Figure 3.** Total serum phosphorus (A), total serum calcium (B), and alkaline phosphatase (C) of tambaquis fed with different levels of available phosphorus (n=12)..... 39
- Figure 4.** Lysozyme activity (A), total immunoglobulin (B), and SOD (C) of tambaquis fed with different levels of available phosphorus (n=12)..... 40
- Figura 1.** Sistema de coleta de fezes por sedimentação..... 49
- Figura 2.** Configuração experimental. Fase 1: de 1 a 90 dias, os peixes são alimentados com a dieta controle e deficiente. Fase 2: de 91 a 120 dias, os peixes do grupo deficiente são alimentados com a dieta controle 50
- Figura 3.** Locais considerados para coleta de nadadeiras de juvenis de panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta 51
- Figura 4.** Imagem de tomografia computadorizada de juvenis de pirapitinga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta mostrando as regiões consideradas para a medição da densidade mineral óssea do conjunto de vertebrae: peitoral, dorsal e caudal..... 53
- Figura 5.** Relação Cálcio: fósforo dos ossos da cabeça, escama e vertebrae de juvenis de tilápia, pirapitinga e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta. 60
- Figura 6.** Valores absolutos de proteínas totais, albumina, triglicérides, colesterol de juvenis de tilápia, pirapitinga e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta. 61
- Figura 7.** Valores absolutos de cálcio sérico, fósforo sérico e fosfatase alcalina de juvenis de tilápia, pirapitinga e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta. 62
- Figura 8.** Imagens tomográficas da formação óssea, volume e densidade dos ossos da cabeça de juvenis de (A) tilápia, (B) pirapitinga e (C) panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta 64

Resumo

A presente tese teve como objetivo investigar a utilização do fósforo disponível (Pdisp.) em dietas de espécies de peixes teleósteos, considerando seus efeitos sobre o crescimento, saúde, desenvolvimento ósseo e mineralização de estruturas esqueléticas. Para isso, foram conduzidos experimentos científicos que determinarão as implicações quantitativas e qualitativas do consumo de dietas contendo níveis de correspondência dietética adequada, abaixo e acima das exigências nutricionais específicas de cada espécie. Os resultados desses estudos resultaram na elaboração de dois artigos científicos, cujas abordagens e principais são descritos a seguir. O primeiro artigo teve como objetivo determinar a exigência nutricional de Pdisp. para tambaquis (*Colossoma macropomum*) na fase final de crescimento (\pm 400 a 1000g). Os resultados indicaram que a suplementação de Pdisp. não afetou o crescimento dos tambaquis alimentados com dietas à base de plantas, sendo que as dietas contêm 4,1 g/kg de Pdisp. foram suficientes para sustentar o crescimento na fase avaliada. No entanto, para adequada mineralização do corpo inteiro e de estruturas mineralizadas o nível de Pdisp. na dieta dos tambaquis é de 10,3 g/kg. O segundo artigo investigou os impactos da deficiência de Pdisp. e o efeito do reestabelecimento do mineral na dieta em três espécies de peixes teleósteos: tilápia (*Oreochromis niloticus*), pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e panga (*Pangasius pangasius*). Os resultados mostraram que a deficiência de fósforo aumentou a deposição de gordura corporal, no entanto o restabelecimento do fornecimento de Pdisp. não foi capaz de reverter completamente essa adiposidade. A dinâmica de deposição de minerais nas estruturas mineralizadas foi espécie-específica, com os ossos cefálicos sendo a principal fonte de mobilização mineral em situações de deficiência. Os achados indicam que o reestabelecimento do fornecimento de Pdisp. após um longo período de deficiência é capaz de reestabelecer o bem-estar fisiológico dos peixes avaliados deste estudo. Os resultados obtidos destacam a importância da avaliação dos impactos da deficiência de fósforo em diferentes fases de criação e a utilização de parâmetros adequados na determinação do nível de Pdisp. nas dietas de peixes teleósteos. Embora as anormalidades ósseas sejam indicadores visíveis e relevantes, elas representam apenas uma parte das consequências da deficiência de fósforo, sendo os efeitos metabólicos e fisiológicos menos aparentes. Por isso, uma abordagem mais abrangente e com foco em parâmetros relacionados ao bem-estar fisiológico dos peixes teleósteos pode contribuir com aquicultura mais sustentável e ambientalmente amigável.

Palavras-chave: nutrição mineral, fósforo disponível, peixe teleósteo, nutrição de peixes

Abstract

This thesis aimed to investigate the use of available P (AP) in diets of teleost fish species, considering its effects on growth, health, bone development and mineralization of skeletal structures. For this purpose, scientific experiments were conducted to determine the quantitative and qualitative implications of the consumption of diets containing levels of adequate dietary correspondence, below and above the specific nutritional requirements of each species. The results of these studies resulted in the elaboration of two scientific articles, whose approaches and main features are described below. The first article aimed to determine the nutritional requirement of AP for tambaquis (*Colossoma macropomum*) in the final growth phase (\pm 400 to 1000 g). The results indicated that AP supplementation did not affect the growth of tambaquis fed plant-based diets, and the diets containing 4.1 g/kg of AP. were sufficient to sustain growth in the evaluated phase. However, for adequate mineralization of the whole body and mineralized structures, the level in the diet of tambaquis is 10.3 g/kg AP. The second article investigated the impacts of AP. deficiency and the effect of restoring the mineral in the diet in three species of teleost fish: tilapia (*Oreochromis niloticus*), pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) and panga (*Pangasius pangasius*). The results showed that phosphorus deficiency increased body fat deposition, however, restoring the AP supply was not able to completely reverse this adiposity. The dynamics of mineral deposition in mineralized structures was species-specific, with the cephalic bones being the main source of mineral mobilization in situations of deficiency. The findings indicate that reestablishing the AP supply after a long period of deficiency is able to restore the physiological well-being of the fish evaluated in this study. The results obtained highlight the importance of assessing the impacts of phosphorus deficiency at different stages of rearing and the use of appropriate parameters to determine the level of AP in the diets of teleost fish. Although bone abnormalities are visible and relevant indicators, they represent only a part of the consequences of phosphorus deficiency, with the metabolic and physiological effects being less apparent. Therefore, a more comprehensive approach focusing on parameters related to the physiological well-being of teleost fish can contribute to more sustainable and environmentally friendly aquaculture.

Keywords: mineral nutrition, available phosphorus, teleost fish, fish nutrition

Capítulo 1- Considerações iniciais

A aquicultura é um dos setores agroalimentares de maior crescimento nas últimas décadas. Em paralelo, de 1961 a 2017, o consumo mundial de pescado apresentou aumento anual de 3,1%, percentual quase duas vezes maior que o crescimento anual da população mundial no mesmo período (1,6%) e acima do crescimento anual de outros alimentos como, carne vermelha, laticínios e leite, que aumentaram 2,1% ao ano ¹. Esse desenvolvimento acelerado impõe desafios significativos para a cadeia aquícola, suscitando questões relacionadas à sustentabilidade e segurança ambiental em uma perspectiva de longo prazo. Um dos desafios emergentes é o aumento da incidência de deformidades ósseas em peixes criados em sistemas de produção, acarretando implicações tanto quantitativas quanto qualitativas. Tais deformidades podem restringir o crescimento dos peixes, causar perdas na colheita e prejudicar a qualidade do produto ². Concomitantemente, há um incremento no custo metabólico dos peixes afetados por tais deformidades ósseas, levantando questões sobre o bem-estar animal ³. Em síntese, a saúde óssea dos peixes tem impactos diretos nos aspectos financeiros, ecológicos e éticos inerentes à prática de produção aquícola.

As deformidades esqueléticas em peixes são alterações que afetam o tecido ósseo e/ou cartilaginoso, resultando na formação de estruturas atípicas com diferenças histológicas e anatômicas em relação ao seu estado normal. A ocorrência dessas deformidades em peixes teleósteos pode estar relacionada a diversos fatores, incluindo a idade, sexo, poluentes ambientais, agentes infecciosos, genética e condições de criação, como choque térmico, superlotação e má nutrição ⁴. Há vários relatos de deformidades ósseas em peixes cultivados alimentados com dietas deficientes em fósforo (P) ⁵⁻⁷. Em sistemas intensivos e semi-intensivos de produção, a ocorrência de osteomalácia e a redução do conteúdo mineral dos peixes está diretamente ligado ao nível de P da dieta ⁵.⁸. Nesse contexto, o P é o nutriente mais estudado na aquicultura ⁹. Apesar disso, o efeito do fósforo dietético na saúde óssea dos peixes ainda não é bem compreendido ⁷. Sabe-se que, os peixes cultivados alimentados com dietas deficientes em P ou com ingredientes indigestíveis apresentam baixo crescimento e deformidades esqueléticas ¹⁰.

O P é elemento essencial para uma variedade de processos biológicos. Sua principal função no organismo é a formação da estrutura óssea. A estrutura esquelética constitui a estrutura básica para o crescimento de um animal saudável, e os minerais, principalmente o P da dieta, são um importante grupo de nutrientes essenciais para o desenvolvimento adequado do esqueleto. Assim, a saúde óssea é dependente da ingestão

suficiente desses minerais. No entanto, os peixes teleósteos possuem a capacidade fisiológica de absorver alguns minerais do meio aquático, incluindo o cálcio. Porém, possuem baixa eficiência de absorção do fósforo na água, devendo sua exigência ser suprida pela dieta ¹¹. Se as dietas não contiverem quantidade suficiente de P ou se os ingredientes forem indigestíveis o peixe pode sofrer com a deficiência P.

Deficiência de fósforo e patologias ósseas

A estrutura esquelética normal dos peixes teleósteos é composta por uma parte inorgânica envolvida em uma matriz orgânica de fibras de colágeno tipo I ¹². A fração inorgânica, compõe cerca de 65% da massa seca do osso, é basicamente formada de cálcio e fósforo na forma de hidroxiapatita. Além disso, os ossos e estruturas mineralizadas como dentes, escamas, opérculo e nadadeiras, representam um reservatório importante de minerais, especialmente cálcio (Ca), fósforo (P), zinco (Zn), magnésio (Mg) e manganês (Mn) ⁷. Em situações de deficiência nutricional, essas estruturas são preferencialmente utilizadas para mobilização de minerais, a fim de se priorizar os processos metabólicos e fisiológicos¹⁰. A intensa mobilização de minerais das estruturas mineralizadas em situações de deficiência nutricional pode ser uma das causas primárias do aparecimento de lesões e deformidades na estrutura esquelética dos peixes.

Múltiplos registros de deformidades ósseas têm sido observados em algumas espécies de peixes em resposta às dietas deficientes em P. De fato, as deformidades esqueléticas são os principais sintomas de deficiência de P em algumas espécies de peixes ⁹. As lesões causadas por tais deformidades são diversas em seu grau de severidade, localização morfológica e impacto biomecânico. Sendo que, as regiões do corpo mais suscetíveis ao aparecimento de deformidades são ossos da coluna vertebral, ossos cefálicos e ossos finos, como costelas ⁵. Entretanto, os efeitos deletérios da deficiência de P vão desde a redução da taxa de crescimento, hipofosfatemia, osteomalácia e até a morte ¹⁰.

Em larvas de diversas espécies de peixes submetidas a deficiência dietética de P, foi observado deformidades nas vértebras e mandíbulas, com essas deformidades se tornando mais pronunciadas ou visíveis à medida que o peixe cresce. Em juvenis, foram identificadas deformidades esqueléticas nas extremidades em crescimento, especialmente na ponta de ossos finos, como as costelas pleurais⁵. Para peixes adultos esses sintomas foram caracterizados por vértebras deformadas em *Melanogrammus aeglefinus* ¹³, lordose, cifose e escoliose e fusão de vertebras em *Salmo solar* ^{14, 15}, costelas curvas

em *Oncorhynchus mykiss*³, arqueamento das mandíbulas e degeneração da articulação mandíbula-maxilar juntamente com septação anormal da bexiga natatória em *Oreochromis niloticus*¹⁶. Esses efeitos são resultado de um aumento na mobilização de fosfato de cálcio dos ossos e demais estruturas mineralizadas em situações de deficiência de fósforo. Isto, provavelmente, reflete mecanismos compensatórios para restaurar as concentrações plasmáticas de P. Em que, a deficiência de P dietético aumenta a atividade da fosfatase alcalina (ALP) e reduz as atividades da enzima TRACP (Tartrate-resistant acid phosphatase) e transcrição de MMP13 (responsável pela produção de colagenase 3) dos corpos vertebrais dos peixes^{15,17}. O aumento da atividade de ALP resulta na liberação de íons fosfato, enquanto a atividade reduzida de TRACP e a expressão de MMP 13 indicam redução da remodelação do tecido ósseo. Assim, o peixe pode utilizar o tecido ósseo como fonte de P para sustentar os processos metabólicos e fisiológicos frente a situações de deficiência de P dietético¹⁵. Conseqüentemente, há redução na ossificação e deposição de minerais na carcaça. Nesses casos, a densidade óssea é reduzida e pode ocorrer a má formação de vertebras, alterações estruturais no esqueleto e propriedades mecânicas dos ossos¹⁸. No entanto, há poucos estudos que avaliaram a dinâmica de mobilização de minerais dos tecidos mineralizados dos peixes. Aparentemente, os tecidos mais sensibilizados durante situações de deficiência dietética de P são as escamas e ossos cefálicos^{2,3,7,19}. No entanto, não se sabe quais os tecidos são preferencialmente utilizados para mobilização de minerais em situações de deficiência dietética de P, tampouco, como essas interações afetam os tecidos em diferentes espécies de peixes teleósteos.

As lesões ósseas e desmineralização de estruturas causadas por deficiência nutricional levantam questões sobre o bem-estar animal, danos econômicos e ambientais ao setor da aquicultura. As deformidades das vertebras afetam gravemente a saúde, pois a coluna deformada pode provocar dor e impedir atividades normais, como a capacidade de nadar e se alimentar¹². Além disso, os danos causados por peixes malformados representam importantes perdas econômicas para a produção, pois a aparência do produto final pode ser menos aceitável para os consumidores e também podem resultar em perdas na classificação¹⁶. Entretanto, a maior parte dos estudos é baseado em salmonídeos cultivados^{5,7,12}. Em peixes tropicais o aparecimento de lesões ósseas e osteomalácias ainda não foram caracterizadas, sendo que, a principal consequência da deficiência de P para estas espécies é a redução no crescimento e o aumento da deposição de gordura corporal¹⁹⁻²¹. Nesses casos, pode haver rebaixamento do produto final em decorrência do aumento de adiposidade na carcaça, levando a perdas econômicas. Aparentemente, em

peixes tropicais a deficiência de P afeta principalmente ossos da região cefálica, sem consequências na morfologia corporal, comportamento de natação ou má formação^{19, 22}. É possível que espécies de peixes que possuam número maior de estruturas mineralizadas no corpo (como por exemplo, as escamas, osso cranial, opérculo e nadadeiras) tenham mecanismos de mobilização mineral diferentes dos salmonídeos. Um exemplo disso é o *Collossoma macropomum*, que precisa de menos fósforo dietético para mineralização das vertebrae do que a quantidade para manter o crescimento somático normal¹⁹. A falta de efeito deletérios na estrutura óssea de peixes alimentados com dietas sem suplementação de fósforo também foi relatada para o tambaqui (*Collossoma macropomum*) na fase de juvenil²⁰ e pacu (*Piaractus mesopotamicus*)²³.

A produção aquícola abrange diversas espécies de peixes e os critérios para avaliação do impacto do fósforo dietético na saúde e bem-estar dos peixes precisa ser definido de acordo com as características de cada espécie. Em decorrência disso, têm sido empreendido esforços no intuito de identificar indicadores diagnósticos sensíveis e confiáveis para a determinação do status de fósforo em peixes teleósteos^{16, 24}. Nem todas as deformidades ósseas são visíveis nos peixes^{12, 24}. Deformidades menores ou em desenvolvimento só podem ser encontradas por meio de exames avançados, por exemplo, utilizando raios-X, tomografia computadorizada, micro tomografia, ressonância magnética ou exame histopatológico¹². Tais deformidades também são propostas como indicadores biológicos de poluição ambiental aquática e falhas no manejo da aquicultura, pois podem levar a diminuição na sobrevivência dos peixes e má utilização de nutrientes^{12, 16}. O problema pode ser subestimado, uma vez que para a maioria das espécies de peixes não se conhece o real impacto da utilização de dietas deficientes em fósforo, bem como dietas com excesso do mineral. Embora seja necessário suprir as necessidades de P na dieta dos peixes para garantir o crescimento e o desenvolvimento ósseo saudável, o excesso de P e a fração de P indigestível da dieta são invariavelmente excretados, poluindo o meio ambiente, e causando danos econômicos consideráveis ao setor da aquicultura^{5, 16}.

Fósforo e o desenvolvimento sustentável da aquicultura

Não há dúvida de que o fósforo é um nutriente essencial para produção de peixes. A utilização responsável desse nutriente durante o cultivo pode garantir o crescimento da aquicultura. O não aproveitamento dos nutrientes, principalmente do P e N, promove acúmulo no meio de cultivo que, em excesso, pode ocasionar a eutrofização dos corpos

d'água com conseqüente degradação ambiental²⁵. A fonte dominante de P no efluente da aquicultura é P excretado na dieta pelos peixes. No entanto, somente a diminuição da quantidade do mineral na dieta dos peixes não seria solução viável para diminuir a excreção de P no meio aquático, pois este nutriente é essencial para o crescimento e desempenho das funções fisiológicas dos peixes¹⁰. Assim, aumentar a disponibilidade de P dietético é necessário para minimizar a excreção fecal de P pelos peixes.

Durante o desenvolvimento do peixe as exigências nutricionais são alteradas em função de fatores fisiológicos e ambientais e tende a reduzir a medida que o animal cresce²⁶. Além disso, o fósforo é um nutriente essencial para manutenção da vida de ecossistemas aquáticos. Apesar de não ser o nutriente mais escasso em ecossistemas aquáticos continentais, o fósforo é o mais limitante à produção primária e é considerado como indicador chave nos estudos de capacidade de suporte e qualidade de água²⁷. Isto porque a ocorrência do nutriente no meio aquático é menor ou igual à demanda do nutriente para o crescimento de organismos aquáticos com capacidade fotossintética. Assim, as liberações de P em corpos hídricos continentais são alarmantes, pois em excesso, esse nutriente é um dos fatores que pode conduzir à degradação de ecossistemas aquáticos²⁵. Além disso, estima-se que 66% do P obtido por alimentação intensiva é depositado no sedimento e 11% é dissolvido em água²⁸. Apenas 32% do P consumido é usado para o metabolismo do peixe e o restante é transferido para o meio ambiente. Em contrapartida, há dificuldade na regulamentação dos níveis de fósforo utilizado nas rações de peixes, pois, além da escassez de informação sobre a exigência nutricional de algumas espécies, a indústria considera valores de nutrientes totais do alimento desatentando-se a digestibilidade, e no caso do P a disponibilidade do nutriente¹⁰. Aumentar a disponibilidade de P dietético é necessário para minimizar a excreção fecal de P pelos peixes. Melhorar a biodisponibilidade de minerais nas dietas de peixes parece ser a abordagem mais sustentável e ecologicamente amigável para garantir uma saúde óssea adequada e reduzir o impacto ambiental da aquicultura.

Em contrapartida, os ingredientes de origem vegetal tem sido cada vez mais utilizados nas rações para peixes, substituindo a farinha de peixe. O aumento do uso de ingredientes de origem vegetal pode afetar a biodisponibilidade do P dietético, pois a presença de fitatos pode diminuir a digestibilidade do mineral em dietas a base de ingredientes vegetais¹⁰. Estima-se que em dietas a base de ingredientes vegetais, até dois terços do P estão na forma de fósforo fitico (Pfit)⁵. A fitase é a enzima responsável pela degradação intestinal do Pfit. É possível que algumas espécies de peixes, incluindo o

tambaqui e a tilápia, possuam mecanismos fisiológicos para usar o Pfit de produtos vegetais a partir de fitase produzida pela microbiota intestinal ou fitase endógena^{20 29 7}. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação da fitase endógena em peixes³⁰. Com isso, o uso de fontes exógenas de fitase tem sido utilizado como estratégia nutricional para aumentar a digestibilidade dos ingredientes vegetais nas dietas de peixes³¹. O uso de fitase pode melhorar a disponibilidade de Pfit encontrado em ingredientes vegetais, e também de outros minerais como o Zn e Mg³⁰⁻³². No entanto, há limitação na utilização de fitase nos alimentos para peixes. Isso por que, a fitase apresenta alta variação no seu potencial de ação de acordo com diversos fatores, como a temperatura, pH luminal, interações com outros minerais e agentes quelantes^{5,30}. Além disso, a digestibilidade do P é altamente variável, mesmo dentro da mesma espécie e dos mesmos ingredientes⁷.

A utilização de estratégias de gestão, como uso de programas para a gestão e controle dos resíduos da aquicultura e utilização de modelos matemáticos para mensurar as exigências dietéticas de P podem ser alternativas ambientalmente seguras para redução da descarga de P nos ecossistemas aquáticos. Além da utilização de programas alimentares que atendam a exigência nutricional das espécies de peixes em todo o ciclo de produção, para que se consiga produzir de forma eficiente e ambientalmente amigável. Isto enfatiza a necessidade de regulamentação mais efetiva para níveis de efluentes gerados pela atividade aquícola³³. Portanto, a definição da concentração de nutrientes utilizados na aquicultura é de extrema importância para o desenvolvimento sustentável dessa atividade²⁸. Consequentemente, o dilema fundamental da aquicultura é como sustentar o crescimento contínuo da produção aquícola, garantindo a saúde e bem-estar dos peixes e minimizando simultaneamente o impacto ambiental da atividade.

Referência

1. FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA). Rome, Italy 2022. p. 288.
2. Cotti S, Huysseune A, Koppe W, Rücklin M, Marone F, Wölfel EM, et al. More Bone with Less Minerals? The Effects of Dietary Phosphorus on the Post-Cranial Skeleton in Zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(15).
3. Deschamps M-H, Poirier Stewart N, Demanche A, Vandenberg GW. Preliminary study for description of bone tissue responsiveness to prolonged dietary phosphorus deficiency in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*. 2016;47(3):900-11.
4. Dietrich K, Fiedler IAK, Kurzyukova A, López-Delgado AC, McGowan LM, Geurtzen K, et al. Skeletal Biology and Disease Modeling in Zebrafish. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2021;36(3):436-58.
5. Sugiura SH. Phosphorus, Aquaculture, and the Environment. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. 2018;26(4):515-22.
6. Witten PE, Fjellidal PG, Huysseune A, McGurk C, Obach A, Owen MAG. Bone without minerals and its secondary mineralization in Atlantic salmon (*Salmo salar*): the recovery from phosphorus deficiency. *J Exp Biol*. 2019;222(Pt 3).
7. Baeverfjord G, Antony Jesu Prabhu P, Fjellidal PG, Albrektsen S, Hatlen B, Denstadli V, et al. Mineral nutrition and bone health in salmonids. *Reviews in Aquaculture*. 2019;11(3):740-65.
8. Berillis P. FACTORS THAT CAN LEAD TO THE DEVELOPMENT OF SKELETAL DEFORMITIES IN FISHES: A REVIEW. *Journal of FisheriesSciencescom*. 2015;9(3):17-.
9. Antony Jesu Prabhu P, Schrama JW, Kaushik SJ. Mineral requirements of fish: a systematic review. *Reviews in Aquaculture*. 2016;8:172-219.
10. Lall SP, Lewis-McCrea LM. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish — An overview. *Aquaculture*. 2007;267(1):3-19.
11. Lall SP. The minerals. In: Halver JE, Hardy RW, editors. *Fish Nutrition*. 3 ed. San Diego: Academic Press, San Diego; 2002.
12. Holm H, Ytteborg E, Høst V, Reed AK, Dalum AS, Bæverfjord G. A pathomorphological description of cross-stitch vertebrae in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*. 2020;526:735382.
13. Roy P, Lall S. Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Aquaculture*. 2003;221(1-4):451-68.

14. Sombraus F, Hansen T, Daae BS, Thorsen A, Sandvik R, Stien LH, et al. Triploid Atlantic salmon *Salmo salar* have a higher dietary phosphorus requirement for bone mineralization during early development. *J Fish Biol.* 2020;97(1):137-47.
15. Fjellidal PG, Hansen TJ, Lock EJ, Wargelius A, Fraser TWK, Sombraus F, et al. Increased dietary phosphorus prevents vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition.* 2016;22(1):72-90.
16. Eissa AE, Abu-Seida AM, Ismail MM, Abu-Elala NM, Abdelsalam M. A comprehensive overview of the most common skeletal deformities in fish. *Aquaculture Research.* 2021;52(6):2391-402.
17. Salas-Leiton E, Dias J, Gavaia P, Amoedo A, Valente LMP. Optimization of phosphorus content in high plant protein practical diets for Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) juveniles: influence on growth performance and composition of whole body and vertebrae. *Aquaculture Nutrition.* 2017;23(1):18-29.
18. Fiedler IAK, Elmogazy O, Courtemanche G, Cardoso L, Berteau JP. Bones of teleost fish demonstrate high fracture strain. *Journal of Biomechanics.* 2021;120:110341.
19. Menezes LLC, Santos JGA, Guimarães IG, Padua DMC, Machado VMV, Souto CN. A new approach for quantifying phosphorus requirement in *Colossoma macropomum* using CT scanning. *Aquaculture Nutrition.* 2021;n/a(n/a).
20. Araújo JG, Guimarães IG, Mota CS, de Paula FG, Café MB, Pádua DMC. Dietary available phosphorus requirement for tambaqui, *Colossoma macropomum*, juveniles based on growth, haematology and bone mineralization. *Aquaculture Nutrition.* 2016.
21. Oliveira LN. Estimativa das exigências energéticas e proteicas para o tambaqui (*Colossoma macropomum*, cuvier 1818) por meio de diferentes abordagens nutricionais. Goiás Universidade Federal de Goiás 2019.
22. Sousa TJR, Bomfim MAD, Ribeiro FB, Takishita SS, Costa DDACDA. PHOSPHORUS REQUIREMENT OF TAMBAQUI FINGERLINGS. *Revista Caatinga.* 2019;32:795-804.
23. Signor AA, Bittencourt F, Potrich FR, Deparis A, Boscolo WR. Phosphorus in feed for pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Revista Brasileira de Zootecnia.* 2011;40(12):2646-50.
24. Witten PE, Fjellidal PG, Huysseune A, McGurk C, Obach A, Owen MAG. Bone without minerals and its secondary mineralization in Atlantic salmon (*Salmo salar*): the recovery from phosphorus deficiency. *Journal of Experimental Biology.* 2019;222(3).
25. Moody EK, Corman JR, Elser JJ, Sabo JL. Diet composition affects the rate and N:P ratio of fish excretion. *Freshwater Biology.* 2015;60(3):456-65.
26. Lellis WA, Barrows FT, Hardy RW. Effects of phase-feeding dietary phosphorus on survival, growth, and processing characteristics of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture.* 2004;242(1):607-16.

27. Luo Z, Tan XY, Liu X, Wang WM. Dietary total phosphorus requirement of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture International*. 2010;18(5):897-908.
28. Bueno GW, Mattos BOd, Neu DH, David FS, Feiden A, Boscolo WR. Stability and phosphorus leaching of tilapia feed in water. *Ciência Rural*. 2019;49.
29. Ellestad LE, Angel R, Soares JH. Intestinal phytase II: A comparison of activity and in vivo phytate hydrolysis in three teleost species with differing digestive strategies. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2002;26(3):259-73.
30. Kumar V, Sinha AK, Makkar HP, De Boeck G, Becker K. Phytate and phytase in fish nutrition. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2012;96(3):335-64.
31. Nie XZ, Chen S, Zhang XX, Dai BY, Qian LC. Effects of neutral phytase on growth performance and phosphorus utilization in crucian carp (*Carassius auratus*). *J Zhejiang Univ Sci B*. 2017;18(10):886-96.
32. Hu J, Ran C, He S, Cao Y, Yao B, Ye Y, et al. Dietary microbial phytase exerts mixed effects on the gut health of tilapia: a possible reason for the null effect on growth promotion. *Br J Nutr*. 2016;115(11):1958-66.
33. Conselho Nacional do Meio Ambiente C. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação de corpos de água e normas ambientais para o seu enquadramento, bem como definir como condições e padrões de lançamento de efluentes, e fornece outras providências. In: CONAMA, editor. Brasília- DF: Diário Oficial da União; 2005.

Capítulo 2- Artigo adaptado as normas da revista *Animal Feed Science and Technology*:

Dietary phosphorus requirement for tambaqui, *Colossoma macropomum*, in the grow-out phase

Ludmila L.C. Menezes¹, Vânia Maria Machado², Crislielle Nunes Souto¹, Danilo Cintra Proença³, Guilherme Wolff Bueno³, Igo G. Guimarães^{1*}

¹ Laboratório de Pesquisa em Aquicultura, Universidade Federal de Jataí, Campus cidade universitária, 75801-615 Jataí, GO, CP 03, Brazil

² Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ- Universidade Estadual de Paulista, 18618-687 Botucatu, SP
– Brazil

³ São Paulo State University - UNESP, Aquaculture Center - CAUNESP, Faculty of Agricultural Sciences of Vale do Ribeira, Registro, SP, Brazil. Zip code: 11900-000.

Keywords: black cachama, dietary phosphorus, mineralization of scales, mineral nutrition

**Correspondence author:* Tel.: +55 64 981805050
E-mail: igoguimaraes@ufj.edu.br (Igo G. Guimarães).

Abstract

Phosphorus is essential for fish growth as it is crucial in skeletal development and metabolic reactions. The dietary requirement for this mineral varies among fish species and growth stages. Therefore, the objective of this study was to determine the available phosphorus (AP) requirement for tambaqui during the grow-out phase (± 400 to 1000g) using growth parameters, whole-body macronutrient composition, whole-body, scales, and bone mineral content, hematological and biochemical blood parameters, and activity of antioxidant enzymes as response parameters. A total of 128 tambaqui ($395\text{g} \pm 20$) were randomly assigned to 15 1000L tanks connected to a recirculating water system and following a completely randomized design with five treatments (4.1, 5.8, 8.0, 9.1, and 10.3 g/kg of AP) and three replications. The fish were fed with the experimental diets to apparent satiety for 180 days. The apparent digestibility coefficients (ADC) of the experimental diets were also determined to report the requirement on an available nutrient basis. Differences among treatments were firstly checked using ANOVA, and when significant ($P < 0.05$), the regression model was used to estimate the dietary AP. No mortality or apparent signs of P deficiency were observed during the growth trial. The ADC of the diets decreased with increasing total phosphorus levels. AP supplementation in the diet did not affect growth performance parameters except phosphorus utilization, which decreased linearly with increasing AP supplementation. Bone mineralization increased with dietary AP supplementation, while the scale and whole-body mineralization were unaffected. Dietary AP levels significantly affected blood biochemical parameters, except for serum phosphorus and triglycerides. The highest superoxide dismutase (SOD) activity was observed in fish fed 8g/kg AP in the diet. The estimated requirement for the highest serum immunoglobulin concentration was 6.17 g/kg of AP. Based on adequate mineralization of the vertebrae, operculum, and skull, the dietary requirement for AP in tambaqui was 10.3 , 9.37 , and 8.06 g/kg diet. For the highest total serum proteins, lysozyme, and immunoglobulins concentration, the most suitable AP levels were 6.06 , 5.8 , and 6.17 g/kg of AP, respectively. Based on growth, tambaqui does not require AP supplementation (4.1 g/kg of AP in the diet) in the grow-out phase when plant-based diets are used.

Keywords: Mineral nutrition, black cachama, neotropical fish, bone mineralization.

Introduction

Phosphorus (P) is the most essential macro mineral for fish nutrition. This mineral plays a fundamental role in bone development, bioenergetics, and intermediary metabolism, affecting the use of nutrients in energy metabolism (Sugiura and Ferraris, 2004a; Xie et al., 2017; Lu et al., 2017). Several studies have demonstrated that P deficiency leads to suppressed growth, low bone mineralization, and compromised immune functions (Fjellidal et al., 2016; Chen et al., 2018). Although fish can absorb phosphorus from water, its concentration in freshwater is relatively low to meet the nutritional requirements of fish raised in intensive or semi-intensive systems, and diets are the primary source of phosphorus for these fish (NRC, 2011).

On the other hand, the excess phosphorus excreted by cultured fish can stimulate the eutrophication of water bodies and cause significant environmental impacts throughout the aquatic food chain. Despite not being the scarcest nutrient in freshwater ecosystems, phosphorus is the most limiting factor for primary production. It is considered a key indicator in studies of carrying capacity and water quality (Green et al., 2002), as its occurrence in the aquatic environment is lower or equal to its demand for the growth of photosynthetic organisms. As a result, the releases of phosphorus into freshwater are alarming and can be predicted (Bueno et al., 2023), while the removal of soluble phosphorus in water bodies is complex (Moody et al., 2015). However, commercial fish feeds often consider only the total phosphorus fraction. In contrast, the content of available phosphorus (AP) varies depending on the quality of ingredients and the sources of phosphorus used in aquaculture diets (Morales and Moyano, 2010).

Reducing the phosphorus content in fish diets alone would not be a viable solution to decrease phosphorus excretion in the aquatic environment. The critical factor in minimizing phosphorus discharge generated by aquaculture is adjusting the dietary intake of available phosphorus (AP) to meet the strict demands of the fish according to the growth stage. Phosphorus requirements are altered due to physiological and environmental factors and tend to decrease as the animal grows (Lellis et al., 2004). However, data on nutritional requirements are scarce, as studies on mineral nutrition for Brazilian native species like tambaqui are generally limited (Guimarães and Martins, 2015). So far, only three studies have reported the phosphorus requirement for tambaqui in the initial phase ($\pm 17\text{g}$) (Menezes et al., 2021), fingerlings ($\pm 0.51\text{g}$) (Sousa et al., 2019), and juveniles ($\pm 144\text{g}$) (Araújo et al., 2017). To our knowledge, no data on the phosphorus requirement for tambaqui in the grow-out phase is available.

Given the information mentioned above and the lack of data on dietary phosphorus requirements for tambaqui in different growth phases, this study aimed to determine the requirement for available phosphorus in the grow-out phase (400-1000g) of tambaqui. Therefore, this study used performance parameters, body composition, body mineralization, bones, scales, hematological and biochemical blood profiles, and antioxidant enzyme activity as response variables to determine the P requirement.

Materials and Methods

All the experimental procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Universidade Federal de Jataí (process number 014/2020), which follows the guidelines for handling animals proposed by the National Council for the Control of Animal Experiments (CONCEA).

Preparation of the experimental diets

Five diets were formulated to meet the minimum requirements for tambaqui with 3,130 Kcal/kg digestible energy and 300 g/kg digestible protein (Guimarães and Martins, 2015; Oliveira, 2019). Potassium phosphate was used as the primary inorganic P source to reach the following dietary AP levels: 4.1, 5.8, 8.0, 9.1, and 10.3 g/kg diet (Araújo et al., 2017). In addition, all diets were supplemented with 5 g/kg of chromium oxide III as an inert digestibility marker for nutrient digestibility evaluation. Limestone was used to adjust the calcium levels and maintain the same Ca:P ratio in all experimental diets (Table 1).

The macro ingredients were weighed and mixed. Then, a premixture with micronutrients was prepared to facilitate incorporation. Oil and water were then added to produce a homogeneous mash. Then, the mash was extruded in a single-screw laboratory extruder (Exteclab, Extec) to obtain pellets suitable for the fish size. Finally, the diets were oven-dried at 55°C for 24 hours and stored in plastic bags at -20°C until used.

Animals, Facilities, and Experimental Design

The experiment followed a completely randomized design with five treatments (dietary available phosphorus levels) and three replications comprising 15 experimental units. A 1000 L-tank containing eight fish was considered the experimental unit.

The fish were acquired from a commercial fish farm and underwent a 15-day adaptation period consuming the control diet (4.1 g/kg of available phosphorus, AP). A homogeneous batch of 128 tambaqui ($395\text{g} \pm 20$) was selected and stocked in 15 1000-L

polyethylene tanks connected to a recirculating water system with physical and biological filtration and temperature control. Water quality parameters were maintained within the optimum range for tambaqui (temperature: $28 \pm 2^\circ\text{C}$; pH: 7; ammonia: 0.25 mg/L; dissolved oxygen: 6 ± 1 mg/L).

Fish were fed to apparent satiation twice daily (08:00 and 16:00), six days a week for 180 days. The feed consumed was recorded daily, while fish were weighed monthly. The following growth parameters were determined: survival rate, final weight (FW), daily feed intake (DFI), daily weight gain (DWG), feed conversion ratio (FCR), phosphorus utilization rate (PUR), and protein efficiency ratio (PER) according to the equations below:

- Daily weight gain (DWG) = (Final weight (g) - Initial weight (g)) / number of days
- Daily feed intake (DFI) = Feed quantity (g) / fish biomass (g) / number of days
- Apparent feed conversion ratio (FCR) = Feed intake (g) / weight gain (g)
- Phosphorus utilization rate (PUR) = [(Weight gain (g) / phosphorus intake (g)) x 100]
- Protein efficiency ratio (PER) = Weight gain (g) / protein intake (g)

The fish were fed the experimental diets supplemented with chromium oxide III three times daily until apparent satiation for digestibility evaluation. The fecal collection was performed by sedimentation, following the modified Guelph system described by (Guimarães et al., 2008) and adapted for tambaqui (da Mota et al., 2015). Fecal samples were collected to obtain the required feces for quadruplicate measurements per test diet. The digestibility trial was only performed to report the P requirement on an available nutrient basis, and, therefore, the data are shown in Appendix 1.

For all experimental procedures, the fish were pre-anesthetized with an alcoholic solution of Eugenol® (0.01 ml/L) (Roubach et al., 2005), and the animals designated for biological sample collection were euthanized by a megadose of the anesthetic (1 ml/L).

Chemical composition

Before the start of the experimental period, six fish were randomly sampled for whole-body composition analysis. At the end of the 180 days, all fish were weighed and sampled for tissue analysis after a 12-hour fasting period. In addition, two fish from each tank were collected for whole-body chemical composition.

The diets and fish samples were analyzed in duplicate for chemical composition. Moisture content was determined by drying in a 105°C oven for 24 hours. Crude protein (N * 6.25) was analyzed using the Kjeldahl method; total lipids were determined using a Soxhlet fat extractor, and ash content was determined by incineration in a muffle furnace at 550°C for 5 hours (AOAC, 2000).

Eight fish from each treatment were dissected to collect operculum bones, head bones, vertebrae, and scales for mineral composition. The bones were washed with deionized water to remove any remaining muscle tissue and then defatted in a chloroform and methanol solution (1:1). The material was dried in an oven for 24 hours following the procedure described by Roy et al. (2002). The samples were then digested with nitric acid and perchloric acid to determine mineral content in the diets, feces, whole body, bones, and scales. After digestion, the extracts were diluted in 50 ml of deionized water, and the phosphorus concentrations were determined by light spectrometry. Calcium (Ca), magnesium (Mg), zinc (Zn), and manganese (Mn) concentrations were determined by atomic absorption spectrometry, following the procedures outlined in AOAC (2000). In addition, the determination of chromium oxide in the diets and feces was performed according to Bremer Neto et al. (2005).

Hematology, blood biochemistry, and enzymes

Blood samples were collected from four fish in each tank at the end of the experimental period. One milliliter syringe coated with EDTA (3.0%) was used for hematological analysis, while another syringe without anticoagulant was used for collecting blood for serum analysis. The blood samples were collected by puncturing the caudal vessel. The serum samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes at four °C and then stored in liquid nitrogen.

For hematological parameters, the total number of erythrocytes and leukocytes were counted using the hemocytometer method in a Neubauer chamber, with 0.01% toluidine blue as a diluent and stain. Hemoglobin concentration was measured using the cyanmethemoglobin method using a photometric determination kit (*Labtest*®). Hematocrit was obtained using a microhematocrit centrifuge at 5000 rpm for five minutes. The following hematometric indices were also calculated: mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration, and mean corpuscular hemoglobin.

The serum samples were thawed in a refrigerator and homogenized to analyze blood chemistry and enzyme activity. Total serum phosphorus and calcium levels, triglycerides, proteins, albumin, and serum alkaline phosphatase were determined using

a photometric kit (Labtest®). All the described variables were analyzed using an automated biochemical analyzer (Wiener lab group, Rosario, Argentina).

The lysozyme activity was determined according to Demers and Bayne (1997) and modified for use with tambaqui serum. The analysis is based on the lysis of *Micrococcus lysodeikticus* suspension, using lysozyme from chicken egg whites as a standard. The concentration of total immunoglobulin (Ig) was determined according to Siwicki et al. (1993) using the total protein kit (Labtest®) following the Biuret methodology. The superoxide dismutase (SOD) activity was quantified using a microplate reader at 570 nm (De Barrios Freitas et al., 2017).

Statistical analysis

All data were checked for normality (Shapiro-Wilk test) and variance homogeneity (Bartlett's test). The data were subjected to analysis of variance, and when significant differences were found ($P < 0.05$), polynomial regression and segmented regression models were tested to estimate the requirement for available phosphorus. For variables that showed a significant quadratic regression model, 95% of the maximum response was used (Ajinomoto, 2012). When no regression models could be fitted, the means were compared using the Student Newman Keuls (SNK) or Duncan multiple range tests for hematological parameters. A significance level of $P \leq 0.05$ was used for all statistical analyses. The data were analyzed using the R software, and graphs were prepared using GraphPad Prism.

Results

Except for phosphorus utilization, which linearly decreased with increasing dietary AP levels ($P < 0.05$), all growth performance parameters were not affected ($P > 0.05$) (Table 2). There was no mortality of the fish during the experimental period.

The increase in available phosphorus levels in the diet only affected the phosphorus digestibility coefficient ($P < 0.05$). However, the phosphorus digestibility coefficient decreased linearly with increasing phosphorus levels in the diet (Appendix 1).

The carcass lipid content decreased linearly in response to dietary phosphorus supplementation. However, the moisture content, ash content, and crude protein in the whole body were not affected ($P > 0.05$) by AP supplementation (Table 3).

The calcium content in the whole body linearly increased until reaching a plateau at 7.84 g/kg AP. In comparison, the highest zinc deposition was observed at the

supplementation level of 8 g/kg ($P < 0.05$). Except for calcium and manganese content in the vertebrae ($P > 0.05$), the other minerals linearly increased with the dietary AP supplementation ($P \leq 0.05$). The phosphorus concentration in the scales was not affected by dietary AP levels ($P > 0.05$). However, the highest Ca, Mg, and Mn deposition in the scales was observed in fish-fed diets containing 9.1 g/kg AP ($P < 0.05$). The Ca:P ratio in the whole body, vertebrae, and scales decreased with increasing dietary AP levels (Table 4).

A segmented linear regression model provided the best fit for the phosphorus concentration in the skull. According to the regression analysis, the estimated requirement for efficient phosphorus deposition in the skull was 8.06 g/kg AP in the diet, respectively (Figure 1).

The dietary AP levels did not affect ($P < 0.05$) any of the hematological parameters in tambaqui (Table 5).

All the blood biochemical parameters were significantly affected ($P < 0.05$) by the dietary AP levels, except for triglycerides (Figure 2C) ($P > 0.05$). Fish fed the diet containing 9.1 g/kg AP showed a higher albumin concentration (Figure 2A). Total serum protein linearly increased in response to dietary AP levels up to 6.06 g/kg (Figure 2B).

Dietary phosphorus levels did not affect the serum phosphorus concentration (Figure 3A, $P > 0.05$). However, alkaline phosphatase activity significantly decreased in all AP-supplemented groups. The highest enzyme activity was observed in fish fed the non-supplemented diet (4.1 g/kg) (Figure 3B). In addition, fish fed the diet containing 9.1 g/kg AP showed a higher serum calcium concentration (Figure 3C).

The segmented linear regression model best fitted to total immunoglobulin data (Figure 4A). Immunoglobulin increased with dietary AP levels and plateaued at 6.17 g/kg diet. Fish-fed diets containing 5.8 g/kg AP showed a decrease in SOD activity ($P < 0.05$), while lysozyme activity was higher in this group (Figure 4B and 4C).

Discussion

Available phosphorus (AP) requirement usually decreases according to the developmental stage of fish (Lellis et al., 2004). In this study, tambaqui in the grow-out stage (± 950 g) fed P-unsupplemented plant-based diets (4.1 g/kg AP) showed average growth and development without any anatomical changes. Higher AP requirements have been reported for other growth stages of tambaqui. For instance, the AP requirement for fry (± 0.51 g) and juveniles (± 17 to 150g) was estimated to be 7.1 (Sousa et al., 2019) and

6.6 g/kg (Menezes et al., 2021), respectively. On the other hand, the lack of effect of P supplementation on fish growth has been reported for tambaqui in the juvenile stage (± 144 g) (Araújo et al., 2017), as well as for other aquacultured fish species such as pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Diemer et al., 2011; Signor et al., 2011), largemouth bass (*Micropterus salmoides*) (Miller et al., 2021), taimen (*Hucho taimen*) (Wang et al., 2017), and Senegalese sole (*Solea senegalensis*) (Salas-Leiton et al., 2017). Although there was no significant difference in feed intake among the tambaqui in this study, larger fish displayed agonistic behavior during feeding. In contrast, smaller ones exhibited submissive responses such as fleeing.

P digestibility was high in all diets, decreasing with increasing levels of total P. Concurrently, the P utilization rate was more efficient in fish-fed low AP levels. Similarly, a previous study observed the same response when feeding tambaqui juveniles (± 144 g) with increasing P levels in plant-based diets (Araújo et al., 2017). It is possible that some fish species, including tambaqui, respond to low P content by developing physiological mechanisms to utilize phytic phosphorus (Pfit) from plant-based ingredients (Araújo et al., 2017; Ellestad et al., 2002; Sugiura, 2018). Additionally, plant-based diets may naturally contain phytase, contributing to the P utilization in some species. Ingredients such as wheat bran, corn, and rice are reported to present enzyme activity (Liu et al., 1998), improving mineral availability and reducing P discharge into the environment. Therefore, we hypothesize that tambaqui in the final rearing stage does not require inorganic P supplementation when fed plant-based diets due to its ability to use phytate-P. This may explain the performance data and the high phosphorus digestibility observed in this study with tambaqui. However, this hypothesis needs further investigation. To our knowledge, no studies have yet evaluated the endogenous phytase activity in tambaqui.

The body composition of fish can be a good indicator of nutrient intake and physiological well-being. In this study, AP supplementation only affected body fat deposition in tambaqui. The increase in body fat deposition in fish fed low levels of dietary phosphorus has been extensively reported (Antony Jesu Prabhu et al., 2013; Sun et al., 2018; Zafar and Khan, 2018; Menezes et al., 2021; Li et al., 2022). The increased adiposity in fish fed low P levels may be a result of decreased β -oxidation, as insufficient inorganic phosphate leads to inhibition of the TCA cycle and accumulation of acetyl-CoA, resulting in lower utilization of lipids as an energy source (Roy and Lall, 2003). It may also be related to increased lipogenesis. Some studies have demonstrated that P

deficiency causes alterations in enzymes of the pentose phosphate pathway in the hepatopancreas of fish (Onishi et al., 1981) and an increase in the activity of enzymes involved in the synthesis of endogenous fatty acids, such as Elov16 and 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase (HMGR) (Lu et al., 2017). These authors argue that the increased adiposity is sustained by protein catabolism. However, in our study, low dietary P levels did not affect the amount of body protein. Similar results were observed in carp (*Carassius auratus gibelio* var. CASIII) (Xie et al., 2017), taimen (*Hucho taimen*) (Wang et al., 2017), and senegalese sole (*Solea senegalensis*) (Salas-Leiton et al., 2017). Additionally, lipid accumulation in P-deficient fish could be related to the impaired function of perilipins. Perilipins are a group of six proteins (PLIN 1-6) involved in lipid droplet biology (Granneman et al., 2017; Londos et al., 2005). In higher vertebrates, perilipins must be phosphorylated to induce lipid catabolism in adipose and muscle tissues (Londos et al., 2005). Therefore, as reported in mammals, P deficiency may impair lipid mobilization in fish. However, perilipins biology has been sparsely studied in fish, and although the genes and proteins have been identified in some fish species, no physiological roles have been demonstrated yet (Granneman et al., 2017).

The accumulation of lipids in fish fed with low levels of phosphorus in the diet can make them more susceptible to lipid peroxidation (Wang et al., 2017; Ye et al., 2016). Oxidative stress caused by lipid peroxidation alters cell permeability and can cause irreversible cellular damage by producing reactive oxygen species (ROS) (Gupta et al., 2023). In this regard, the observed activity of superoxide dismutase (SOD) in tambaqui fish may have contributed to minimizing cellular oxidative damage by eliminating ROS generated from fatty acid peroxidation. SOD is part of a crucial enzymatic system that protects cells from the toxic effects of endogenously generated superoxide radicals (Wen et al., 2015). Besides that, SOD catalyzes the conversion of superoxide radicals into hydrogen peroxide and molecular oxygen (Zafar and Khan, 2018). Therefore, the observed SOD activity in this study may have played a role in mitigating the damage caused by the oxidative degradation of lipids. However, the prevention of lipid peroxidation by dietary phosphorus needs further investigation.

Fish can use body phosphorus reserves to meet metabolic needs (Baeverfjord et al., 2019). To our surprise, the dietary AP levels did not affect phosphorus deposition in the body and scales of the tambaqui in this study. The fish could maintain phosphorus deposition in these tissues after 180 days of diet feeding without AP supplementation. The phosphorus content in the whole body is a relevant indicator of bone health in fish

(Roy and Lall, 2003; Lellis et al., 2004; Fontagné et al., 2009; Antony Jesu Prabhu et al., 2013; Deschamps et al., 2016; Fjellidal et al., 2016; Araújo et al., 2017; Menezes et al., 2021). The ash content in the vertebrae and scales is highly correlated (Deschamps et al., 2016; Menezes et al., 2021). Bones and scales share some regulatory pathways, with scales being highly responsive to dietary phosphorus deficiency (Roy and Lall, 2003; Deschamps et al., 2016). However, tambaqui have various mineralized structures in their body, which may interact with mineral mobilization dynamics (Menezes et al., 2021). Thus, phosphorus stores in scales may only mobilize if these animals lack sufficient phosphorus for vital processes. Despite this, the mechanisms that allow for the differential regulation of bones and scales remain unknown but may be explained by developmental, chronological, and functional particularities (Deschamps et al., 2016), such as the age and sex of the fish and the cellular profile of mineralized structures. Therefore, comparative studies on the dynamics of mineral turnover among mineralized tissues and their relative contribution in response to phosphorus deficiency deserve further investigation.

In the present study, the tissues most affected by low dietary phosphorus levels were the vertebrae, head, and opercular bones. These results were previously observed in tambaqui (Menezes et al., 2021), as well as in other fish species such as *Micropterus salmoides* (Wang et al., 2022), *Melanogrammus aeglefinus* L. (Roy and Lall, 2003), and *Oncorhynchus mykiss* (Deschamps et al., 2016). These bony structures can respond to dietary phosphorus deficiency by releasing phosphorus for vital metabolic functions. However, in this study, the calcium: phosphorus ratio in the vertebrae, head, and opercular bones remained stable. In dietary phosphorus deficiency, calcium phosphate is mobilized from mineralized structures to prioritize metabolic and physiological processes (Baeverfjord et al., 2019). These results are supported by the high levels of plasma alkaline phosphatase in fish-fed diets with low phosphorus levels found in this study. In higher vertebrates, this enzyme is used as an indicator of bone formation, as during bone formation and turnover, osteoblasts secrete high levels of alkaline phosphatase (Sugiura and Ferraris, 2004b).

A recent study with juvenile tambaqui demonstrated that fish-fed diets deficient in AP showed decreased mineralization in various bone structures, primarily affecting the cranial and opercular bones (Menezes et al., 2021). This could be related to multiple mineralized structures in the tambaqui's body, such as scales, serrations, teeth, operculum, and fins. Therefore, phosphorus deficiency affects mineralized tissues differentially based on their physiological and biomechanical roles (Deschamps et al., 2016). This may

explain the utilization of cranial and opercular bones to buffer the phosphorus imbalance in tissues and delay the negative impacts on growth. Additionally, larger fish, such as those in this study, have higher bone density and fully developed mineralized structures in their bodies, including scales, fins, vertebrae, ribs, cranial bones, and operculum (Baeverfjord et al., 2019).

Consequently, the utilization of phosphorus for bone turnover maintenance in these animals may be higher. However, there is no direct correlation between the degree of bone mineralization and bone quality. In salmonids subjected to prolonged dietary phosphorus deficiency, it was observed that even demineralized bone could continue to grow functionally and has the capacity for remineralization (Witten et al., 2018). Furthermore, providing absolute values to identify acceptable levels of mineralization in a particular species would require a standardization of methods for bone tissue analysis (Deschamps et al., 2016). Therefore, further studies are needed to determine how much tissue demineralization may be relevant for species like tambaqui.

Hematology is essential for describing a fish's physiological status and overall health. Like other animals, fish blood is involved in transportation, immune system regulation, and maintaining a stable internal environment (Ye et al., 2016). Nutrition is one of the environmental factors that significantly influence hematology and has a significant impact on normal and pathological organ balance. Deficient or excessive nutrient levels can disrupt fish homeostasis and affect immune function (Fazio, 2019). Although no significant effects on hematological parameters were observed in the present study, the values are within the normal range reported in the literature for tambaqui kept under captive conditions in intensive production systems (Araújo et al., 2017; Menezes et al., 2021; Ranzani-Paiva and Silva-Souza, 2004).

Serum proteins serve as a primary index for evaluating fish's nutritional status, innate immune response, and overall health (Devi et al., 2019; Mazandarani and Hoseini, 2017). Reduced levels of these proteins may be correlated with immunosuppression in fish (Avazeh et al., 2021). In the present study, total serum protein increased to 6.06 g/kg AP, while the highest albumin concentration was observed in fish fed with AP levels of 8 and 9.1 g/kg. This may indicate that fish fed with these AP levels were in a condition of physiological well-being. Similar results were observed previously for tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Araújo et al., 2017; Menezes et al., 2021) and carp (*Arisichthys nobilis*) (Li et al., 2022).

A deficiency of phosphorus (P) has been shown to compromise the immune functions of fish by reducing the function of physical barriers and the activity or content of antimicrobial substances (Chen et al., 2018, 2017; Gupta et al., 2023). The immune function of fish largely depends on antimicrobial substances such as immunoglobulins, lysozyme, and cytokines (Tort et al., 2003). These proteins mediate immune processes such as phagocytosis, opsonization, complement system activation, and pathogen neutralization (Tort et al., 2003). This study observed the highest lysozyme activity in tambaqui-fed diets containing 5.8 and 8 g/kg AP. A similar result was observed for the total immunoglobulin level in tambaqui in this study, which increased to 6.17 g/kg AP. The increase in total immunoglobulins and lysozyme levels is strongly associated with enhanced humoral immunity and disease prevention in fish (Gupta et al., 2023). Therefore, the results observed in this study suggest that a higher AP level in the diet may promote immune response and help prevent infections and diseases in tambaqui when compared to the level needed to maintain average growth.

The serum Pi (inorganic phosphorus) levels of tambaqui in this study were unaffected by AP supplementation. Serum Pi levels are known to reflect recent dietary intake of the mineral rather than the P status of the fish (Antony Jesu Prabhu et al., 2013; Araújo et al., 2017; Menezes et al., 2021). This study established a fasting period of 24 hours before blood collection to minimize this effect. Therefore, the use of serum Pi values has been questioned by some researchers as a reliable response variable to indicate the adequacy of dietary P levels for fish (Roy and Lall, 2003; Yao et al., 2014; Araújo et al., 2017). Altogether, this might have affected the outcomes observed for this parameter in this study.

Conclusions

Based on the findings of this study, we concluded that tambaqui in the grow-out stage could develop adequately without dietary inorganic P supplementation to plant-based diets. A minimum of 4.1 g/kg is needed to maintain growth parameters. However, this leads to higher adiposity in the fish. On the other hand, the phosphorus requirement for maximizing bone mineralization was 10.3 g/kg AP. In comparison, the use of 6.17 g/kg AP appears to be sufficient to promote better immune response parameters such as total serum proteins, lysozyme, and immunoglobulins, thereby influencing the fish's resistance.

Acknowledgments

This research was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG (grant no 201410267000859). We thank Guabi Nutrição e Saúde Animal S.A and CJ Selecta for providing the micronutrient mix and the soy protein concentrate, respectively. We are also thankful for the graduate and undergraduate students that assisted in the samplings throughout the trial. Ludmila L.C. Menezes Ph.D. scholarship was supported by the Coordination of the Improvement of Higher-Level Education (CAPES, Brazil, Grant no 88882.386485/2019-01).

References

- Ajinomoto, A.N., n.d. Estimating amino acid requirements through dose-response experiments in pigs and poultry. AJINOMOTO EUROLYSINE S.A.S.
- Antony Jesu Prabhu, P., Schrama, J.W., Kaushik, S.J., 2013. Quantifying dietary phosphorus requirement of fish - a meta-analytic approach. *Aquac Nutr* 19, 233–249. <https://doi.org/10.1111/anu.12042>
- AOAC, 2000. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists, 17th ed. Virgínia, USA.
- Araújo, J.G., Guimarães, I.G., Mota, C.S., de Paula, F.G., Café, M.B., Pádua, D.M.C., 2017. Dietary available phosphorus requirement for tambaqui, *Colossoma macropomum*, juveniles based on growth, haematology and bone mineralization. *Aquac Nutr* 23, 822–832. <https://doi.org/10.1111/anu.12449>
- Avazeh, A., Adel, M., Shekarabi, S.P.H., Emamadi, H., Dawood, M.A.O., Omid, A.H., Bavarsad, M., 2021. Effects of dietary pomegranate peel meal on the growth performance, blood indices, and innate immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Annals of Animal Science* 21, 233–244. <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0064>
- Baeverfjord, G., Antony Jesu Prabhu, P., Fjellidal, P.G., Albrektsen, S., Hatlen, B., Denstadli, V., Ytteborg, E., Takle, H., Lock, E., Berntssen, M.H.G., Lundebye, A., Åsgård, T., Waagbø, R., 2019. Mineral nutrition and bone health in salmonids. *Rev Aquac* 11, 740–765. <https://doi.org/10.1111/raq.12255>
- Bremer Neto, H., Graner, C.A.F., Pezzato, L.E., Padovani, C.R., 2005. Determinação de rotina do cromo em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida. *Ciência Rural* 35, 691–697. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000300033>

- Bueno, G., Bernal, F., Roubach, R., Skipper Skipper-Horton, J., Sampaio, F., Fialho, N., Bureau, D., 2023. Modeling of waste outputs in the aquatic environment from a commercial cage farm under neotropical climate conditions. *Aquac Environ Interact* 15, 133–144. <https://doi.org/10.3354/aei00457>
- Chen, K., Jiang, W.-D., Wu, P., Liu, Y., Kuang, S.-Y., Tang, L., Tang, W.-N., Zhang, Y.-A., Zhou, X.-Q., Feng, L., 2017. Effect of dietary phosphorus deficiency on the growth, immune function and structural integrity of head kidney, spleen and skin in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol* 63, 103–126. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.02.007>
- Chen, K., Zhou, X.-Q., Jiang, W.-D., Wu, P., Liu, Y., Jiang, J., Kuang, S.-Y., Tang, L., Tang, W.-N., Zhang, Y.-A., Feng, L., 2018. Impaired intestinal immune barrier and physical barrier function by phosphorus deficiency: Regulation of TOR, NF- κ B, MLCK, JNK and Nrf2 signalling in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) after infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 74, 175–189. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.060>
- da Mota, C.S., Araújo, J.G., Pádua, D.M.C., Martins, G.P., Guimarães, I.G., 2015. Testing various faeces-collecting methods to improve digestibility studies with tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816). *Journal of Applied Ichthyology* 31, 102–109. <https://doi.org/10.1111/jai.12970>
- De Barrios Freitas, R., Melato, F.A., Oliveira, J.M. de, Bastos, D.S.S., Cardoso, R.M., Leite, J.P.V., Lima, L.M., 2017. Euterpe edulis effects on cardiac and renal tissues of Wistar rats fed with cafeteria diet. *Nutr Hosp* 34, 186. <https://doi.org/10.20960/nh.996>
- Demers, N.E., Bayne, C.J., 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Dev Comp Immunol* 21, 363–373. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(97\)00009-8](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(97)00009-8)
- Deschamps, M.-H., Poirier Stewart, N., Demanche, A., Vandenberg, G.W., 2016. Preliminary study for description of bone tissue responsiveness to prolonged dietary phosphorus deficiency in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac Res* 47, 900–911. <https://doi.org/10.1111/are.12549>
- Devi, G., Harikrishnan, R., Paray, B.A., Al-Sadoon, M.K., Hoseinifar, S.H., Balasundaram, C., 2019. Effects of aloe-emodin on innate immunity, antioxidant and immune cytokines mechanisms in the head kidney leucocytes of *Labeo rohita* against *Aphanomyces invadans*. *Fish Shellfish Immunol* 87, 669–678. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.006>
- Diemer, O., Boscolo, W.R., Signor, A.A., Sary, C., Neu, D.H., Feiden, A., 2011. NÍVEIS DE FÓSFORO TOTAL NA ALIMENTAÇÃO DE JUVENIS DE JUNDIÁ CRIADOS EM TANQUES-REDE. *Pesqui Agropecu Trop* 41. <https://doi.org/10.5216/pat.v41i4.15017>

- Ellestad, L.E., Angel, R., Soares, Jr., J.H., 2002. Intestinal phytase II: A comparison of activity and in vivo phytate hydrolysis in three teleost species with differing digestive strategies. *Fish Physiol Biochem* 26, 259–273. <https://doi.org/10.1023/A:1026231624543>
- Fazio, F., 2019. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. *Aquaculture* 500, 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>
- Fjellidal, P.G., Hansen, T.J., Lock, E.-J., Wargelius, A., Fraser, T.W.K., Samba, F., El-Mowafi, A., Albrektsen, S., Waagbø, R., Ørnsrud, R., 2016. Increased dietary phosphorous prevents vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac Nutr* 22, 72–90. <https://doi.org/10.1111/anu.12238>
- Fontagné, S., Silva, N., Bazin, D., Ramos, A., Aguirre, P., Surget, A., Abrantes, A., Kaushik, S.J., Power, D.M., 2009. Effects of dietary phosphorus and calcium level on growth and skeletal development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Aquaculture* 297, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.09.022>
- Granneman, J.G., Kimler, V.A., Zhang, H., Ye, X., Luo, X., Postlethwait, J.H., Thummel, R., 2017. Lipid droplet biology and evolution illuminated by the characterization of a novel perilipin in teleost fish. *Elife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.21771>
- Green, J.A., Brannon, E.L., Hardy, R.W., 2002. Effects of dietary phosphorus and lipid levels on utilization and excretion of phosphorus and nitrogen by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2. Production-scale study. *Aquac Nutr* 8, 291–298. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2002.00217.x>
- Guimarães, I.G., Martins, G.P., 2015. Nutritional requirement of two Amazonian aquacultured fish species, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) and *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818): a mini review. *Journal of Applied Ichthyology* 31, 57–66. <https://doi.org/10.1111/jai.12976>
- Guimarães, I.G., Pezzato, L.E., Barros, M.M., 2008. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquac Nutr* 14, 396–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00540.x>
- Gupta, S.K., Gupta, A., Sarkar, B., Gupta, R., Kumar, M., Kumari, A., Foysal, Md.J., 2023. Pomegranate (*Punica granatum*) peel extract supplementation in diet influences growth performance, haemato-immunological responses and cytokine expression in pathogen-aggravated *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture* 562, 738823. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738823>
- Lellis, W.A., Barrows, F.T., Hardy, R.W., 2004. Effects of phase-feeding dietary phosphorus on survival, growth, and processing characteristics of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 242, 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.016>

- Li, M., Zhang, L., Hu, B., Liu, L., Huang, F., Tian, J., Hu, X., Wang, Y., 2022. Dietary phosphorus requirement for juvenile bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Aquaculture International* 30, 1675–1692. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00834-6>
- Liu, B.-L., Rafiq, A., Tzeng, Y.-M., Rob, A., 1998. The Induction and Characterization of Phytase and Beyond. *Enzyme Microb Technol* 22, 415–424. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00210-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00210-X)
- Londos, C., Sztalryd, C., Tansey, J.T., Kimmel, A.R., 2005. Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie* 87, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.12.010>
- Lu, K.-L., Ji, Z.-L., Rahimnejad, S., Zhang, C.-X., Wang, L., Song, K., 2017. De novo assembly and characterization of seabass *Lateolabrax japonicus* transcriptome and expression of hepatic genes following different dietary phosphorus/calcium levels. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 24, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2017.08.001>
- Mazandarani, M., Hoseini, S.M., 2017. Anaemia and plasma lipid profile in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient copper sulphate and nano-scale copper oxide. *Aquac Res* 48, 844–852. <https://doi.org/10.1111/are.12928>
- Menezes, L.L.C., Santos, J.G.A., Guimarães, I.G., Padua, D.M.C., Machado, V.M. V., Souto, C.N., 2021. A new approach for quantifying phosphorus requirement in *Colossoma macropomum* using CT scanning. *Aquac Nutr* 27, 1798–1810. <https://doi.org/10.1111/anu.13317>
- Miller, K.K., Rossi, W., Habte-Tsion, H., 2021. Assessment of total dietary phosphorus requirement of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*, using soybean meal-based diets: Effects on production performance, tissue mineralization, physiological parameters in plasma and intestine and expression of head-kidney genes. *Aquac Nutr* 27, 116–128. <https://doi.org/10.1111/anu.13169>
- Moody, E.K., Corman, J.R., Elser, J.J., Sabo, J.L., 2015. Diet composition affects the rate and N:P ratio of fish excretion. *Freshw Biol* 60, 456–465. <https://doi.org/10.1111/fwb.12500>
- Morales, G.A., Moyano, F.J., 2010. Application of an in vitro gastrointestinal model to evaluate nitrogen and phosphorus bioaccessibility and bioavailability in fish feed ingredients. *Aquaculture* 306, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.014>
- NRC, 2011. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academies Press, Washington, D.C. <https://doi.org/10.17226/13039>
- Oliveira, L.N., 2019. Estimativa das exigências energéticas e proteicas para o tambaqui (*Colossoma macropomum*, cuvier 1818) por meio de diferentes abordagens nutricionais. Programa de Pós Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Goiás Goiás.

- Onishi, T., Takeuchi, M., Suzuki, M., 1981. Change in Carp Hepatopancreatic Enzyme Activities With Dietary Phosphorus Levels. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 47(3), 353–357.
- Ranzani-Paiva, M.T.J., Silva-Souza, A.T., 2004. *Hematologia de Peixes Brasileiros*.
- Roubach, R., Gomes, L.C., Leao Fonseca, F.A., Val, A.L., 2005. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquac Res* 36, 1056–1061. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01319.x>
- Roy, P.K., Lall, S.P., 2003. Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Aquaculture* 221, 451–468. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00065-6)
- Roy, P.K., Witten, P.E., Hall, B.K., Lall, S.P., 2002. Effects of dietary phosphorus on bone growth and mineralisation of vertebrae in haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Fish Physiol Biochem* 27, 35–48. <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000021778.99011.ce>
- Salas-Leiton, E., Dias, J., Gavaia, P., Amoedo, A., Valente, L.M.P., 2017. Optimization of phosphorus content in high plant protein practical diets for Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) juveniles: influence on growth performance and composition of whole body and vertebrae. *Aquac Nutr* 23, 18–29. <https://doi.org/10.1111/anu.12354>
- Signor, A.A., Feiden, A., Bittencourt, F., Potrich, F.R., Deparis, A., Boscolo, W.R., 2011. Fósforo na alimentação de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 40, 2646–2650. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011001200005>
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Strodladowego, W.I.R., 1993. Nonspecific defence mechanisms assay in fish II; Potential killing activity of neutrophils and manocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum, in: Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Waluga, J. (Eds.), *Fish Disease Diagnosis and Preventions Methods*. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodladowego, Olsztyn, Poland, pp. 105–111.
- Sousa, T.J.R., Bomfim, M.A.D., Ribeiro, F.B., Takishita, S.S., Costa, D.D.C. DA, 2019. PHOSPHORUS REQUIREMENT OF TAMBAQUI FINGERLINGS. *Revista Caatinga* 32, 795–804. <https://doi.org/10.1590/1983-21252019v32n324rc>
- Sugiura, S.H., 2018. Phosphorus, Aquaculture, and the Environment. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 26, 515–521. <https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1471040>
- Sugiura, S.H., Ferraris, R.P., 2004a. Contributions of different NaPi cotransporter isoforms to dietary regulation of P transport in the pyloric caeca and intestine of rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 207, 2055–2064. <https://doi.org/10.1242/jeb.00971>
- Sugiura, S.H., Ferraris, R.P., 2004b. Dietary phosphorus-responsive genes in the intestine, pyloric caeca, and kidney of rainbow trout. *American Journal of Physiology-Regulatory*,

Integrative and Comparative Physiology 287, R541–R550.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00225.2004>

- Sun, Y., Li, B., Zhang, X., Chen, M., Tang, H., Yu, X., 2018. Dietary available phosphorus requirement of crucian carp, *Carassius auratus*. *Aquac Nutr* 24, 1494–1501. <https://doi.org/10.1111/anu.12686>
- Tort, L., Balasch, J., Mackenzie, S., 2003. Fish Immune System. A crossroads between innate and adaptive responses. *Immunologia* 22, 277–286.
- Wang, C., Li, J., Wang, L., Zhao, Z., Luo, L., Du, X., Yin, J., Xu, Q., 2017. Effects of dietary phosphorus on growth, body composition and immunity of young taimen *Hucho taimen* (Pallas, 1773). *Aquac Res* 48, 3066–3079. <https://doi.org/10.1111/are.13138>
- Wang, P., Li, X., Xu, Z., Ji, D., He, M., Dang, J., Leng, X., 2022. The digestible phosphorus requirement in practical diet for largemouth bass (*Micropterus salmoides*) based on growth and feed utilization. *Aquac Fish* 7, 632–638. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.11.002>
- Wen, J., Jiang, W., Feng, L., Kuang, S., Jiang, J., Tang, L., Zhou, X., Liu, Y., 2015. The influence of graded levels of available phosphorus on growth performance, muscle antioxidant and flesh quality of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Animal Nutrition* 1, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.05.004>
- Witten, P.E., Fjellidal, P.G., Huysseune, A., McGurk, C., Obach, A., Owen, M.A.G., 2018. Bone without minerals and its secondary mineralization in Atlantic salmon (*Salmo salar*): the recovery from phosphorus deficiency. *Journal of Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1242/jeb.188763>
- Xie, D., Han, D., Zhu, X., Yang, Y., Jin, J., Liu, H., Xie, S., 2017. Dietary available phosphorus requirement for on-growing gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). *Aquac Nutr* 23, 1104–1112. <https://doi.org/10.1111/anu.12478>
- Yao, Y.F., Jiang, M., Wen, H., Wu, F., Liu, W., Tian, J., Yang, C.G., 2014. Dietary phosphorus requirement of GIFT strain of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* reared in freshwater. *Aquac Nutr* 20, 273–280. <https://doi.org/10.1111/anu.12075>
- Ye, C.-X., Wan, F., Sun, Z.-Z., Cheng, C.-H., Ling, R.-Z., Fan, L.-F., Wang, A.-L., 2016. Effect of phosphorus supplementation on cell viability, anti-oxidative capacity and comparative proteomic profiles of puffer fish (*Takifugu obscurus*) under low temperature stress. *Aquaculture* 452, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.039>
- Zafar, N., Khan, M.A., 2018. Determination of dietary phosphorus requirement of stinging catfish *Heteropneustes fossilis* based on feed conversion, growth, vertebrae phosphorus, whole body phosphorus, haematology and antioxidant status. *Aquac Nutr* 24, 1577–1586. <https://doi.org/10.1111/anu.12794>

Tables**Table 1.** Experimental diets and chemical composition of the experimental feeds.

Ingredients (g/kg)	Diets				
	4.1	5.8	8	9.1	10.3
Soyben meal	287.00	287.00	287.00	287.00	287.00
Cronmeal	165.00	165.00	165.00	165.00	165.00
Soy protein concentrate	151.50	151.50	151.50	151.50	151.50
Rice bran	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
Wheat bran	95.50	95.50	95.50	95.50	95.50
Corn gluten meal	76.20	76.20	76.20	76.20	76.20
Cellulose	18.30	18.30	18.30	18.30	18.30
Vitamin C	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
NaCl	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
L-Lysine	3.90	3.90	3.90	3.90	3.90
DL-Methionine	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
Tryptophan	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
Vitamin/mineral premix ¹	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
BHT ²	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Soybean oil	16.20	16.20	16.20	16.20	16.20
Limestone	2.30	7.00	11.90	16.80	21.70
Kaolin	78.30	63.50	48.10	32.70	17.30
Potassium phosphate	0.00	10.10	20.60	31.10	41.60
Chemical composition (g/kg of dry matter)					
Crude protein	323.23	342.04	358.33	342.04	324.35
Digestible protein ³	304.96	307.36	295.94	311.57	273.49
Fat	46.26	50.76	50.86	53.76	49.71
Ash	121.85	122.14	127.42	132.68	157.98
Calcium	7.2	10.3	11.6	16.5	18.1
Total phosphorus	4.91	7.05	9.58	11.45	13.46
Available phosphorus ³	4.10	5.78	7.98	9.05	10.34
Ca:P ratio	1.47	1.46	1.21	1.44	1.34

¹ Guaranteed levels of the Supplement (IU or mg/kg diet): vitamin A, 16060; vitamin D3, 4510; vitamin E (DL- α tocopherol), 250; vitamin K (menadione sodium bisulfite), 30; thiamine, 32; riboflavin, 32; Ca-D-pantothenate, 80; niacin, 170; biotin, 10; folic acid, 10; cyanocobalamin, 0.032; pyridoxine, 32; Na₂SeO₃, 0.7; MnO, 50; ZnO, 150; FeSO₄, 150; CuSO₄, 20; CoSO₄, 0.5; I₂Ca, 1.0 (Guabi Nutrição Animal Ltda).

² Butylated hydroxytoluene - antioxidant

³ Values obtained from the analyzed total P values and the digestibility coefficients of P obtained in the digestibility trial (appendix 1)

Table 2. Apparent digestibility coefficients (ADC) of dry matter, crude protein and phosphorus of tambaqui fed diets containing graded levels of available phosphorus (AP) (n = 8).

Variables	Dietary AP levels (g kg ⁻¹)					P value
	4.1	5.8	8.0	9.1	10.3	
Dry matter (%)	66.63	67.21	64.72	61.86	65.00	0.34
	±2.2	±0.9	±0.5	±0.7	±0.4	
Crude protein (%)	94.35	89.70	82.59	91.09	79.90	0.93
	±0.9	±0.6	±0.4	±1.04	±1.3	
Total phosphorus (%)¹	83.48	81.89	83.35	79.07	76.79	0.014
	±1.4	±0.6	±0.8	±2.6	±1.3	

¹Broken line linear= 53.25688-0.0073558x (R²= 0.94)

Table 3. Final weight, daily feed intake, daily weight gain, feed conversion ratio, phosphorus utilization rate and protein efficiency rate of tambaqui fed diets containing graded available P (AP) levels for 180 days.

Variables	Dietary AP levels (g kg ⁻¹)					P value
	4.1	5.8	8	9.1	10.3	
Final weight(g)	911.94 ±48.76	986.22 ±66.61	932.08 ±10.96	936.44 ±56.14	927.32 ±47.86	0.5233
Daily feed intake(g)	7.64 ±0.21	7.85 ±0.22	8.26 ±0.03	8.16 ±0.05	8.34 ±0.56	0.0938
Daily weight gain(g)	2.93 ±0.25	3.26 ±0.44	3.13 ±0.19	3.03 ±0.34	3.02 ±0.18	0.7413
Feed conversion ratio(g/g)	1.98 ±0.04	1.92 ±0.21	2.11 ±0.09	1.93 ±0.11	1.95 ±0.30	0.822
Phosphorus utilization rate¹ (%)	1.75 ±0.14	1.34 ±0.16	0.89 ±0.06	0.76 ±0.08	0.66 ±0.07	<0.001
Protein efficiency rate (%)	2.22 ±0.18	2.23 ±0.27	2.01 ±0.13	2.03 ±0.22	2.24 ±0.24	0.5993

Means in a row followed by the same superscript letter are not statistically different by SNK multiple range test (P > 0.05)

¹Linear= 2.421087-0.177693x (R²= 0.92)

Table 4. Whole-body chemical composition (dry matter basis) of tambaqui fed de tambaquis fed diets containing graded available P (AP) levels for 180 days (n=8).

Variables (g kg ⁻¹)	Dietary AP levels (g kg ⁻¹)					P value
	4.1	5.8	8	9.1	10.3	
Moisture	624.90 ±14.06	621.27 ±17.84	606.95 ± 21.13	629.23 ±6.22	641.37 ±6.26	0.0525
Ash	112.37 ±7.61	115.40 ±10.04	111.01 ±26.52	105.40 ±9.89	113.48 ±13.07	0.9232
Protein	329.68 ±72.03	347.21 ±53.75	359.45 ±61.20	316.38 ±39.13	328.24 ±60.49	0.7569
Fat¹	378.26 ±53.88	286.11 ±50.85	255.51 ±30.96	204.50 ±24.16	193.72 ±29.46	<0.001

Means in a row followed by the same superscript letter are not statistically different by SNK multiple range test (P > 0.05)

¹Linear: Whole-body fat= 478.3865-28.7892x (R²=0.71)

Table 5. Whole-body, vertebrae and scales mineral composition of tambaqui fed de tambaquis fed diets containing graded available P (AP) levels for 180 days (n=8).

Variable	Dietary AP levels (g kg ⁻¹)					P value
	4.1	5.8	8	9.1	10.3	
Whole-body						
Phosphorus (g kg ⁻¹)	18.06 ± 6.5	26.23 ± 8.3	32.83 ± 10.7	28.09 ± 2.7	36.11 ± 10.3	0.1276
Calcium (g kg ⁻¹) ¹	35.03 ± 10.7	51.94 ± 3.2	74.86 ± 13.1	43.15 ± 11.1	41.12 ± 10.3	<0.001
Ca:P ratio	1.94	1.98	2.28	1.54	1.14	0.1940
Magnesium (g kg ⁻¹)	3.07 ± 1.9	3.30 ± 0.3	3.88 ± 0.7	2.64 ± 0.7	2.32 ± 0.7	0.2933
Zinc (mg kg ⁻¹)	0.06 ^{ab} ± 0.01	0.06 ^{ab} ± 0.01	0.08 ^a ± 0.03	0.03 ^b ± 0.02	0.05 ^{ab} ± 0.03	0.0337
Manganese (mg kg ⁻¹)	0.19 ± 0.07	0.26 ± 0.03	0.31 ± 0.04	0.25 ± 0.07	0.25 ± 0.08	0.1391
Vertebrae						
Phosphorus(g kg ⁻¹)	180.72 ^c ± 22.1	204.65 ^b ± 24.2	208.31 ^b ± 11.8	213.52 ^b ± 20.5	231.03 ^a ± 21.8	<0.001
Calcium(g kg ⁻¹)	238.05 ± 46.6	226.10 ± 48.4	229.31 ± 51.5	213.29 ± 52.2	226.87 ± 41.6	0.8125
C:P ratio	1.41	1.30	1.25	1.23	1.33	0.1352
Magnesium(g kg ⁻¹)	25.76 ^{ab} ± 8	21.03 ^b ± 2.4	27.59 ^{ab} ± 12.3	23.31 ^{ab} ± 4.8	32.02 ^a ± 8.2	0.0130
Zinc(mg kg ⁻¹)	0.54 ^{ab} ± 0.08	0.46 ^b ± 0.07	0.46 ^b ± 0.11	0.46 ^b ± 0.11	0.55 ^a ± 0.14	0.0403
Manganese(mg kg ⁻¹)	1.62	1.35	1.70	1.30	1.59	0.2488

	± 0.7	± 0.2	± 0.7	± 0.2	± 0.6	
Scale						
Phosphorus(g kg ⁻¹)	168.41 ± 21.3	174.49 ± 17.3	182.99 ± 19.7	172.98 ± 11.8	170.20 ± 8.8	0.2021
Calcium(g kg ⁻¹)	175.91 ^b ± 30.3	226.56 ^b ± 51.1	168.46 ^b ± 25.8	281.70 ^a ± 70.3	187.96 ^b ± 33.8	<0.001
C:P ratio	1.04	1.30	0.92	1.63	1.10	0.1044
Magnesium(mg kg ⁻¹)	35.72 ^{ab} ± 13.8	33.74 ^{ab} ± 17.9	21.09 ^c ± 6.5	46.47 ^a ± 19.4	32.90 ^b ± 5.4	<0.001
Zinc(mg kg ⁻¹)	3.06 ^{bc} ± 0.6	3.90 ^{ab} ± 1.2	2.36 ^c ± 1.6	4.57 ^a ± 1.1	2.87 ^{bc} ± 0.7	<0.001
Manganese(mg kg ⁻¹)	0.08 ^a ± 0.03	0.08 ^a ± 0.03	0.04 ^c ± 0.02	0.08 ^{ab} ± 0.02	0.06 ^{bc} ± 0.01	<0.001

Means in a row followed by the same superscript letter are not statistically different by SNK multiple range test ($P > 0.05$)

¹ Broken line linear effect equations: Whole-body calcium= $-5.02205+9.796351x$ ($R^2=0.88$)

Figure

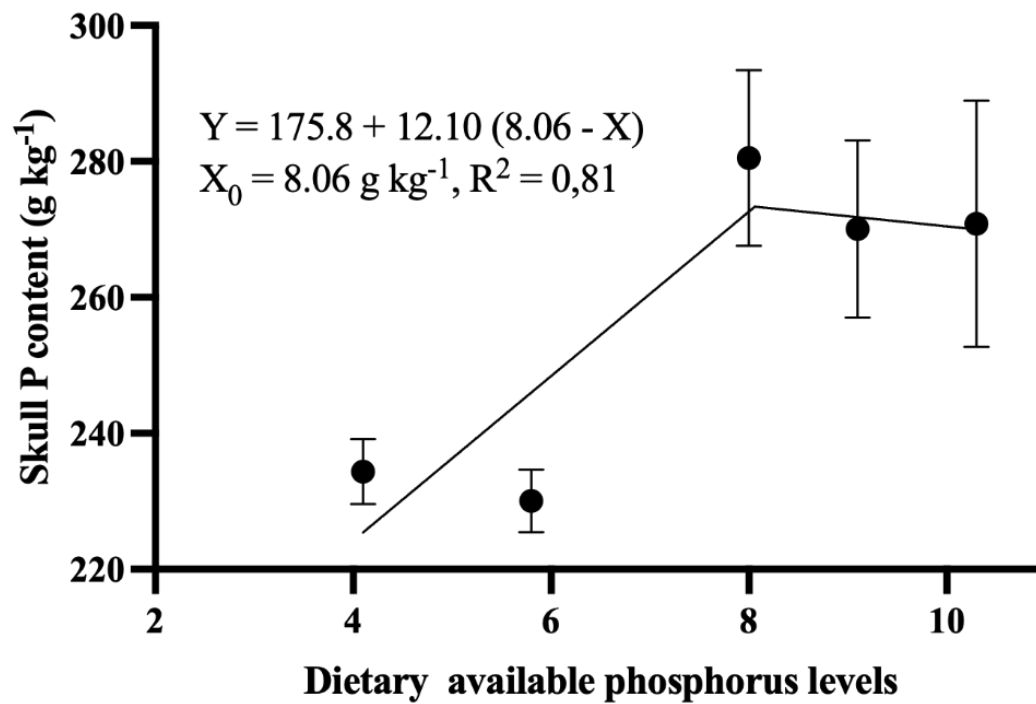


Figure 1. Phosphorus content in the head bones of tambaquis fed with different levels of available phosphorus (n=8)

Broken line linear regression model

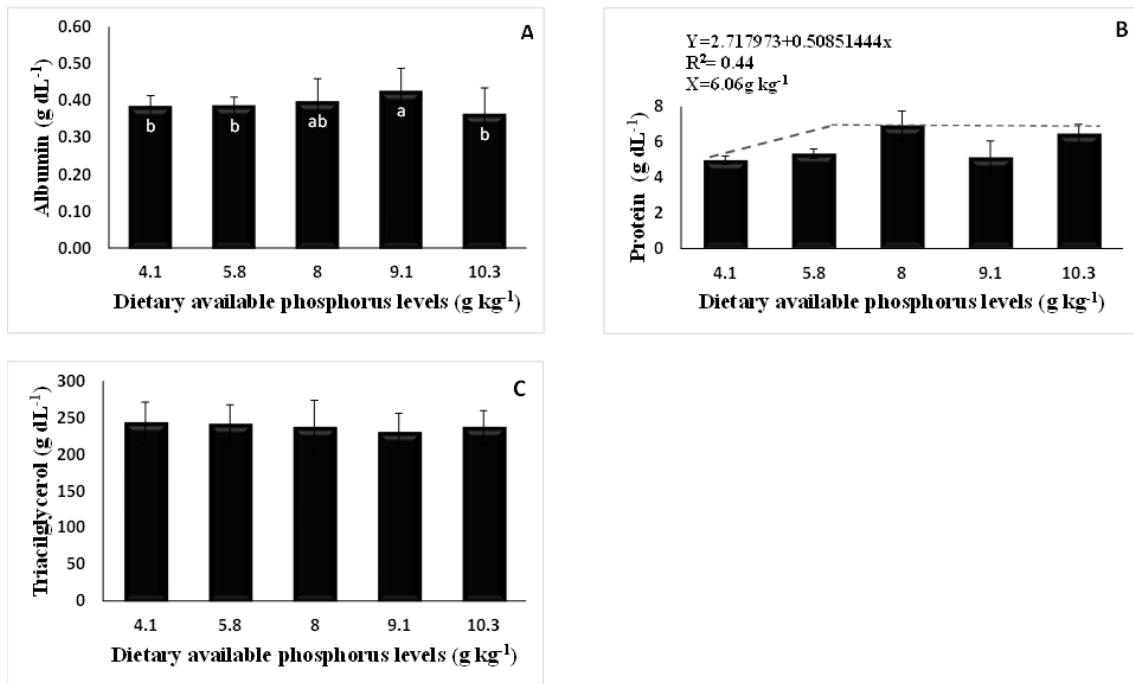


Figure 2. Albumin (A), total proteins (B), triglycerides (C) of tambaquis fed with different levels of available phosphorus (n=12)

Means followed by the same lowercase letter do not differ significantly ($P > 0.05$) according to the Duncan's Broken line linear test.

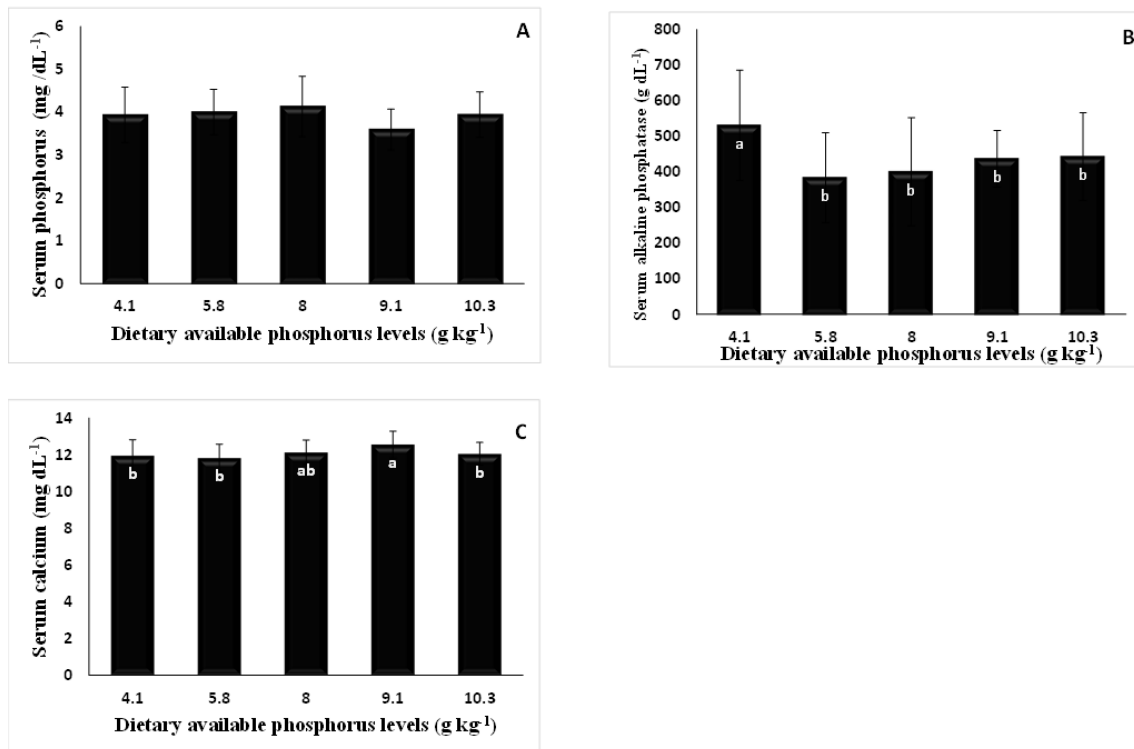


Figure 3. Total serum phosphorus (A), total serum calcium (B), and alkaline phosphatase (C) of tambaquis fed with different levels of available phosphorus (n=12).

Means followed by the same lowercase letter do not differ significantly ($P > 0.05$) according to the Duncan's test.

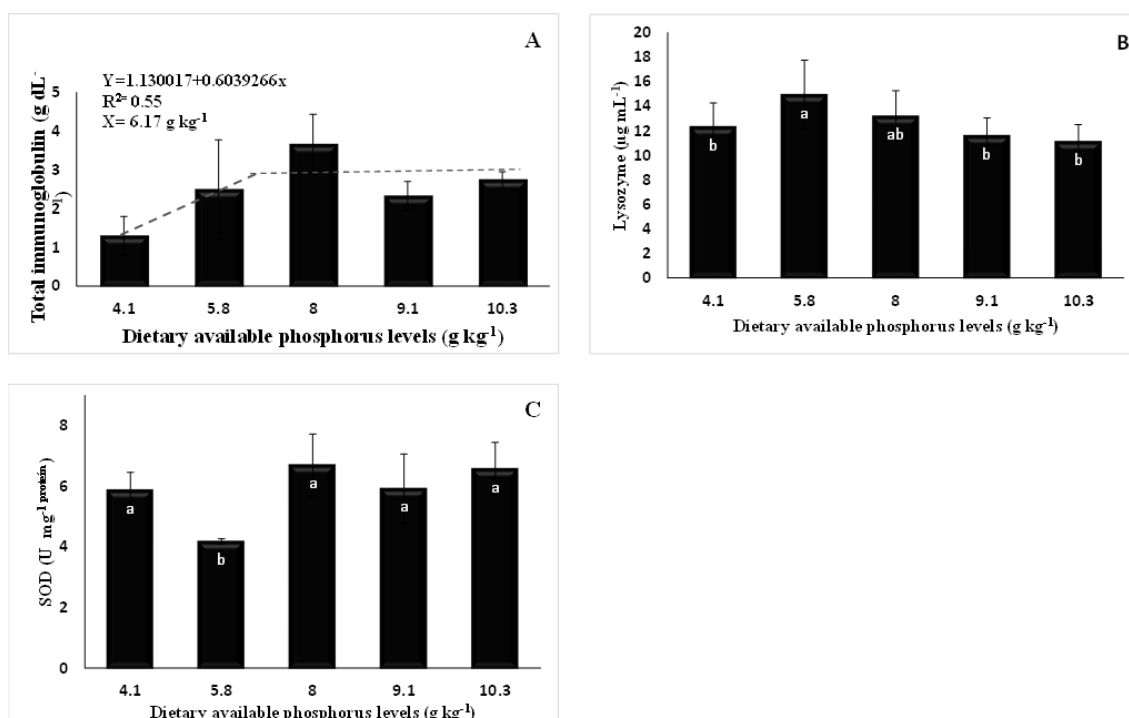


Figure 4. Lysozyme activity (A), total immunoglobulin (B), and SOD (C) of tambaquis fed with different levels of available phosphorus (n=12).

Means followed by the same lowercase letter do not differ significantly ($P > 0.05$) according to the Duncan's Broken line linear test.

Appendix 1

Appendix 1. Apparent digestibility coefficient (ADC) of dry matter, crude protein, and phosphorus in tambaquis fed different levels of available phosphorus in the diet (n = 8)

Variables	Levels of available phosphorus (g/kg)					P value
	4.1	5.8	8.0	9.1	10.3	
ADC dry matter (%)	66.63	67.21	64.72	61.86	65.00	0.34
	±2.2	±0.9	±0.5	±0.7	±0.4	
ADC crude protein (%)	94.35	89.70	82.59	91.09	89.90	0.93
	±0.9	±0.6	±0.4	±1.04	±1.3	
ADC total phosphorus (%) ¹	83.48	81.89	83.35	79.07	76.79	0.014
	±1.4	±0.6	±0.8	±2.6	±1.3	

¹Linear= 53.25688-0.0073558x (R²= 0.94)

Capítulo 3- Artigo adaptado as normas do Journal of Fish Biology

**Perfil de mineralização da carcaça associada a recuperação da
deficiência de fósforo em diferentes espécies de peixes**

Ludmila L.C. Menezes MSc¹, Igo G. Guimarães PhD¹, Vânia M. V. Machado PhD²,
Guilherme Wolf Bueno PhD³, Crístielle N. Souto PhD¹

¹ Laboratório de Pesquisa em Aquicultura, Universidade Federal de Goiás – Regional
Jataí, Campus cidade universitária, 75801-615 Jataí, GO, CP 03, Brazil

² Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Universidade Estadual
Paulista- Campus Botucatu, 18618000 - Botucatu, SP - Brasil

³ Innovation Agency – Universidade Estadual de Paulista, 11900-000 São Paulo, SP-
Brazil

Corresponding author: Ludmila L. C. Menezes. Tel: (+55) 64-3606-8284; Email:
ludmilamenezes@discente.ufg.br

Resumo

Objetivou-se descrever as estruturas mineralizadas de três espécies de peixes alimentadas com níveis de fósforo disponível (Pdisp.), avaliar a mobilização de minerais e bem-estar fisiológico dessas espécies após um período prolongado de deficiência de fósforo dietético seguido de reestabelecimento de fornecimento do mineral. Para isso, foi realizado um experimento dividido em duas fases. A fase 1 para quantificação das estruturas mineralizadas e a mobilização de minerais de três espécies de peixes alimentadas com dietas contendo nível de P regular ou dietas deficientes em P. A fase 2 para avaliação do reestabelecimento do fornecimento de fósforo dietético e seu impacto na restauração do bem-estar fisiológico e a composição mineral dos animais. Os peixes foram distribuídos em DIC com três tratamentos (controle = fósforo dietético regular, deficiente = fósforo dietético deficiente, e recuperado = dieta deficiente é substituída pela dieta controle) e nove repetições. Esse delineamento experimental foi aplicado para três espécies de peixes, sendo; tilápia (*Oreochromis niloticus*), pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e o panga (*Pangasius pangasius*). O período experimental teve duração total de 120 dias, em que, nos primeiros 90 dias (Fase 1) os peixes foram alimentados com a dieta controle (fósforo dietético regular) e deficiente (fósforo dietético deficiente) e a partir do dia 91 (Fase 2) os peixes que inicialmente foram alimentados com a dieta deficiente foram alimentados com a dieta controle durante 30 dias. Foi determinada a composição bromatológica do peixe inteiro e conteúdo mineral das estruturas mineralizadas, parâmetros bioquímicos sanguíneos e densitometria óssea. A deficiência de Pdisp. para juvenis de tilápia e pirapitinga resultou no aumento da deposição de gordura corporal. No entanto, após o reestabelecimento do fornecimento de Pdisp. na dieta apenas os juvenis de pirapitinga diminuíram a adiposidade corporal. Para todas as espécies estudadas, os ossos da cabeça foram os mais afetados pela deficiência dietética de Pdisp. A quantidade de minerais nas estruturas mineralizadas da pirapitinga foi pouco afetada pelos níveis de Pdisp. da dieta. Os juvenis de tilápia aumentaram a deposição de minerais nas vertebrae após o reestabelecimento do fornecimento de Pdisp. Enquanto nos juvenis de panga a deposição de minerais no corpo inteiro foi priorizada em relação aos ossos da vertebra. Conclui-se que, os mecanismos de resposta a deficiência de Pdisp. são diferentes entre as espécies estudadas. Os ossos cefálicos são a estrutura preferencialmente utilizada para mobilização de minerais em situações de deficiência de Pdisp. O reestabelecimento do fornecimento de Pdisp. após um longo período de deficiência foi capaz de reestabelecer o bem-estar fisiológico dos peixes avaliados neste estudo.

Palavras- Chave: composição corporal, densitometria óssea, formação óssea, nutrição mineral, peixes teleósteos

Introdução

A estrutura esquelética forma a estrutura básica para o crescimento de um animal saudável. Os minerais são nutrientes essenciais para adequada formação do esqueleto dos vertebrados. Diferente dos vertebrados superiores, os peixes teleósteos podem obter minerais do meio aquático por meio das brânquias, com exceção do fósforo (P), pois apenas uma quantidade mínima de P pode ser obtida através das brânquias e, portanto, sua exigência deve ser suprida via dieta (Antony Jesu Prabhu et al., 2016). Em estudos para avaliação das necessidades dietéticas de P para peixes, mais ênfase é dada ao crescimento somático e as características de desempenho produtivo (Baeverfjord et al., 2019). No entanto, um período prolongado de deficiência de fósforo pode afetar o bem-estar fisiológico, prejudicar a formação óssea e a mineralização da carcaça. Em peixes cultivados, esses processos resultam em ossos com radiodensidade reduzida e osteomalácia (Holm et al., 2020) que podem ocasionar má formação óssea e peixes deformados. A ocorrência de peixes deformados em sistemas de produção preocupa por questões éticas e econômicas. Estes peixes não podem ser considerados em boas condições de bem-estar, pois apresentam baixas taxas de alimentação, taxas de crescimento mais lentas, maior suscetibilidade ao estresse e a patógenos do que indivíduos saudáveis não deformados (Boglione et al., 2013). Além disso, os danos causados por peixes malformados representam importantes perdas econômicas para a produção, pois podem aumentar a mortalidade e resultar em produtos menos aceitáveis para os consumidores (Eissa et al., 2021).

Em situações de deficiência nutricional de P, o tecido esquelético é preferencialmente utilizado para mobilização do mineral, a fim de se priorizar processos metabólicos e fisiológicos (Lall and Lewis-McCrea, 2007). A estrutura óssea possui uma forte capacidade de responder a deficiência de fósforo na dieta. Entretanto, a dinâmica de mobilização de P dos tecidos depende das características anatômicas e morfológicas de cada espécie. Em salmonídeos, as vertebras são as estruturas mais afetadas em situações de deficiência de P (Witten et al., 2019). Em Salmão do atlântico, outros elementos do endosqueleto como os ossos da mandíbula, e esqueleto dérmico como o opérculo e escamas, também podem ser afetadas com igual redução do conteúdo mineral em resposta à baixa ingestão de P na dieta, no entanto, sem consequências para formação óssea (Boglione et al., 2013; Drábiková et al., 2021; Witten et al., 2019). Para espécies que possuem um número maior de estruturas mineralizadas no corpo, como por exemplo, as escamas, serrilha, dentes, opérculo e nadadeiras, a deficiência de P pode afetar os tecidos

mineralizados diferencialmente com base nos papéis fisiológicos e biomecânicos dos tecidos (Deschamps et al., 2016; Menezes et al., 2021; Suarez-Bregua et al., 2021). Em espécies como o Tambaqui, as escamas, ossos craniais e operculares são mais atingidos quando os peixes são alimentados com as dietas deficientes em P, enquanto as vertebras são pouco afetadas (Menezes et al., 2021). Apesar desses animais não apresentarem deformidades ósseas, a principal consequência da deficiência de P é o aumento da adiposidade corporal (Araújo et al., 2018; Menezes et al., 2021). Contudo, os ossos das vertebras e as escamas são preferencialmente utilizados para avaliar o estado de P em peixes (Antony Jesu Prabhu et al., 2016). A escolha desses tecidos, frequentemente, ocorre sem qualquer justificativa particular (Deschamps et al., 2016) ou mesmo não levam em consideração particularidades e as características anatômicas de cada espécie.

Em salmonídeos, as consequências da deficiência de fosforo na formação óssea e mineralização do corpo tem sido amplamente estudada (Baeverfjord et al., 2019). No entanto, para outras espécies de interesse comercial, como a tilápia e espécies tropicais, há escassez de informação sobre a dinâmica de utilização de minerais e as consequências da deficiência de fósforo na formação do esqueleto e deposição de minerais no corpo. Apesar do fósforo ser essencial para o desenvolvimento ósseo, estudos recentes mostram a dissociação entre a formação óssea e a mineralização e sugerem que a deficiência dietética de P pode levar à formação de extensas áreas de osso não mineralizado, embora regularmente estruturado (Drábiková et al., 2021). Além disso, em algumas espécies, as deformidades ósseas ocorrem principalmente nas fases iniciais da vida do animal e se tornam mais pronunciadas a medida que o animal cresce (Cotti et al., 2020). Nesse contexto, não é possível definir se o reestabelecimento do fornecimento de P na dieta, de acordo com a exigência dietética do animal, seria suficiente para regenerar os tecidos e minimizar os danos causados pela deficiência de P. Isso levanta questões sobre até que ponto a desmineralização dos tecidos pode ser relevante para espécies peixes.

Os mecanismos que permitem a regulação diferencial da utilização de minerais dos ossos, corpo inteiro e escamas ainda permanecem desconhecidos, mas podem ser explicados por particularidades de desenvolvimento, cronológicas e funcionais (Deschamps et al., 2016), como: a idade e sexo dos peixes e o perfil celular das estruturas mineralizadas. O entrave é que, em grande parte das espécies aquícolas pouco se sabe sobre as estruturas mineralizadas do corpo e qual o real impacto da mobilização de P dos tecidos em situações de deficiência nutricional. Nesse sentido, o objetivo desse estudo é descrever as estruturas mineralizadas de três espécies de peixes alimentadas com níveis

de fósforo disponível (Pdisp.), avaliar a mobilização de minerais e bem-estar fisiológico dessas espécies após um período prolongado de deficiência de fósforo dietético seguido de reestabelecimento de fornecimento do mineral.

Material e métodos

A pesquisa foi conduzida seguindo as normas propostas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Jataí (processo nº 010/2021). O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Aquicultura – LAPAQ da Universidade Federal de Jataí, Campus jatobá, Jataí-Go.

Esse experimento foi dividido em duas fases experimentais. A primeira fase para avaliar os efeitos de um período prolongado de deficiência de fósforo e a mobilização de minerais de três espécies de peixes, sendo tilápia (*Oreochromis niloticus*), pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e panga (*Pangasius pangasius*), alimentadas com diferentes níveis de fósforo dietético. Na segunda fase, foi avaliado se o restabelecimento do fornecimento de fósforo é capaz de promover a restauração do bem-estar fisiológico e a composição mineral nessas espécies de peixes.

Preparação das dietas experimentais

Duas dietas experimentais foram formuladas para atender as exigências mínimas de cada espécie, sendo 3133 Kcal Kg⁻¹ energia digestível e 330g kg⁻¹ de proteína digestível para tilápia (*O. niloticus*), 3137 Kcal Kg⁻¹ energia digestível e 316g kg⁻¹ de proteína digestível para pirapitinga (*P. brachypomus*) e 3415 Kcal Kg⁻¹ energia digestível e 336g kg⁻¹ de proteína digestível para panga (*P. pangasius*) (NRC, 2011). As dietas foram suplementadas com fosfato potássico (Araújo et al., 2016b) para conter níveis de 6.1, 6.4, e 5.4 kg⁻¹ de Pdisp, respectivamente, sendo consideradas como dieta controle. As dietas deficientes não foram suplementadas com fosfato potássico (tabela 1).

TABELA I. Dietas experimentais e composição química das rações experimentais

Espécie	Dietas					
	<i>O. niloticus</i>		<i>P. brachypomus</i>		<i>P. pangasius</i>	
Ingredientes (g kg ⁻¹)	Controle	Deficiente	Controle	Deficiente	Controle	Deficiente
Farelo de soja	212	212	206	206	169.6	169.6
Fubá de milho	198	198	187	187	213	213

Concentrado proteico de soja	252	252	282.2	282.2	283	283
Quirera de arroz	100	100	90	90	130	130
Farelo de trigo	50	50	50	50	43	43
Glúten de milho	59.8	59.8	60	60	66	66
Celulose	9.4	9.4	21.9	25.8	1	1
Vitamina C	5	5	5	5	5	5
NaCl	5	5	5	5	5	5
L – Lisina	0	0	1.8	1.8	0	0
DL – Metionina	2.2	2.2	6	6	1.8	1.8
Treonina	1.9	1.9	0	0	1	1
Premix Vitam/min ¹	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
BHT ²	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Óleo de soja	28.4	28.4	18	18	38.3	38.3
Calcáreo	16.3	0	17.6	0	13.3	0
Caulim	39.9	75.2	28.3	62.1	13.3	42.2
Fosfato de potássio	19	0	20.1	0	15.6	0
Composição química (g kg⁻¹ de matéria seca)						
Proteína bruta	335.1	329.4	344	335.3	379.6	376.6
Proteína digestível ³	278.9	273.0	244.2	258.3	80.9	111.2
Gordura	55.2	63.2	51.3	45.7	78.6	84.6
Cinzas	130.3	124	131.4	121.4	135.2	98.1
Cálcio total	9.6	3.8	10.2	4.7	4.2	2.7
Fosforo total	18.8	6.3	11.2	5.8	17	9.9
Fosforo disponível ³	17.8	5.9	8.7	5.0	9.0	8.3
Relação Ca:P	0.5	0.6	1.17	0.9	0.5	0.3

1) Níveis de garantia do Suplemento (IU ou mg kg⁻¹ dieta): vitamina A, 16060; vitamina D3, 4510; vitamina E (DL- α tocopherol), 250; vitamina K (menadione sodium bisulphite), 30; tiamina, 32; riboflavina, 32; Ca-D-pantotenato, 80; niacina, 170; biotina, 10; ácido fólico, 10; cyanocobalamin, 0.032; piroxidina, 32, Na₂SeO₃, 0.7; MnO, 50; ZnO, 150; FeSO₄, 150; CuSO₄, 20; CoSO₄, 0.5; I₂Ca, 1.0 (Guabi nutrição animal Ltda).

2) Butil-hidroxi tolueno – antioxidante

3) Valores obtidos a partir dos valores analisados de P total e dos coeficientes de digestibilidade do P obtidos no ensaio de digestibilidade (tabela 2).

Para preparação das dietas os ingredientes foram pesados individualmente e misturados. A fim de facilitar a incorporação dos micronutrientes, foi realizada uma pré mistura e posteriormente adicionado a mistura e homogeneizada. Em seguida, foi adicionado o óleo e a água até que a mistura estivesse homogênea. A mistura foi submetida ao processo de extrusão (Exteclab, Extec) de forma a se obter grânulos condizentes com tamanho da boca do animal. As rações foram secas em estufa de circulação de ar a 55°C durante 24 horas e armazenadas em sacos plásticos a -20°C até serem utilizados.

Ensaio de digestibilidade

Para preparação das dietas experimentais foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item “*Preparação das dietas experimentais*”. Para avaliação da digestibilidade dos nutrientes, todas as dietas experimentais foram acrescidas com 5 g kg⁻¹ do marcador de digestibilidade de óxido de crômio III. A fim de garantir a manutenção do balanceamento dos nutrientes das dietas, o óxido de crômio III foi incluído a partir da substituição da mesma quantidade de caulim (Tabela 1).

Vinte juvenis de cada espécie (40g ±8g) foram estocados aleatoriamente em tanques de 300L montados em sistema de recirculação de água. Este conjunto de tanques foi utilizado para o procedimento de alimentação. Cada dieta experimental foi designada para dois tanques, totalizado quatro unidades experimentais por espécie. Quatro aquários de fundo cônico de 300L foram usados para coleta de fezes por sedimentação, seguindo o procedimento modificado do sistema Guelph descrito por Guimarães, Pezzato, & Barros (2008) (figura 1). Em ambos os sistemas os parâmetros de qualidade da água, como pH, oxigênio dissolvido e amônia foram avaliados diariamente e mantidos dentro da faixa de conforto para as espécies (temperatura: 28 ± 2°C; pH: 7; amônia: 0,25 mg/L; oxigênio dissolvido: 6 ± 1 mg/L). A temperatura da água foi controlada termostaticamente e a oxigenação com auxílio de pedras de porosas.

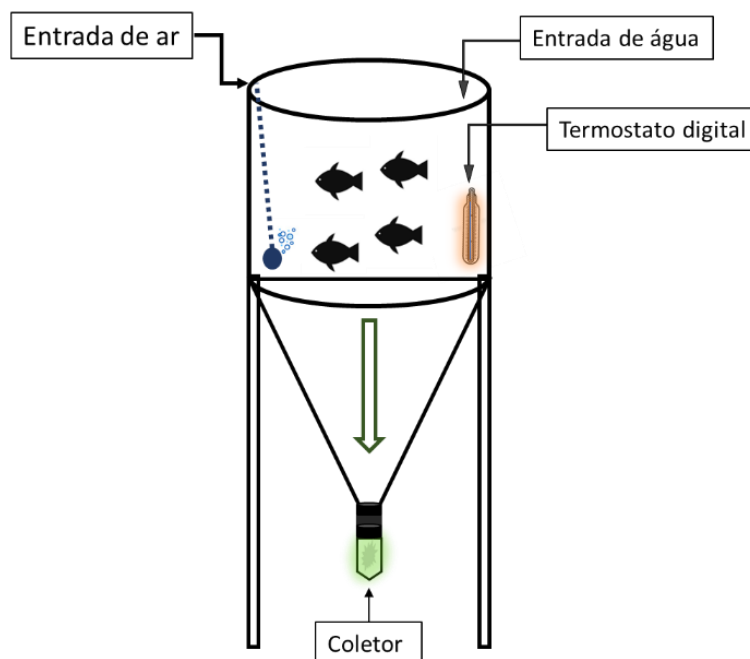


Figura 1. Sistema de coleta de fezes por sedimentação

Durante 15 dias todos os peixes foram alimentados com a dieta controle. Antes do início da coleta de fezes, os peixes foram alimentados com as dietas experimentais durante 7 dias, três vezes ao dia (06h; 12h e 18h) até saciedade aparente.

Para coleta de fezes, duas horas após a primeira alimentação, cinco peixes de cada unidade experimental foram transferidos para os aquários de coleta de fezes, onde permaneceram por 8h. Durante este procedimento, as fezes foram coletadas em intervalos 30 minutos e imediatamente refrigeradas (Da Mota, Araújo, Pádua, Martins, & Guimarães, 2015). Ao final de cada coleta, as fezes foram centrifugadas, individualmente, para retirar o excesso de água, secas em estufa a 65 °C, moídas e armazenadas a -20 °C até a análise química. Os peixes foram então devolvidos ao sistema de alimentação onde permaneceram por 48h até a próxima coleta. Este procedimento foi repetido até se obter a quantidade de fezes necessária para medições quadruplicadas por dieta teste.

Delineamento experimental, Animais e Instalações

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos (controle = fósforo dietético regular, deficiente= fósforo dietético deficiente, e recuperado= dieta deficiente é substituída pela dieta controle) e nove repetições, totalizando 27 unidades experimentais. Cada peixe foi considerado uma unidade experimental. Esse delineamento experimental foi aplicado para três espécies de peixes, sendo, tilápia, pirapitinga e panga.

O período experimental teve duração total de 120 dias, dividido em duas fases. A fase 1 corresponde ao período de 1 a 90 dias. Nessa fase, os peixes foram alimentados com as dietas controle e deficiente. A fase 2, corresponde ao período de 91 a 120 dias. Nessa fase, os peixes que inicialmente foram alimentados com a dieta deficiente são alimentados com a dieta controle durante 30 dias. Esse grupo de peixes foi intitulado como recuperado (Figura 2).

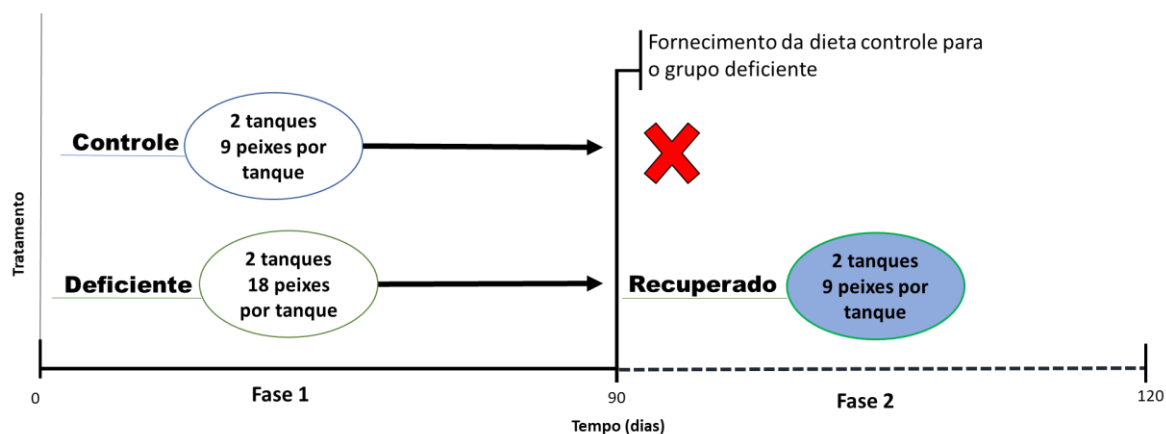


Figura 2. Configuração experimental. Fase 1: de 1 a 90 dias, os peixes são alimentados com a dieta controle e deficiente. Fase 2: de 91 a 120 dias, os peixes do grupo deficiente são alimentados com a dieta controle

Um lote homogêneo de 162 juvenis, sendo 54 unidades de cada espécie, foram adquiridos de pisciculturas comerciais. Inicialmente, os peixes foram ambientados a estrutura experimental durante 10 dias, sendo alimentados com ração comercial. Após esse período, 54 peixes de cada espécie com peso inicial de $20\text{g} \pm 0.5$ (Tilápia), $41\text{g} \pm 2$ (Pirapitinga) e $32.6\text{g} \pm 1$ (Panga) foram selecionados e distribuídos aleatoriamente em 16 tanques de polietileno de 1000l conectados a um sistema de recirculação de água, composto por filtro físico e biológico, luz ultravioleta, controle termostatizado de temperatura e oxigenação individual por caixa. Os parâmetros de qualidade da água, como pH, oxigênio dissolvido e amônia foram avaliados diariamente e mantidos dentro da faixa de conforto para as espécies (temperatura: $28 \pm 2^\circ\text{C}$; pH: 7; amônia: $0,25\text{ mg/L}$; oxigênio dissolvido: $6 \pm 1\text{ mg/L}$). Durante 120 dias os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, duas vezes ao dia (08h e 16h).

Para os procedimentos experimentais de pesagem e coleta de sangue, os peixes foram previamente anestesiados com solução alcoólica de Eugenol® (0.1 ml de anestésico / 1L de água) e os animais destinados à coleta de tecidos foram abatidos por aprofundamento do plano anestésico (Roubach, Gomes, Fonseca, & Val, 2005).

Composição centesimal

Antes do início do período experimental, seis peixes de cada espécie foram amostrados aleatoriamente para análise da composição do corpo inteiro. Ao final dos 30, 90 e 120 dias, após jejum de 12 horas, todos os peixes foram pesados e três peixes de cada tratamento foram coletados para análises de composição centesimal e de minerais do corpo inteiro. Para as análises de composição centesimal de corpo inteiro, os peixes foram acondicionados em sacos para autoclave e autoclavados a 121°C, 1,0kgf/cm², durante 20 minutos (Primatec, CSA-300), homogeneizados e armazenados a -20 °C até a análise química.

As rações e as amostras de corpo inteiro foram analisadas em duplicatas para a composição centesimal. A umidade foi determinada em estufa de 105°C durante 24 horas, a proteína bruta (N* 6,25) pelo método de Kjeldahl, os lipídios totais extraídos numa solução de éter etílico e éter petróleo (1:1) a 50°C, e as cinzas por incineração em forno mufla a 550°C durante 5 horas(AOAC, 2000).

Para análise de minerais, quatro peixes de cada tratamento foram dissecados para coleta de escamas ou nadadeiras e ossos. A coleta de escamas foi realizada nos exemplares de tilápia e pirapitinga, a partir da raspagem de toda extensão do corpo com auxílio de lâmina histológica. Para o panga, procedeu-se a coleta das nadadeiras dorsal, peitoral, pélvica e anal, com auxílio de tesoura cirúrgica reta (figura 3).

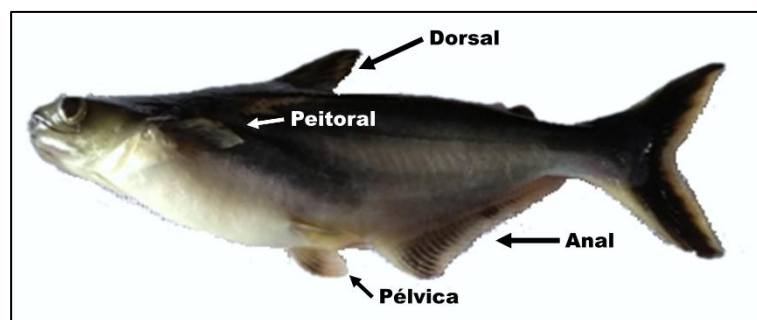


Figura 3. Locais considerados para coleta de nadadeiras de juvenis de panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta

Os peixes foram dissecados e procedeu-se a coleta dos ossos da cabeça e vertebras. Os ossos foram lavados com água deionizada para remover o tecido muscular remanescente e desengorduradas numa solução de clorofórmio e metanol (1:1). O material foi seco em estufa durante 24 h, moído e armazenado a -20 °C até a análise química (Roy, Witten, Hall, & Lall, 2002).

Para determinação do conteúdo mineral, amostras de rações, fezes, corpo inteiro, ossos, escamas e nadadeiras foram digeridas com solução de ácido nítrico e perclórico.

Após a digestão, os extratos foram diluídos em 50 ml de água deionizada e determinadas as concentrações de fósforo por espectrometria de luz e, para o, Ca, Mg, Zn e Mn por espectrometria de absorção atômica de acordo com (AOAC, 2000). O óxido de crômio das dietas e das fezes foi determinado de acordo com (Bremer Neto, Graner, Pezzato, & Padovani (2005).

Parâmetros bioquímicos sanguíneos

Nos dias 30, 90 e 120, três peixes de cada tratamento tiveram sangue coletado com auxílio de seringa de 1mL banhada com EDTA (3,0%) por meio de punção do vaso caudal. As amostras foram imediatamente centrifugadas a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C, e as amostras de soro foram armazenadas a -80 °C em nitrogênio líquido.

Para as análises de bioquímica sanguínea as amostras de soro foram descongeladas a 8°C e homogeneizadas. O nível de fósforo e cálcio sérico total, triglicerídeos, colesterol, proteínas totais, albumina e fosfatase alcalina sérica foram determinados utilizando-se kit de determinação fotolorimétrica (*Bioclin*®). Todas as variáveis descritas foram analisadas em analisador automático bioquímico (Wiener lab group, Rosário- Argentina).

Tomografia computadorizada e densitometria óssea

Nos dias 30, 90 e 120, dois peixes de cada tanque, previamente congelados, foram submetidos à análise de tomografia computadorizada helicoidal (Shimadzu, modelo SCT-7800 CT), seguindo os parâmetros: 250 e 350 mm de campo de visão (FOV) de acordo com tamanho do peixe, algoritmo 120 kv e 100 ma, intervalo de corte de 2mm (gap) e espessura de corte de 2mm (fatia).

O exame tomográfico dos cortes axiais mostrou imagens dos ossos do corpo, cabeça e coluna vertebral na posição de decúbito lateral direito e proporcionaram medidas quantitativas da densidade mineral óssea permitindo diagnóstico das alterações da estrutura óssea para comparação entre os tratamentos. As imagens foram analisadas utilizando o programa ClearCanvas Workstation®.

A densidade de cada vertebra foi determinada de acordo com escala de Hounsfield em um diâmetro de 0,050cm². Foram mensurados três corpos vertebrais em relação à nadadeira peitoral, dorsal e caudal, totalizando nove mensurações por peixe (Figura 4).

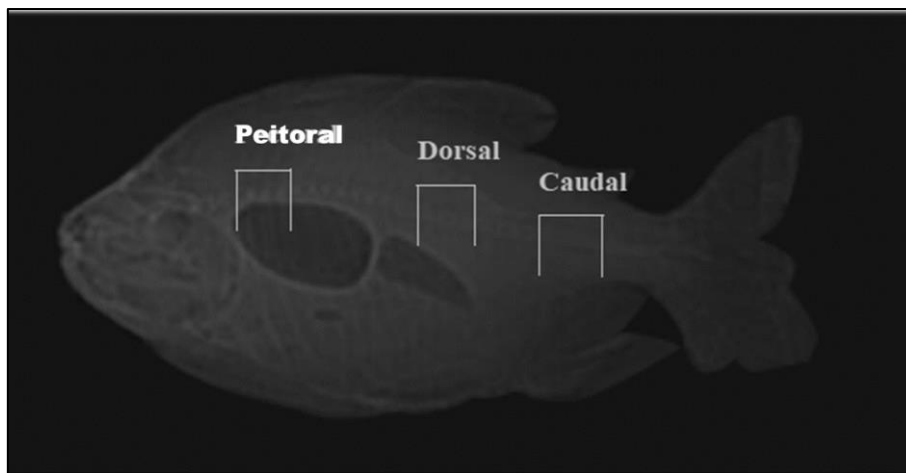


Figura 4. Imagem de tomografia computadorizada de juvenis de pirapitinga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta mostrando as regiões consideradas para a medição da densidade mineral óssea do conjunto de vertebrae: peitoral, dorsal e caudal

Análise estatística

Todos os dados foram verificados quanto à normalidade (teste de Shapiro Wilk) e a homogeneidade de variância (teste de Bartlett). Os dados foram submetidos à análise de variância e quando as diferenças foram significativas ($P < 0.05$), as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey ou teste Duncan. Um nível de significância de $P (\leq 0.05)$ foi usado para todas as análises estatísticas. Os dados foram analisados utilizando o Software R®.

Resultados

Os peixes aceitaram facilmente as rações experimentais e mantiveram comportamento normal durante o período experimental (Anexo 1). Não houve mortalidade dos peixes. Foi possível observar sinais macroscópicos de deficiência de Pdisp. com alterações das estruturas anatômicas e conformação do corpo dos exemplares de tilápia (Anexo 2). As demais espécies não apresentaram sinais físicos ou alterações visíveis das estruturas anatômicas. O nível de fósforo nas dietas não afetou ($P < 0.05$) o coeficiente de digestibilidade (CDA) (Tabela 2).

TABELA II. Coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) de proteína bruta, e fósforo de juvenis de tilápia, pirapitinga e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta ($n = 12$)

Níveis de fósforo disponível

Variáveis	Controle	Deficiente	P de valor
Tilápia			
CDA proteína bruta (%)	83.2	82.8	0.6972
CDA fósforo total (%)	94.4	93.4	0.4154
Pirapitinga			
CDA proteína bruta (%)	71	77	0.3411
CDA fósforo total (%)	77.4	85.6	0.0938
Panga			
CDA proteína bruta (%)	21.3	29.5	0.4552
CDA fósforo total (%)	62.7	83.5	0.0553

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula, não diferem entre si ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey

A umidade e o conteúdo de lipídios do corpo inteiro dos juvenis de tilápia foi significativamente ($P < 0.05$) reduzido nos peixes do grupo recuperado em relação aos peixes do grupo controle e deficiente. A quantidade de proteína bruta e cinzas no corpo não foram afetadas ($P < 0.05$) pela suplementação de Pdisp. Para os juvenis de pirapitinga e panga nenhum dos parâmetros de composição corporal foram afetados ($P < 0.05$) pela concentração de Pdisp. (Tabela 3).

TABELA III. Composição corporal (100%MS) de juvenis de tilápia, pirapitinga, e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta (média \pm DP)

Variável	Níveis de fósforo disponível			Valor P
	Controle	Deficiente	Recuperado	
Tilápia				
Umidade	297.93 ^a \pm 9.55	294.52 ^a \pm 2.9	257.25 ^b \pm 5.68	<0.001
Proteína bruta	578.67 \pm 32.49	535.51 \pm 41.88	607.85 \pm 91.73	0.36

Gordura	458.93 ^a ±83.76	493.98 ^a ±57.96	294.57 ^b ±57.96	0.0044
Cinzas	122.47±17.02	121.75±22.9	118.57±8.14	0.9575
Pirapitinga				
Umidade	295.93±20.30	306.45±17.2	272.04±8.2	0.0934
Proteína bruta	574.55±17.5	563.87±109.66	597.38±96.01	0.8547
Gordura	251.93±31.86	339.78±146.13	221.11±22.23	0.1925
Cinzas	111.86±33.65	109.7±16.67	124.21±1.4	0.6926
Panga				
Umidade	326.64±17.5	302.43±37.66	299.32±5.69	0.4703
Proteína bruta	510.38±129.79	475.26±46.86	532.11±84.27	0.6957
Gordura	395.75±46.61	359.58±112.21	287.58±40.42	0.1689
Cinzas	114.88±8.52	89.39±11.88	108.33±16.66	0.1126

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula, não diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey

A deposição de minerais no corpo inteiro e nas escamas dos juvenis de tilápia não foi afetada ($P < 0,05$) pela concentração dietética de Pdisp. Enquanto a deposição de cálcio e fósforo nas vertebrae foi maior nos peixes do grupo recuperado ($P < 0,05$) quando comparado aos animais deficientes. Os teores de cálcio e magnésio nos ossos da cabeça apresentaram menor deposição nos peixes do grupo deficiente ($P < 0,05$) (Tabela 4).

TABELA IV. Composição mineral do corpo inteiro, das escamas, das vertebrae, e dos ossos da cabeça de juvenis de tilápia alimentadas com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta (média± DP)

Variável	Níveis de fósforo disponível			Valor P
	Controle	Deficiente	Recuperada	
Corpo inteiro				

P (g kg ⁻¹)	6.36±2.52	9.37±1.95	7.08±4.38	0.2505
Ca (g kg ⁻¹)	19.15±4.07	16.94±5.94	13.74±4.49	0.2261
Mg (g kg ⁻¹)	0.67±0.2	0.78±0.15	1.92±1.01	0.0111
Zn (mg kg ⁻¹)	0.0532±0.01	0.0513±0.002	0.0624±0.02	0.6692
Mn (mg kg ⁻¹)	0.0078±0.02	0.0086±0.01	0.0258±0.03	0.054
Escama				
P (g kg ⁻¹)	124.61±21.25	91.53±23.98	110.79±17.6	0.0488
Ca (g kg ⁻¹)	231.52±37.54	217.46±84.54	196.45±24.07	0.5563
Mg (g kg ⁻¹)	13.86±3.05	12.8767±3.52	11.902±2.79	0.5928
Zn (mg kg ⁻¹)	0.8867±0.03	0.744±0.02	0.8483±0.04	0.1657
Mn (mg kg ⁻¹)	0.0883±0.09	0.084±0.16	0.0717±0.1	0.6474
Vertebra				
P (g kg ⁻¹)	181.26±16.8 ^a	132.41±20.79 ^b	159.9±3.54 ^{ab}	<0.001
Ca (g kg ⁻¹)	320.79±16.9 ^a	269.19±45.02 ^b	296.2±23.77 ^a	0.0363
Mg (g kg ⁻¹)	19.6±2.99	18.73±4.27	20.25±6.22	0.853
Zn (mg kg ⁻¹)	1.1±0.03	1.43±0.06	1.21±0.05	0.0592
Mn (mg kg ⁻¹)	0.1±0.16	0.13±0.29	0.11±0.21	0.653
Cabeça				
P (g kg ⁻¹)	218.49±13.86	214.23±36.82	194.2±35.96	0.4065
Ca (g kg ⁻¹)	330.53 ^a ±16.87	274.97 ^b ±50.14	230.69 ^{ab} ±49.2	0.0039
Mg (g kg ⁻¹)	25.16 ^a ±6.56	10.25 ^b ±9.1	21.22 ^{ab} ±6.47	0.0161
Zn (mg kg ⁻¹)	1.75±0.07	1.91±0.12	1.74±0.07	0.8337

Mn (mg kg ⁻¹)	0.1301 ^{ab} ±0.57	0.2509 ^a ±0.41	0.1097 ^b ±0.63	0.0305
---------------------------	----------------------------	---------------------------	---------------------------	--------

Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0.05)

Para juvenis de pirapitinga, a deposição de minerais no corpo inteiro, ossos e escamas não foi afetada (P<0.05) pela suplementação de Pdisp. Com exceção dos níveis de fósforo no corpo inteiro, que foi menor (P<0.05) nos peixes do grupo recuperado quando comparados aos animais do grupo controle e deficiente (Tabela 5).

TABELA V. Composição mineral do corpo inteiro, das escamas, das vertebrae, e dos ossos da cabeça de juvenis de pirapitinga alimentadas com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta (média± DP)

Variável	Níveis de fósforo disponível			Valor P
	Controle	Deficiente	Recuperada	
Corpo inteiro				
P (g kg ⁻¹)	16.37 ^a ±3.01	14 ^a ±3.25	9.30 ^b ±1.86	0.0017
Ca (g kg ⁻¹)	21.07±4.93	19.73±7.99	12.69±8.16	0.152
Mg (g kg ⁻¹)	0.88±0.39	0.94±0.35	0.58±0.41	0.2584
Zn (mg kg ⁻¹)	0.05±0.006	0.04±0.003	0.03±0.003	0.6233
Mn (mg kg ⁻¹)	0.0064±0.03	0.0069±0.007	0.0043±0.01	0.6157
Escama				
P (g kg ⁻¹)	127.47±5.95	112.13±30.98	102.32±4.96	0.0903
Ca (g kg ⁻¹)	209.61±37.12	195.64±32.37	189.15±20.43	0.5158
Mg (g kg ⁻¹)	29.57±4.85	28.50±2.63	25.86±6.91	0.4509
Zn (mg kg ⁻¹)	1.36±0.07	1.36±0.02	1.25±0.03	0.8227
Mn (mg kg ⁻¹)	0.19±0.15	0.19±0.2	0.20±0.5	0.8747

Vertebra				
P (g kg ⁻¹)	197.33±41.35	198.03±13.30	197.16±10.08	0.9981
Ca (g kg ⁻¹)	338.30±15.44	357.01±24.03	336.77±24.03	0.1804
Mg (g kg ⁻¹)	30.30±6.27	27.17±5.87	27.37±5.87	0.6712
Zn (mg kg ⁻¹)	1.05±0.03	0.80±0.04	0.98±0.04	0.1061
Mn (mg kg ⁻¹)	0.19±0.11	0.15±0.16	0.17±0.16	0.281
Cabeça				
P (g kg ⁻¹)	261.84±22.25	247.35±11.63	260.54±18.74	0.335
Ca (g kg ⁻¹)	375.75±30.57	342.33±21.78	357.98±26.74	0.1277
Mg (g kg ⁻¹)	41.33±4.46	35.21±3.82	37.73±7.10	0.1685
Zn (mg kg ⁻¹)	1.23±0.04	0.93±0.07	1.26±0.05	0.014
Mn (mg kg ⁻¹)	0.27±0.11	0.27±0.23	0.32±0.2	0.2114

Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0.05)

A deposição de fósforo no corpo inteiro dos juvenis de panga aumentou após o restabelecimento do fornecimento de Pdisp. na dieta (P<0.05) quando comparado aos peixes do grupo deficiente. Já a deposição de fósforo nas vertebrae foi menor nos peixes do grupo recuperado (P<0.05) em relação aos peixes do grupo controle e deficiente. A deposição de minerais nos ossos da cabeça e nadadeiras não foi afetada (P<0.05) pela suplementação de Pdisp. (Tabela 6).

TABELA VI. Composição mineral do corpo inteiro, das nadadeiras, das vertebrae, e dos ossos da cabeça de juvenis de panga alimentadas com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta (média± DP)

Variável	Níveis de fósforo disponível			Valor P
	Controle	Deficiente	Recuperada	
Corpo inteiro				

P (g kg ⁻¹)	3.57 ^b ±1.03	10.612 ^{ab} ±5.83	12.525 ^a ±4	0.0136
Ca (g kg ⁻¹)	7.97±1.61	7.31±9.07	15.75±6.16	0.0592
Mg (g kg ⁻¹)	0.43±0.26	0.78±0.52	0.69±0.35	0.4478
Zn (mg kg ⁻¹)	0.045±0.003	0.0325±0.001	0.0425±0.004	0.5217
Mn (mg kg ⁻¹)	0.005±0.01	ND	0.0075±0.02	0.1004
Nadadeiras				
P (g kg ⁻¹)	117.02±13.78	143.64±27.94	136.21±27.47	0.1742
Ca (g kg ⁻¹)	254.26±13.03	258.7±29.12	265.74±23.56	0.7097
Mg (g kg ⁻¹)	26.8±11.05	20.07±10.39	23.07±3.39	0.4476
Zn (mg kg ⁻¹)	2.29±0.1	1.77±0.05	2.26±0.05	0.2667
Mn (mg kg ⁻¹)	0.13±0.6	ND	0.18±0.39	0.0802
Vertebra				
P (g kg ⁻¹)	193.26 ^a ±15.48	198.95 ^{ab} ±21.02	170.17 ^b ±11.22	0.03
Ca (g kg ⁻¹)	333.45±36.26	345.01±28.28	376.77±27.61	0.1222
Mg (g kg ⁻¹)	30±6.63	32.58±6.3	26.47±7.93	0.4505
Zn (mg kg ⁻¹)	1.356±0.02	1.1525±0.03	1.104±0.03	0.0816
Mn (mg kg ⁻¹)	0.162±0.2	0.1325±0.2	0.126±0.07	0.1634
Cabeça				
P (g kg ⁻¹)	264.99±16.21	238.22±29.46	238.01±36.54	0.2062
Ca (g kg ⁻¹)	358.25±21.26	366.34±28.85	374.09±41.07	0.7223
Mg (g kg ⁻¹)	43.91±7.08	34.82±7.41	43.91±8.56	0.1517
Zn (mg kg ⁻¹)	1.70±0.03	1.62±0.04	1.57±0.06	0.7129

Mn (mg kg ⁻¹)	0.155±0.26	0.165±0.26	0.180±0.25	0.6223
---------------------------	------------	------------	------------	--------

Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0.05)

ND= não determinado

Com exceção dos ossos das vertebrae, a relação Ca:P das estruturas ósseas se manteve estável para os juvenis de pirapitinga e panga. Após o reestabelecimento do fornecimento de Pdisp. para os juvenis de pirapitinga submetidos a 90 dias de deficiência dietética de Pdisp. a relação Ca:P das vertebrae diminuiu. Para os juvenis de tilápia, nos ossos da cabeça e escamas dos peixes do grupo recuperado houve reestabelecimento da relação Ca:P em relação aos animais do grupo deficiente (Figura 5).

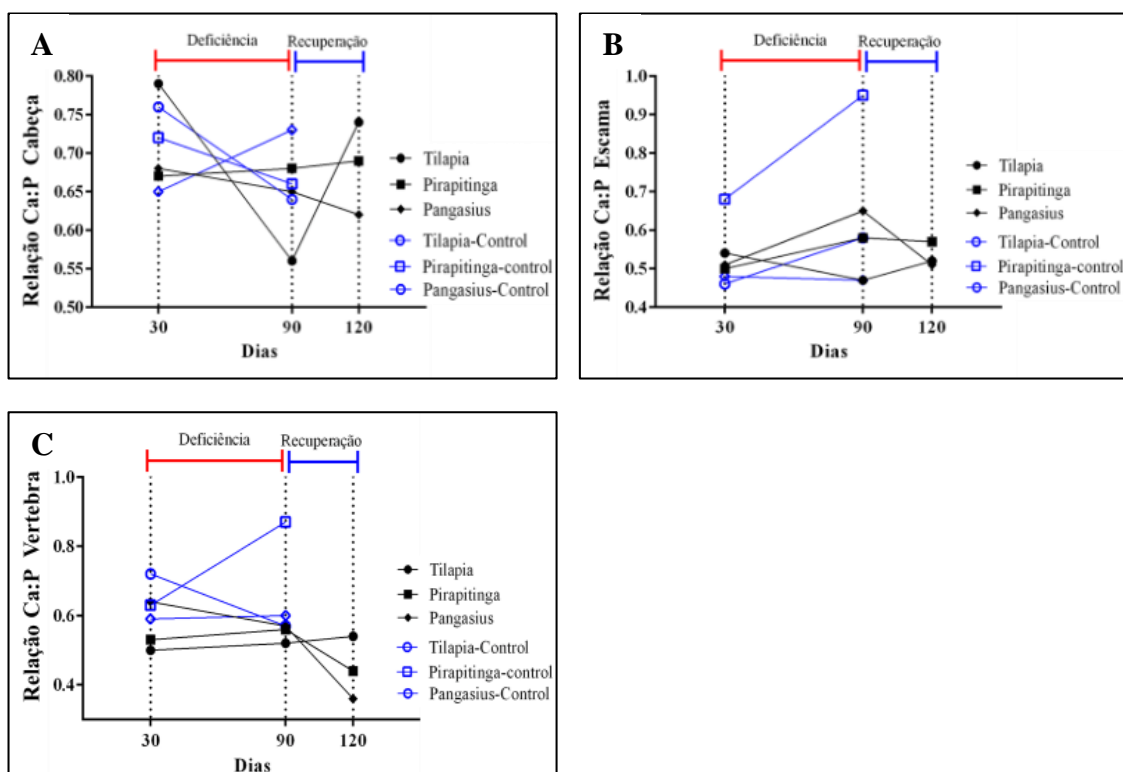


Figura 5. Relação Cálcio: fósforo dos ossos da cabeça (A), escama (B) e vertebrae (C) de juvenis de tilápia, pirapitinga e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta.

Valores apresentados no anexo 3

Em relação aos peixes do grupo controle, as proteínas totais da tilápia e panga aumentaram até os 90 dias de alimentação (Figura 6). Já nos peixes do grupo recuperado, houve aparente redução no nível de proteína sérica total (Figura 6), com diferença significativa (P<0,05) apenas nos juvenis de pirapitinga (Anexo 4). Com exceção do

panga, os peixes do grupo recuperado apresentaram quantidade menor de albumina quando comparados aos peixes grupo deficiente (Figura 6). O teor de triglicérides, nos juvenis de panga do grupo deficiente foi numericamente maior quando comparado ao grupo controle e recuperado. Os juvenis de pirapitinga que reestabeleceram o consumo de Pdisp. após 90 dias de deficiência continuaram a aumentar o teor de triglicérides séricos. Esse mesmo comportamento foi observado para o teor de colesterol sérico dos juvenis de panga (figura 6).

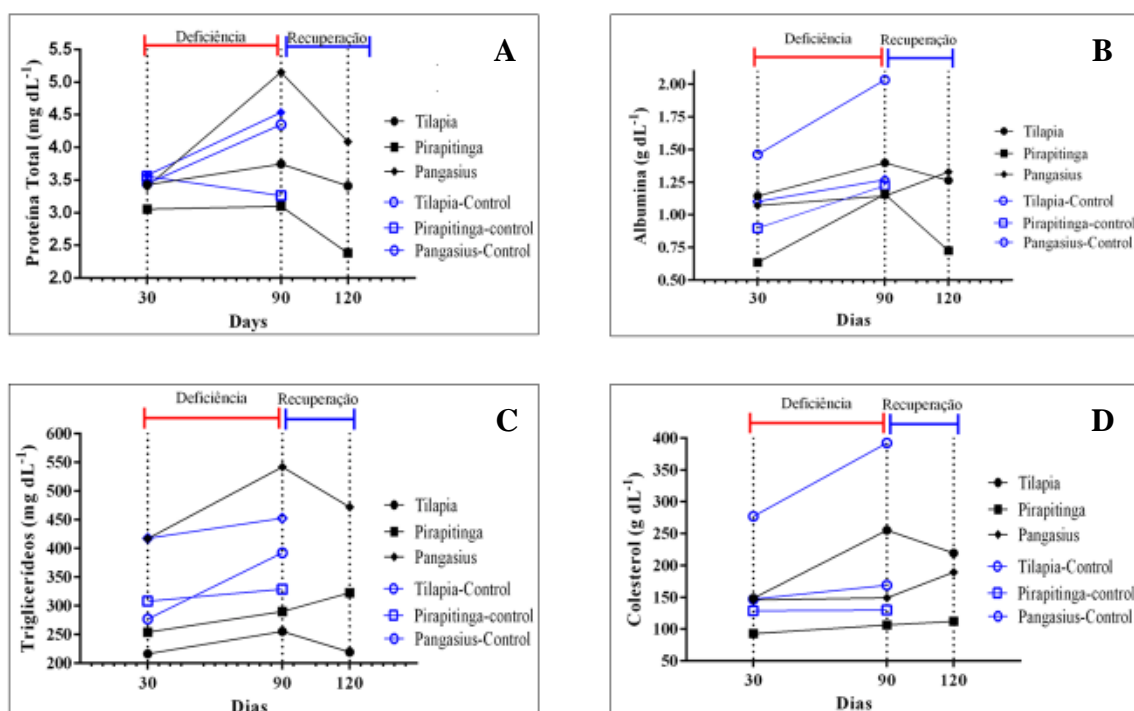


Figura 6. Valores absolutos de proteínas totais (A), albumina (B), triglicérides (C), colesterol (D) de juvenis de tilápia, pirapitinga e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta.

Médias obtidas a partir dos valores estatisticamente analisados de proteína total, albumina, triglicérides e colesterol apresentados no anexo 4.

O teor fósforo sérico total de todos os peixes que reestabeleceram o consumo dietético de Pdisp. diminuiu quando comparados com o grupo deficiente (Figura 7). Os níveis de fosfatase alcalina sérica tenderam a aumentar nos juvenis de tilápia e pirapitinga após o reestabelecimento do fornecimento dietético de Pdisp., enquanto os juvenis de panga diminuíram a atividade da enzima nos peixes do grupo recuperado (Figura 7).

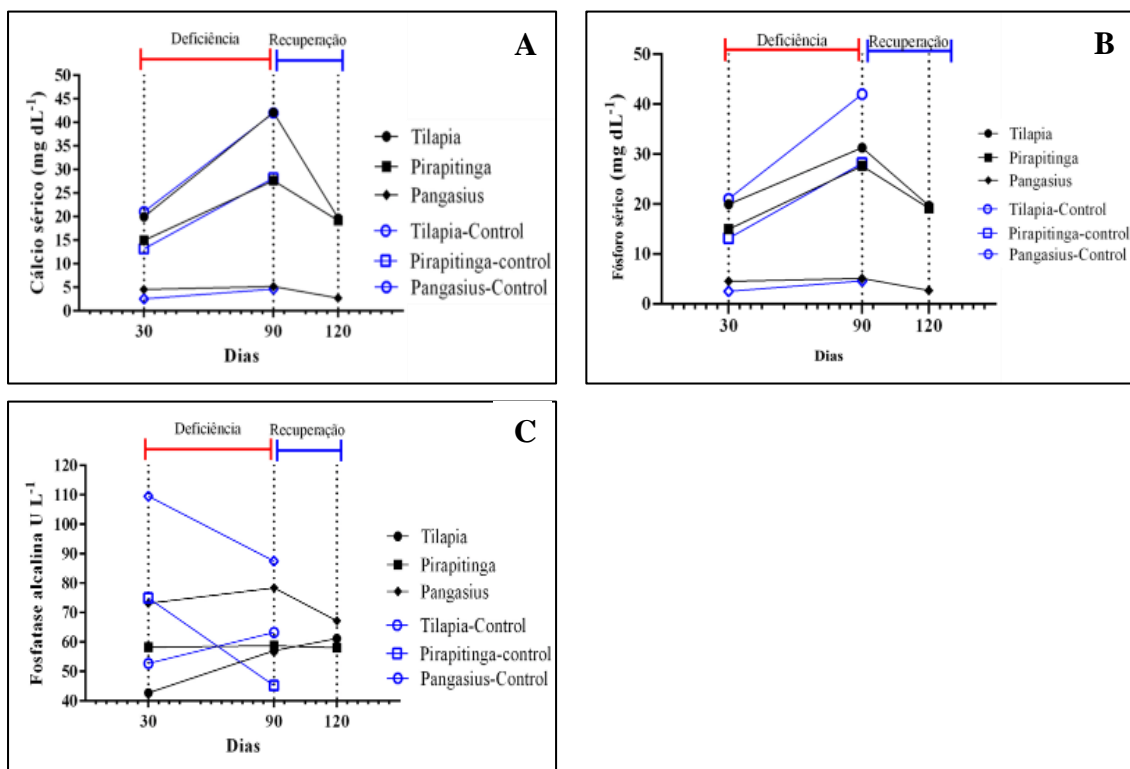


Figura 7. Valores absolutos de cálcio sérico (A), fósforo sérico (B) e fosfatase alcalina (C) de juvenis de tilápia, pirapitinga e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta.

Valores obtidos a partir dos valores estatisticamente analisados de cálcio sérico, fósforo sérico e fosfatase alcalina apresentados no anexo 4.

A densidade óssea foi avaliada de forma quantitativa por meio de exame de tomografia computadorizada. A massa óssea dos juvenis de tilápia alimentados com níveis de Pdisp na dieta aumentou ($P < 0,05$) em todas as regiões da coluna, apenas para os peixes do grupo recuperado, quando comparados aos peixes do grupo controle e deficiente. Os resultados de densidade óssea dos juvenis de pirapitinga não foram significativamente ($P < 0,05$) afetados pelo nível de Pdisp na dieta. Com exceção, da massa óssea das vertebrae caudais do grupo deficiente e recuperado, que foram significativamente ($P < 0,05$) maiores quando comparados aos peixes do grupo controle (Tabela 8).

TABELA VII. Densitometria do conjunto de vertebrae peitoral, dorsal e caudal de juvenis de tilápia, pirapitinga e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta (média \pm DP)

Níveis de fósforo disponível				
Variável	Controle	Deficiente	Recuperada	Valor P
Tilápia				
Peitoral (HU)	322.93 ^b ±25.59	280.58 ^b ±28.51	384.68 ^a ±20.22	<0.001
Dorsal (HU)	345.70 ^b ±26.95	293.40 ^c ±9.38	373.73 ^a ±8.68	<0.001
Caudal (HU)	330.80 ^b ±36.61	306.01 ^c ±12.61	363.11 ^a ±16.35	<0.001
Pirapitinga				
Peitoral (HU)	481.40±33.88	517.48±19.59	537.95±22.53	0.057
Dorsal (HU)	424.65±27.79	422.56±52.35	450.41±19.88	0.3582
Caudal (HU)	396.25 ^b ±48.07	442.15 ^a ±28.50	451.60 ^a ±34.86	0.0057
Panga				
Peitoral (HU)	429.86±31.15	401.30±12.69	383.86±24.99	0.1955
Dorsal (HU)	396.23±32.81	373.28±25.76	395.08±36.67	0.0622
Caudal (HU)	379.16±57.33	373.91±8.42	366.06±15.01	0.7059

Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Duncan (P<0.05)

A densidade óssea e o volume dos ossos da cabeça foram reduzidos em todos os peixes alimentados com as dietas deficientes em Pdisp. Para os juvenis de pirapitinga, o volume total dos ossos da cabeça foi, aproximadamente, 30% maior nos peixes do grupo recuperado, já os juvenis de pirapitinga alimentados com a dieta deficiente apresentaram o menor volume ósseo (Figura 8).

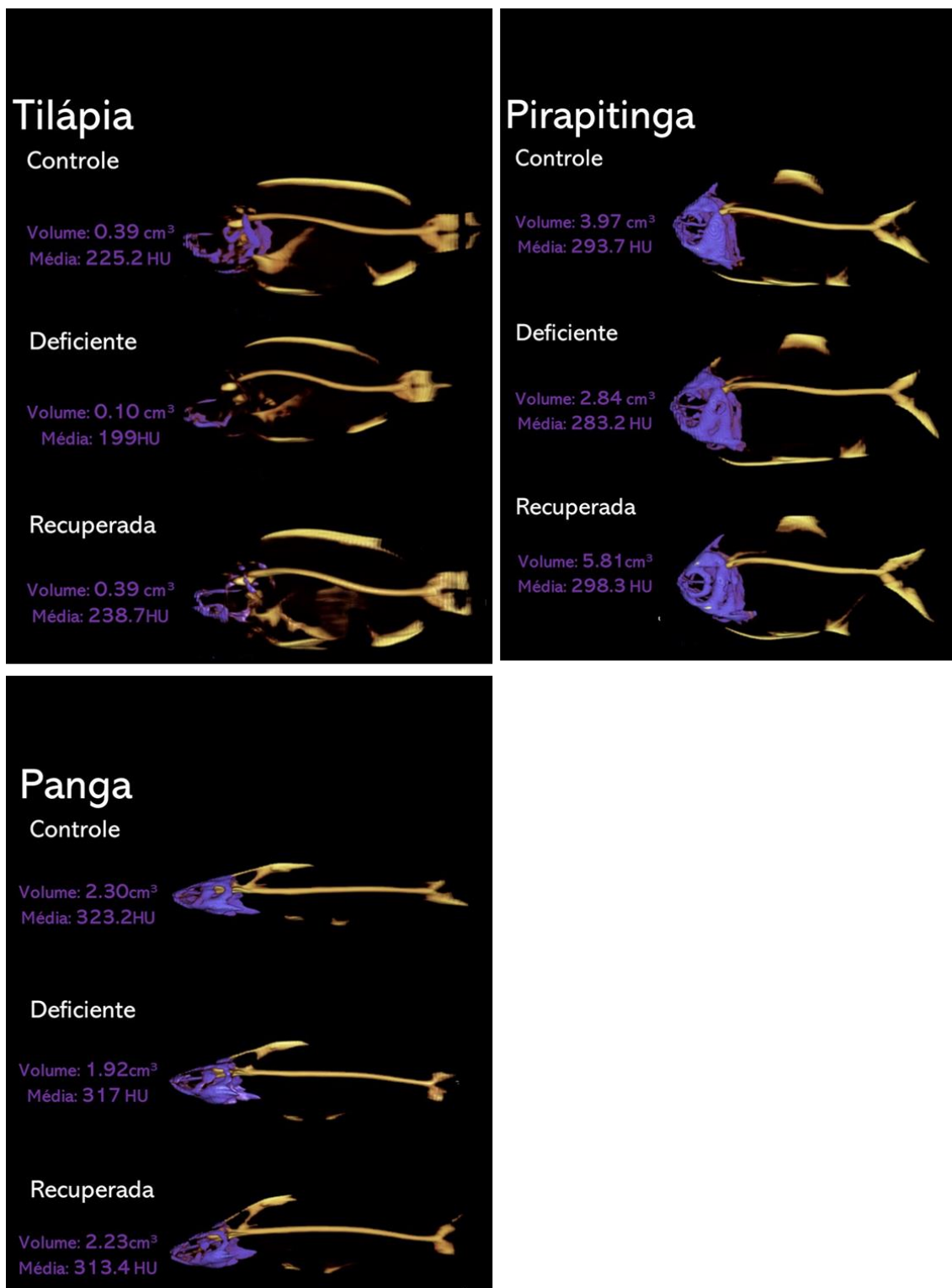


Figura 8. Imagens tomográficas da formação óssea, volume e densidade dos ossos da cabeça de juvenis de (A) tilápia, (B) pirapitinga e (C) panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta

Discussão

Neste estudo, avaliamos a composição corporal, os tecidos mineralizados, e a mobilização de minerais de três espécies de peixes teleósteos alimentadas com níveis de fósforo dietético. Junto a esses resultados, buscamos descrever as características morfológicas das estruturas mineralizadas e o bem-estar fisiológico desses peixes após o um período prologando de deficiência de fósforo combinado com o reestabelecimento do fornecimento dietético de P. Nossos resultados mostraram que, dentre as espécies estudadas, a tilápia parece ter maior suscetibilidade a ossos hipomineralizados e osteomalácia decorrentes da deficiência de fósforo. Além disso, a principal estrutura óssea fragilizada pela deficiência de fósforo, em ambas as espécies, são os ossos da cabeça.

A deficiência dietética de fósforo é comumente associada a malformação óssea e diminuição no crescimento em peixes teleósteos (Baeverfjord et al., 2018). Entretanto, os nossos resultados mostraram que, o aumento da deposição de gordura corporal pode ser mais responsivo a deficiência dietética de fósforo em peixes. O aumento da adiposidade em peixes deficientes em P tem disso amplamente observado em teleósteos, como a pirapitinga e em outras espécies da mesma família, como por exemplo o tambaqui (Menezes et al, 2021) e pacu (Signor et al., 2011) e tilápia. É possível que, a deficiência de P em peixes inibe a β -oxidação dos ácidos graxos, resultando em uma menor utilização de lipídios como fonte de energia (Luo et al., 2010) o que pode causar maior acúmulo de lipídios corporais nesses peixes. Nesse sentido, o reestabelecimento do fornecimento de P após o período prolongado de deficiência foi capaz de diminuir a adiposidade corporal apenas nos juvenis de pirapitinga. Pode ser que o período de avaliação após o reestabelecimento do fornecimento de P não tenha sido suficiente para que os juvenis de tilápia e panga pudessem restabelecer completamente a homeostase e higidez. Outro ponto é que, os juvenis de panga não tiveram bom aproveitamento da dieta. Esses animais apresentaram a pior digestibilidade dos nutrientes que foram avaliados, principalmente, a digestibilidade do P da dieta controle que foi muito abaixo do esperado. Com isso, os resultados obtidos para o panga podem estar subestimados, visto que a quantidade de fósforo disponível nas dietas controle e deficiente foram próximas. O fosforo total fornecido na dieta dos juvenis de panga foi de 17 g kg⁻¹ na dieta controle e 9.9g kg⁻¹ na dieta deficiente, após a avaliação de digestibilidade os níveis de fósforo das dietas mantiveram em 9g kg⁻¹ Pdisp na dieta controle e 8.3 g kg⁻¹ Pdisp na dieta deficiente. No presente estudo, a digestibilidade de P melhorou de 62.7% nos peixes alimentados com a

dieta controle para 83.5% nos os peixes alimentados com a dieta deficiente. O panga é uma espécie com hábitos alimentares onívoros e parecem se desenvolver adequadamente quando alimentados com dietas a base ingredientes vegetais (Debnath et al., 2005; Hung et al., 2015). Naturalmente, espera-se que em situações de deficiência nutricional os peixes melhorem a absorção intestinal de P.

Dado o longo período de deficiência de P dos peixes deste estudo, esperava-se a diminuição do teor de cinzas no corpo inteiro, desenvolvimento de osteomalácias e de outras patologias graves. Supreendentemente, os nossos resultados mostraram que a quantidade de cinzas no corpo todo se manteve estável durante todo período experimental, para as três espécies estudadas. Bem como a relação Ca:P, que foi baixa em todas as estruturas mineralizadas, mesmo após o reestabelecimento do fornecimento de P. Esses resultados foram anteriormente observados nas espécies alvo deste estudo; tilápia, pirapitinga, panga. A manutenção dos níveis corporais de minerais observada nos peixes deste estudo, pode ser explicada pela dinâmica de utilização dos minerais em peixes teleósteos. Sabe-se que deposição de minerais no corpo inteiro dos peixes, apresenta certo grau de flexibilidade quando comparado com a maioria dos vertebrados (Baeverfjord et al., 2018). As reservas corporais de fósforo possuem alta disponibilidade de mobilização, principalmente a fim de favorecer processos metabólicos e fisiológicos (Lall et al., 2007). As mudanças nos níveis de fósforo da dieta tendem a ter consequências sobre o status mineral de estruturas mineralizadas como ossos da cabeça, opérculo, nadadeira e escamas e de estruturas biomecânicas como as costelas, vertebrae, e ossos intramusculares (Deschamps et al., 2014) enquanto a proporção de minerais nos tecidos moles é preservada. De fato, os nossos resultados mostraram que composição mineral do corpo inteiro e estruturas mineralizadas mesmo após um período prolongado de deficiência de fósforo foi fracamente afetada, em ambas as espécies. É possível que, sob um sistema de recirculação de água em condições estáveis e controladas, a deficiência de P como fator único não tenha consequências severas na mobilização de minerais das estruturas. No entanto, o tecido ósseo tem particularidades de desenvolvimento, genéticos, ambientais e funcionais que podem influenciar a resposta dos tecidos mineralizados para a deficiência de P.

Neste estudo, a deficiência dietética de P foi capaz induzir a ocorrência de deformidades morfológicas apenas nos juvenis de tilápia. Isto pode ser explicado pelo baixo conteúdo de minerais nas vertebrae e ossos da cabeça, observado nos juvenis de tilápia do grupo deficiente deste estudo. Aparentemente, a integridade estrutural dos

corpos vertebrais dos juvenis de tilápia está fortemente relacionada ao nível de P da dieta. Esses resultados foram observados para tilápia (Schamber et al., 2014), e outras espécies de teleósteos, como a truta arco-íris (Fontagné et al. 2009) e salmão do Atlântico (Fjellidal et al. 2012^a). Em estudos anteriores com juvenis de tilápia, a deficiência de cálcio e fósforo induziu a reabsorção óssea e resultou em osteoporose do osso acelular (Takagi e Yamada 1992). No entanto, 14 dias após o reestabelecimento do fornecimento de Ca e P na dieta, o tecido ósseo foi reparado exclusivamente nos locais onde o osso havia sido perdido (Takagi e Yamada, 1991). No presente estudo, os juvenis de tilápia também foram capazes de reestabelecer mineralização das vertebra após um período prologando de deficiência nutricional de P seguido de reestabelecimento do fornecimento dietético de P. Entretanto, os ossos da cabeça foram os mais desmineralizados e não foi possível reestabelecer a mineralização desse tecido nos juvenis de tilápia do presente estudo. Esses resultados sugerem que o conteúdo de P nas vertebra de juvenis de tilápia podem ser considerados um bom indicador do P dietético para a mineralização óssea. Além disso, pode ser que osteomalácia induzida por deficiência de fósforo em juvenis de tilápia possa ser recuperada após o fornecimento de P de acordo com a exigência dietética. Por outro lado, o tempo de resposta do tecido ósseo a deficiência de fósforo deve ser observada de acordo com as particularidades de cada espécie e a sua capacidade recuperação da privação de P, pois as funções celulares e mecânicas dos ossos dos peixes podem interferir no processo de formação e regeneração dos tecidos mineralizados.

De fato, os peixes possuem a capacidade de usar as reservas de P do corpo para atender às necessidades metabólicas (Baeverfjord et al., 2019). Para nossa surpresa, a deposição de P nos tecidos das pirapitingas deste estudo, foi fracamente afetado pelo nível de P_{disp} na dieta. Já os juvenis de panga a deposição de minerais no corpo inteiro foi priorizada em relação aos ossos da vertebra. No entanto, mesmo após 90 dias de alimentação com a dieta sem suplementação de P_{disp}, os peixes ainda foram capazes de manter a deposição P nesses tecidos. Esses resultados foram observados para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Menezes et al., 2021), e em outras espécies de peixes como, *Micropterus salmoides* (Wang et al., 2022), *Melanogrammus aeglefinus* L. (Roy and Lall, 2003), *Oncorhynchus mykiss* (Deschamps et al., 2016). Aparentemente, as estruturas mineralizadas dessas espécies possuem uma forte capacidade de responder a deficiência de fósforo na dieta, disponibilizando P para ser utilizado em funções metabólicas. Um estudo recente com juvenis de tambaqui, demonstrou que os peixes alimentados com dietas deficientes em P_{disp} diminuíram a mineralização em diversos locais do corpo,

sendo principalmente atingidos os ossos craniais e operculares (Menezes et al., 2021). Isto pode estar relacionado com a quantidade de estruturas mineralizados no corpo do tambaqui, como por exemplo, as escamas, serrilha, dentes, opérculo e nadadeiras. Nesse sentido, a deficiência de P afeta os tecidos mineralizados diferencialmente com base nos papéis fisiológicos e biomecânicos dos tecidos (Deschamps et al., 2016). O que pode explicar a utilização dos ossos craniais para amortecer o desequilíbrio do P nos tecidos e retardar os impactos negativos no crescimento. Entretanto, não existe uma correlação direta entre o grau de mineralização óssea e a qualidade óssea. Em salmonídeos submetidos a deficiência prolongada de P dietético, observou-se que, mesmo o osso desmineralizado pode continuar a crescer de forma funcional e com capacidade de remineralizar (Witten et al., 2019). Além disso, o fornecimento de valores absolutos para identificar os níveis aceitáveis de mineralização em uma determinada espécie exigiria a padronização de métodos para a análise do tecido ósseo (Deschamps et al., 2016). Nesse sentido, são necessários estudos para descrever até que ponto a desmineralização dos tecidos pode ser relevante para as diferentes espécies de peixes.

Semelhante a outros animais, o sangue dos peixes também participa do transporte e manutenção do ambiente interno estável (Ye et al., 2016). A nutrição é um dos fatores ambientais que mais influenciam os parâmetros bioquímicos sanguíneos, e tem grande influência no equilíbrio orgânico normal e patológico. Níveis deficientes ou excessivos de nutrientes podem alterar a homeostase dos peixes e se refletem em várias funções fisiológicas (Fazio, 2019). O uso dos valores P_i sérico tem sido questionado por alguns pesquisadores como uma boa variável resposta para indicar a adequabilidade dos níveis de P dietéticos para peixes pois os níveis de fósforo sérico sanguíneo poderiam refletir a ingestão dietética recente e não refletir o estado de P do peixe (Araújo, et al., 2016; Roy, Lall, 2003; Yao, et al., 2013). No entanto, neste estudo foi estabelecido um tempo de jejum de 24 h antes da coleta de sangue, a fim de minimizar esse efeito. Os resultados demonstraram que o P_i sérico é responsivo ao estado de P corporal, em que, os animais alimentados com os menores níveis de P na dieta apresentaram menor nível de P_i sérico. Esses resultados são sustentados pelos níveis de albumina e proteínas totais nos peixes não suplementados com P disp. e os peixes do grupo recuperado. A albumina é parte relevante das proteínas séricas totais. A albumina é responsável pelo transporte de íons fosfatos para os tecidos-alvo (González, et al., 2017), conseqüentemente, com maior mobilização de fosfato dos tecidos os níveis séricos de albumina tendem a aumentar. Além disso, a baixa concentração de P_i sérico pode causar desequilíbrio no pH sanguíneo,

desta forma, a albumina pode agir como tampão, a fim de se ajustar o equilíbrio ácido-base sanguíneo.

Assim, pode-se concluir que, os mecanismos de resposta a deficiência de Pdisp. são diferentes entre as espécies estudadas. Os ossos cefálicos são a estrutura preferencialmente utilizada para mobilização de minerais em situações de deficiência de Pdisp. O reestabelecimento do fornecimento de Pdisp. após um longo período de deficiência foi capaz de reestabelecer o bem-estar fisiológico dos peixes avaliados neste estudo.

Referências

- AOAC. (2000). *Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists* (A. International Ed. 17 ed.). Virgínia, EUA.
- Bremer Neto, H., Graner, C. A. F., Pezzato, L. E., & Padovani, C. R. (2005). Determinação de rotina do crômio em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida. *Ciência rural*, 35(3), 691-697. doi:10.1590/S0103-84782005000300033
- Da Mota, C. S., Araújo, J. G., Pádua, D. M. C., Martins, G. P., & Guimarães, I. G. (2015). Testing various faeces-collecting methods to improve digestibility studies with tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816). *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 102-109. doi:10.1111/jai.12970
- Guimarães, I. G., Pezzato, L. E., & Barros, M. M. (2008). Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition*, 14(5), 396-404. doi:10.1111/j.1365-2095.2007.00540.x
- NRC. (2011). *Nutrient requirements of fish and shrimp*. Washington: The National Academies Press.
- Roubach, R., Gomes, L. C., Fonseca, F. A. L., & Val, A. L. (2005). Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 36(11), 1056-1061. doi:10.1111/j.1365-2109.2005.01319.x
- Roy, P., Witten, P., Hall, B., & Lall, S. (2002). Effects of dietary phosphorus on bone growth and mineralisation of vertebrae in haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 27(1-2), 35-48. doi:10.1023/B:FISH.0000021778.99011.ce
- Antony Jesu Prabhu, P., Schrama, J.W., Kaushik, S.J., 2016. Mineral requirements of fish: a systematic review. *Reviews in Aquaculture* 8, 172-219. <https://doi.org/10.1111/raq.12090>
- Araújo, J.G., Guimarães, I.G., Mota, C.S., de Paula, F.G., Café, M.B., Pádua, D.M.C., 2016. Dietary available phosphorus requirement for tambaqui, *Colossoma macropomum*, juveniles based on growth, haematology and bone mineralization. *Aquaculture Nutrition*. <https://doi.org/10.1111/anu.12449>
- Baeverfjord, G., Antony Jesu Prabhu, P., Fjellidal, P.G., Albrektsen, S., Hatlen, B., Denstadli, V., Ytteborg, E., Takle, H., Lock, E.-J., Berntssen, M.H.G., Lundebye, A.-K., Åsgård, T., Waagbø, R., 2019. Mineral nutrition and bone health in salmonids. *Reviews in Aquaculture* 11(3), 740-765. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/raq.12255>
- Berillis, P., 2015. Factors that can lead to the development of skeletal deformities in fishes: a review. *Journal of Fisheries Sciences*.com 9(3), 17-17.
- Bueno, G.W., Mattos, B.O.d., Neu, D.H., David, F.S., Feiden, A., Boscolo, W.R., 2019. Stability and phosphorus leaching of tilapia feed in water. *Ciência Rural* 49.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente, C., 2005. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação de corpos de água e normas ambientais para

o seu enquadramento, bem como definir como condições e padrões de lançamento de efluentes, e fornece outras providências, in: CONAMA (Ed.). Diário Oficial da União, Brasília- DF.

Cotti, S., Huysseune, A., Koppe, W., Rücklin, M., Marone, F., Wölfel, E.M., Fiedler, I.A.K., Busse, B., Forlino, A., Witten, P.E., 2020. More Bone with Less Minerals? The Effects of Dietary Phosphorus on the Post-Cranial Skeleton in Zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences* 21(15). <https://doi.org/10.3390/ijms21155429>

Deschamps, M.-H., Poirier Stewart, N., Demanche, A., Vandenberg, G.W., 2016. Preliminary study for description of bone tissue responsiveness to prolonged dietary phosphorus deficiency in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research* 47(3), 900-911. <https://doi.org/10.1111/are.12549>

Dietrich, K., Fiedler, I.A.K., Kurzyukova, A., López-Delgado, A.C., McGowan, L.M., Geurtzen, K., Hammond, C.L., Busse, B., Knopf, F., 2021. Skeletal Biology and Disease Modeling in Zebrafish. *Journal of Bone and Mineral Research* 36(3), 436-458. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbmr.4256>

Eissa, A.E., Abu-Seida, A.M., Ismail, M.M., Abu-Elala, N.M., Abdelsalam, M., 2021. A comprehensive overview of the most common skeletal deformities in fish. *Aquaculture Research* 52(6), 2391-2402. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/are.15125>

Ellestad, L.E., Angel, R., Soares, J.H., 2002. Intestinal phytase II: A comparison of activity and in vivo phytate hydrolysis in three teleost species with differing digestive strategies. *Fish Physiology and Biochemistry* 26(3), 259-273. <https://doi.org/10.1023/A:1026231624543>

FAO, 2022. El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA). Rome, Italy, p. 288.

Fiedler, I.A.K., Elmogazy, O., Courtemanche, G., Cardoso, L., Berteau, J.P., 2021. Bones of teleost fish demonstrate high fracture strain. *Journal of Biomechanics* 120, 110341. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2021.110341>

Fjelldal, P.G., Hansen, T.J., Lock, E.J., Wargelius, A., Fraser, T.W.K., Sambafras, F., El-Mowafi, A., Albrektsen, S., Waagbø, R., Ørnsrud, R., 2016. Increased dietary phosphorous prevents vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition* 22(1), 72-90. <https://doi.org/10.1111/anu.12238>

Holm, H., Ytteborg, E., Høst, V., Reed, A.K., Dalum, A.S., Bæverfjord, G., 2020. A pathomorphological description of cross-stitch vertebrae in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 526, 735382. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735382>

Hu, J., Ran, C., He, S., Cao, Y., Yao, B., Ye, Y., Zhang, X., Zhou, Z., 2016. Dietary microbial phytase exerts mixed effects on the gut health of tilapia: a possible reason for the null effect on growth promotion. *Br J Nutr* 115(11), 1958-1966. <https://doi.org/10.1017/s0007114516001240>

Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P., De Boeck, G., Becker, K., 2012. Phytate and phytase in fish nutrition. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 96(3), 335-364. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01169.x>

Lall, S.P., 2002. The minerals, in: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, San Diego.

Lall, S.P., Lewis-McCrea, L.M., 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish — An overview. *Aquaculture* 267(1), 3-19. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.053>

Lellis, W.A., Barrows, F.T., Hardy, R.W., 2004. Effects of phase-feeding dietary phosphorus on survival, growth, and processing characteristics of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 242(1), 607-616. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.016>

Luo, Z., Tan, X.Y., Liu, X., Wang, W.M., 2010. Dietary total phosphorus requirement of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture International* 18(5), 897-908. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9310-2>

Menezes, L.L.C., Santos, J.G.A., Guimarães, I.G., Padua, D.M.C., Machado, V.M.V., Souto, C.N., 2021. A new approach for quantifying phosphorus requirement in *Colossoma macropomum* using CT scanning. *Aquaculture Nutrition* n/a(n/a). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/anu.13317>

Moody, E.K., Corman, J.R., Elser, J.J., Sabo, J.L., 2015. Diet composition affects the rate and N:P ratio of fish excretion. *Freshwater Biology* 60(3), 456-465. <https://doi.org/10.1111/fwb.12500>

Nie, X.Z., Chen, S., Zhang, X.X., Dai, B.Y., Qian, L.C., 2017. Effects of neutral phytase on growth performance and phosphorus utilization in crucian carp (*Carassius auratus*). *J Zhejiang Univ Sci B* 18(10), 886-896. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1600280>

Oliveira, L.N., 2019. Estimativa das exigências energéticas e proteicas para o tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) por meio de diferentes abordagens nutricionais, Programa de Pós Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Goiás Goiás

Roy, P., Lall, S., 2003. Dietary phosphorus requirement of juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Aquaculture* 221(1-4), 451-468. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00065-6)

Salas-Leiton, E., Dias, J., Gavaia, P., Amoedo, A., Valente, L.M.P., 2017. Optimization of phosphorus content in high plant protein practical diets for Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) juveniles: influence on growth performance and composition of whole body and vertebrae. *Aquaculture Nutrition* 23(1), 18-29. <https://doi.org/10.1111/anu.12354>

Sambraus, F., Hansen, T., Daae, B.S., Thorsen, A., Sandvik, R., Stien, L.H., Fraser, T.W.K., Fjellidal, P.G., 2020. Triploid Atlantic salmon *Salmo salar* have a higher dietary phosphorus requirement for bone mineralization during early development. *J Fish Biol* 97(1), 137-147. <https://doi.org/10.1111/jfb.14338>

Signor, A.A., Bittencourt, F., Potrich, F.R., Deparis, A., Boscolo, W.R., 2011. Phosphorus in feed for pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 40(12), 2646-2650. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011001200005>

Sousa, T.J.R., Bomfim, M.A.D., Ribeiro, F.B., Takishita, S.S., Costa, D.D.A.C.D.A., 2019. Phosphorus requirement of tambaqui fingerlings. *Revista Caatinga* 32, 795-804.

Sugiura, S.H., 2018. Phosphorus, Aquaculture, and the Environment. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 26(4), 515-522. <https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1471040>

Witten, P.E., Fjelldal, P.G., Huysseune, A., McGurk, C., Obach, A., Owen, M.A.G., 2019. Bone without minerals and its secondary mineralization in Atlantic salmon (*Salmo salar*): the recovery from phosphorus deficiency. *J Exp Biol* 222(Pt 3). <https://doi.org/10.1242/jeb.188763>

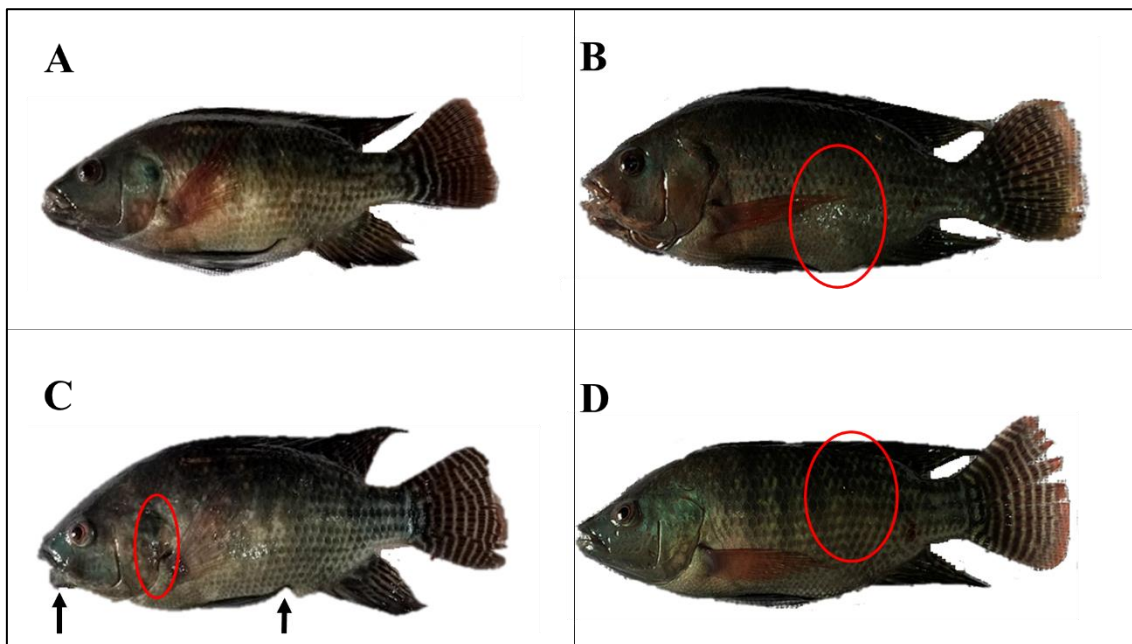
Witten, P.E., Fjelldal, P.G., Huysseune, A., McGurk, C., Obach, A., Owen, M.A.G., 2019. Bone without minerals and its secondary mineralization in Atlantic salmon (*Salmo salar*): the recovery from phosphorus deficiency. *Journal of Experimental Biology* 222(3). <https://doi.org/10.1242/jeb.188763>

Anexos

Anexo 1.

Anexo 1. Valores médios das variáveis de desempenho peso inicial, peso final e consumo aparente de ração de juvenis de tilápia, pirapitinga e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta (média± DP)

Variável	Controle	Deficiente	Recuperada
Tilápia			
Peso inicial	21.1±1.27	20.62±0.46	72.16±10.61
Peso final	134.65±2.62	72.16±10.61	94.5±10.61
Consumo de ração aparente	283.12±3.01	101.03±3.89	174.67±3.3
Pirapitinga			
Peso inicial	41.9±3.68	40.3±3.25	106.66±13.67
Peso final	121.625±5.48	106.66±13.67	138.53±3.96
Consumo de ração aparente	173.62±17.15	63.71±18.08	124.33±2.83
Panga			
Peso inicial	33±1.84	32.17±0.95	78.33±11.79
Peso final	66.52±3.22	78.33±11.79	77±18.86
Consumo de ração aparente	148.25±13.08	66.28±0.91	151.5±4.48

Anexo 2.

Anexo 2. Imagem tilápia do grupo controle sem deformidades aparentes (**A**), curvatura na porção dorsal das vertebrae de tilápia após 90 dias de deficiência de fósforo disponível na dieta (**B**), descoloração das escamas, má formação da mandíbula, irregularidades na borda do opérculo e lesão semelhante a lordose na porção dorsal da coluna de tilápia após 30 dias de reestabelecimento do fornecimento de fósforo disponível na dieta (**C**), deformidades na coluna vertebral na região da nadadeira dorsal em juvenis de tilápia após 90 dias de deficiência de fósforo disponível na dieta (**D**)

Anexo 3

Anexo 3. Valores médios da relação Cálcio: fósforo do corpo inteiro, vertebras, cabeça e escama ou nadadeiras de juvenis de tilápia, pirapitinga e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta (médias aos 90 e 120 dias)

Variável	Controle	Deficiente	Recuperada
Tilápia			
Corpo inteiro	0.27	0.6	0.67
Vertebra	0.64	0.51	0.54
Cabeça	0.7	0.6	0.74
Escama	0.52	0.5	0.52
Pirapitinga			
Corpo inteiro	0.75	0.67	0.72
Vertebra	0.75	0.54	0.44
Cabeça	0.69	0.68	0.69
Escama	0.81	0.55	0.57
Panga			
Corpo inteiro	1.41	0.71	0.57
Vertebra	0.59	0.6	0.36
Cabeça	0.69	0.68	0.62
Nadadeiras	0.47	0.58	0.51

Anexo 4

Anexo 4. Proteínas totais, albumina, triglicérides, colesterol, fósforo sérico total (Pi), cálcio sérico total (Ca), e atividade da fosfatase alcalina de juvenis de tilápia, pirapitinga e panga alimentados com diferentes níveis de fósforo disponível na dieta (média± DP)

Variável	Níveis de fósforo disponível (g kg ⁻¹)			Valor P
	Controle	Deficiente	Recuperada	
Tilápia				
Proteínas totais (g/dL)	4.34±0.35	3.74±1.4	3.41±0.82	0.2589
Albumina (g/dL)	2.03 ^a ±0.3	1.39 ^b ±0.66	1.26 ^b ±0.23	0.0189
Triglicérides (g/dL)	392.16 ^a ±85.59	255.05 ^b ±71.79	219.23 ^b ±98.86	0.0091
Colesterol (g/dL)	192.96 ^a ±23.17	119.80 ^b ±35.62	126.23 ^b ±22.20	<0.001
Pi (mg/dL)	41.96 ^a ±11.60	31.252 ^{ab} ±11.31	19.63 ^b ±2.43	0.0036
Ca (mg/Dl)	16.62±1.32	16.41±3.06	16.41±1.06	0.2968
Fosfatase alcalina (U/L)	63.26±12.22	57±19.09	61.17±7.66	0.7313
Pirapitinga				
Proteínas totais (g/dL)	3.02 ^a ±0.6	3.15 ^a ±0.32	2.38 ^b ±0.26	0.012
Albumina (g/dL)	1.12 ^a ±0.23	1.20 ^a ±0.2	0.72 ^b ±0.07	<0.001
Triglicérides (g/dL)	302.74±55.58	291.88±26.09	322.58±66.4	0.5962
Colesterol (g/dL)	122.81±20.99	97.47±38.77	111.9±30.7	0.4316
Pi (mg/dL)	25.48±11.36	26.78±6.13	19.13±4.27	0.2113
Ca (mg/Dl)	13.81±0.59	14.65±1.62	13.92±1.25	0.4897
Fosfatase alcalina (U/L)	48.15±11.66	58.69±10.84	58.03±12.29	0.3021
Panga				
Proteínas totais (g/dL)	4.53±0.52	4.71±0.64	4.08±0.7	0.249
Albumina (g/dL)	1.27 ^a ±0.18	1.06 ^b ±0.15	1.32 ^a ±0.18	0.0394
Triglicérides (g/dL)	452.38±23.11	522.15±49.84	471.81±71.22	0.0871
Colesterol (g/dL)	168.96 ^{ab} ±27.31	148.26 ^b ±21.87	189.35 ^a ±13.22	0.0168
Pi (mg/dL)	4.61 ^a ±1.18	5.28 ^a ±0.97	2.67 ^b ±1.4	0.0077
Ca (mg/Dl)	16.43 ^a ±0.69	13.85 ^c ±0.91	14.96 ^b ±0.88	<0.001
Fosfatase alcalina (U/L)	87.44 ^a ±7.66	74.88 ^b ±10.61	67.14 ^b ±6.6	0.003

Nota:

Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste de Duncan (P<0.05)

Capítulo 4- Considerações finais

O fósforo desempenha um papel fundamental como nutriente essencial na manutenção dos ecossistemas aquáticos, especialmente para os peixes, devido à sua participação em diversos processos metabólicos, fisiológicos e na formação da estrutura óssea e do exoesqueleto. A nutrição mineral em peixes ao longo do ciclo de produção é altamente complexa. Assim, a avaliação rigorosa das metodologias empregadas para compreender as necessidades nutricionais e o status mineral dos peixes, bem como as funções biológicas do fósforo, incluindo o desenvolvimento do sistema esquelético em diferentes fases é crucial para que se consiga entender a dinâmica de utilização do fósforo em processos metabólicos dos peixes teleósteos.

A seleção de metodologias apropriadas para avaliar essas questões em sistemas aquícolas requer um profundo conhecimento sobre as diferentes espécies de peixes teleósteos e uma compreensão das implicações econômicas relacionadas a fatores nutricionais, como o excesso ou deficiência dietética de fósforo. Essa seleção deve levar em consideração as particularidades anatômicas, fisiológicas e metabólicas das espécies aquícola em análise. Até o momento, a avaliação do teor de fósforo no corpo inteiro do peixe e a detecção de má formação óssea tem sido o critério utilizado para determinar a presença ou ausência de deficiência de fósforo. No entanto, identificar indicadores válidos que possam refletir o estado nutricional dos peixes sem recorrer a técnicas demoradas, dispendiosas e invasivas, que também podem causar desconforto aos animais amostrados pode otimizar o processo produtivo e facilitar a identificação precoce de potenciais problemas causados pela deficiência nutricional de fósforo. Nesse sentido, é importante determinar qual o real impacto econômico e para o bem-estar fisiológico dos peixes, a ocorrência de má formação, desmineralização dos tecidos e deformidades ósseas em peixes decorrentes da deficiência nutricional de fósforo. Portanto, é necessário buscar alternativas viáveis e eficazes para monitorar o status mineral dos peixes em sistemas aquícolas. Para isso, é necessário levar em consideração as especificidades das espécies de interesse comercial e os desafios práticos associados à avaliação nutricional em sistemas de produção.

Nesse sentido, estudos que visem a avaliação individual das espécies de acordo com suas particularidades podem apresentar um panorama mais assertivo sobre a utilização de fósforo durante períodos de deficiência e ou recuperação da deficiência de fósforo em diferentes fases de criação. Certamente que a presença de anormalidades

ósseas pode ter implicações severas na apresentação do produto e impactar na viabilidade econômica da atividade aquícola. No entanto, parâmetros relacionados ao bem-estar fisiológico dos peixes podem ser mais abrangentes e eticamente amigáveis, pois em espécies que não apresentam lesões ou deformidades ósseas os sinais e sintomas de deficiência de fósforo dietético podem ser subestimados.