



RENAN ROSA PAULINO

**NÍVEIS DE ÁCIDO LINOLEICO E ÁCIDO
LINOLÊNICO EM DIETAS PARA TAMBAQUI
(*Collossoma macropomum*)**

**LAVRAS - MG
2016**

RENAN ROSA PAULINO

**NÍVEIS DE ÁCIDO LINOLEICO E ÁCIDO LINOLÊNICO EM DIETAS
PARA TAMBQUI (*Colossoma macropomum*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para obtenção do título de Doutor.

Orientador
Dra. Priscila Vieira Rosa

LAVRAS - MG

2016

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

Paulino, Renan Rosa.

Níveis de ácido linoleico e ácido linolênico em dietas para
tambaqui (*Colossoma macropomum*) / Renan Rosa Paulino. - 2016.
87 p.

Orientador(a): Priscila Vieira e Rosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2016.
Bibliografia.

1. Ácidos graxos. 2. Metabolismo lipídico. 3. Peixes. I. Rosa,
Priscila Vieira e. . II. Título.

RENAN ROSA PAULINO

**NÍVEIS DE ÁCIDO LINOLEICO E ÁCIDO LINOLÊNICO EM DIETAS
PARA TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

**LEVELS OF LINOLEIC ACID AND LINOLENIC ACID IN DIETS FOR
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não Ruminantes, para obtenção do título de Doutor

APROVADA em 20 de dezembro de 2016.

Dr. Raimundo Vicente de Sousa	UFLA
Dr. Márcio Machado Ladeira	UFLA
Dra. Paula Adriane Perez Ribeiro	UFMG
Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas	UFLA
Dr. Daniel Okamura	Acqua Projetos & Consultoria

Dra. Priscila Vieira e Rosa
Orientadora

LAVRAS - MG

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a DEUS, por me guiar e iluminar durante todos os dias de minha vida.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós graduação em Zootecnia, pela oportunidade concedida para a realização deste curso.

Ao CNPq (Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelas oportunidades concedidas e apoio financeiro.

À minha orientadora, Profa. Dra. Priscila Vieira Rosa, pela orientação e grande amizade, a minha profunda gratidão. Obrigado pelo seu auxílio durante todo os dez anos de UFLA.

Ao Prof. Dalton José Carneiro do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho por contribuir, de forma significativa, ao desenvolvimento do experimento, além de possibilitar a execução do trabalho com tambaqui.

Ao Prof. Dr. Mario Cesar Guerreiro do Departamento de Química- DQI, pela ajuda e acompanhamento durante a realização das análises cromatográficas; e à amiga Dra. Lidiany Mendonça Zacaroni, técnica administrativa do DQI, pela paciência e ajuda durante essas análises.

À Faculdade de Biologia da Universidade do Porto - Portugal, pelo apoio concedido para a realização do doutorado sanduíche, em especial, ao grupo de pesquisa NUTRIMU por disponibilizar a infraestrutura necessária para as análises. Ao Sr Pedro, responsável pelo laboratório de aquicultura, pelo auxílio.

Ao Prof. Dr. Aires de Oliva Teles e a Dra. Helena Peres, da Universidade de Porto, pela oportunidade de estudo e coorientação no projeto.

Aos grandes amigos e irmãos, de longa data, Leandro Santos Costa e sua esposa Paula Ribeiro, Raquel Tatiane Pereira, Tamira Orlando e Natália Murad, pelo companheirismo e distração proporcionada nas horas de trabalho e, também, nas horas de diversão. Aos amigos mais novos, mas não menos importantes, Edgar Rodrigues, Angélica Alves, Táfanie Valáscio e seu esposo Ryan Alvarenga, Ariane Franco, Shirley Paola, Saulo Almeida, Carolina Teixeira, Danielle Cristina, pelos momentos de confraternização e ajuda no desenvolvimento da tese. Todos foram de grande importância para que essa conquista fosse possível.

Aos companheiros Alexandre Diógenes e Kátia Rodrigues por ajudar na condução das análises realizadas na UPorto e, também, aos amigos Renato Leal, Francisco Júnior, Lorena, Carol, Renato Ferraz e António pela amizade e companheirismo. Nossas histórias, em Porto, estão guardadas para sempre.

A todos os amigos de pós-graduação, em especial, aos doutores Diego Costa, Martha Guevara, Daniel Okamura e Felipe Guedes de Araújo, por compartilhar seus conhecimentos e ajudar no meu direcionamento acadêmico.

Ao funcionário da Estação de Piscicultura da UFLA, Eleci Pereira, pela contribuição, amizade e momentos de descontração no setor e por tornar o trabalho mais fácil. Obrigado por todos os cafezinhos.

Aos meus pais, Gilmar Paulino e Rosana Aparecida Rosa Paulino, minha irmã Renata Rosa Paulino, seu esposo, Elias Andrade e demais familiares, por acreditarem e me apoiarem, incondicionalmente, em todas as minhas decisões. Aos meus afilhados Gabriel, Maria Eduarda e Maria Alice pelos momentos de alegria. Vocês são a base da minha vida, nada seria possível sem o amor de vocês.

À minha esposa Mayara, que sempre me apoiou em todas as decisões, sejam elas fáceis ou difíceis e por me ajudar, em todas as etapas de formação da tese, desde as análises até a redação. Com seu apoio tudo fica mais fácil.

Aos demais professores do Departamento de Zootecnia e a todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigado a todos!

RESUMO

Os peixes, assim como os outros vertebrados, não são capazes de sintetizar *de novo* os ácidos graxos da série n-6 e n-3 e, conseqüentemente, requerem sua suplementação na dieta. Diferente dos peixes marinhos, os peixes tropicais de água doce apresentam exigência de ácidos graxos linoleico (LA, C18:2n-6) e linolênico (ALA, C18:3n-3), uma vez que são capazes de alongar e dessaturar esses precursores em compostos de maior valor biológico. O LA é precursor do ARA (C20:4n-6) e o ALA do EPA (C20:5n-3) e DHA (C22:6n-3), visto que esses ácidos graxos de 18 carbonos competem pelas mesmas alongases e dessaturases. Portanto, além do fornecimento de cada precursor separado, a relação entre eles é de grande importância. Além disso, os peixes estão entre as principais fontes de EPA e DHA, na nutrição humana, que são compostos, metabolicamente, essenciais e de grande importância à manutenção da saúde. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da relação de ácidos graxos n-6/n-3 dietética no desempenho, parâmetros morfométricos, composição bromatológica, lipoproteínas plasmáticas, metabolismo energético e perfil de ácidos graxos no fígado e filé de tambaquis (*Collossoma macropomum*). Foi realizado um ensaio experimental, com dietas isoproteicas e isolipídicas, sendo seis dietas com diferentes relações LA/ALA (3,1; 3,8; 5,0; 7,2; 12,0; e 26,9) e uma dieta controle com óleo de peixe. Não foram observadas diferenças no desempenho, parâmetros morfométricos e nas lipoproteínas plasmáticas dos animais alimentados com as relações LA/ALA ou controle, exceto HDL-C, que foi menor na relação 3,8 que na 3,1 ou 5,0 ($P<0,05$). A glicemia foi maior nos peixes alimentados com a relação 7,2 ($P<0,05$). Além disso, observou-se um efeito no teor de glicose, no músculo dos tambaquis, sendo menor nos peixes alimentados com a relação 26,9 ($P<0,05$). As avaliações na composição demonstraram que a proteína na carcaça foi menor nos peixes alimentados com a dieta controle e relação 3,1 ($P<0,05$). De maneira geral, os ácidos graxos do fígado refletiram a composição de ácidos graxos da dieta. A relação LA/ALA afetou o perfil de ácidos graxos e a qualidade nutricional do filé de tambaqui. O teor de EPA diminuiu com o aumento da relação LA/ALA da dieta. A maior concentração de ARA, DHA e EPA+DHA, no filé, foi observada nos animais alimentados com a relação LA/ALA de 5,0 entre aqueles alimentados com óleo vegetal. Conclui-se que a relação LA/ALA de 5,0 é a melhor para juvenis de tambaqui, além de não afetar o desempenho ou metabolismo, tal relação melhora a qualidade nutricional do peixe para a alimentação humana.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Metabolismo lipídico. Desempenho. Peixes.

ABSTRACT

Fish, like other vertebrates, are not able to synthesize fatty acids of the n-6 and n-3 series *again*, and require supplementation in their diet. Unlike marine fish, freshwater tropical fish demand linoleic (LA, C18:2n-6) and linolenic (ALA, C18:3n-3) fatty acids, since they are capable of elongate and desaturate these precursors to compounds with higher biological value. The LA is the precursor of ARA (C20:4n-6) and ALA precursor of EPA (C20:5n-3) and DHA (C22: 6n-3), and these precursors of 18 carbons compete for the same elongases and desaturates. Therefore, besides providing each separate precursor, the relation between them is of great importance. Furthermore, fish is among the main sources of EPA and DHA in human nutrition, which are metabolically essential compounds and of great importance in health maintenance. Thus, the objective was to evaluate the effect of the ratio of n-6/n-3 fatty acids dietary on performance, morphometric parameters, bromatological composition, plasma lipoproteins, energetic metabolism and fatty acid profile in liver and fillet of tambaqui (*Colossoma macropomum*). An experimental trial was conducted with iso-protein and iso-lipidic diets, in which six diets were with different ratios of LA/ALA (3.1; 3.8; 5.0; 7.2; 12.0; and 26.9) and a control diet with fish oil. There were no differences observed in performance, morphometric parameters and plasma lipoproteins of animals fed with the LA/ALA or control ratios, except HDL-C, which was lower in 3.8 ratio than in 3.1 or 5.0 ($P<0.05$). Blood glucose was higher in the fish fed with the 7.2 ratio ($P<0.05$). Furthermore, it was observed an effect on the glucose content in the muscle of tambaqui, being lower in fish fed with the 26.9 ratio ($P<0.05$). The measurements of composition showed that the protein in carcass was lower in fish fed with the control diet and 3.1 ratio ($P<0.05$). In general, the liver fatty acids reflected the composition of fatty acids of the diet. The LA/ALA ratio affected the fatty acid profile and the nutritional quality of tambaqui fillet. The EPA content decreased with the increase of LA/ALA ratio of the dietary. The higher concentration of ARA, DHA and EPA+DHA in the fillet was observed in animals fed with the LA/ALA ratio of 5.0, among the fish fed with vegetable oil. In conclusion, the 5.0 LA/ALA ratio is the best for young tambaqui, which besides not affecting performance or metabolism, this ratio improves the nutritional quality of fish for human consumption.

Keywords: Fatty acids. Lipid metabolism. Performance. Fish.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Vias de biossíntese de PUFA em peixes. Todas as atividades foram demonstradas, em espécies de peixes teleósteos, mas não foram expressas em todas as espécies de peixe. $\Delta 4$ Fad, $\Delta 5$ Fad e $\Delta 6$ Fad são acil dessaturases; Elovl2, Elovl4 e Elovl5 são alongases de FA...28

SEGUNDA PARTE

Figure 1 - Muscle EPA and DHA content (mg per 100 g of muscle) in juvenile tambaqui fed the experimental diets for 7 weeks.69

Figure 2 - Recommendations of Tambaqui fillet consumption to meet the requirements 1.4 grams of EPA + DHA per week (200 mg daily). ..69

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1 -	Recomendações do consumo de peixes e/ou EPA+DHA para adultos saudáveis pelo governo e organizações de saúde em todo o mundo.	36
------------	---	----

SEGUNDA PARTE

Table 1 -	Composition and proximate analyses of the experimental diets. ...	54
Table 2 -	Fatty acid composition (% of total fatty acids) of the experimental diets.	55
Table 3 -	Growth performance, feed utilization, condition factor, hepatosomatic and visceral indices of juvenile tambaqui fed the experimental diets for 7 weeks.	62
Table 4 -	Whole-body (% dry matter), liver (mg g^{-1}) and white muscle (mg g^{-1}) composition of juvenile Tambaqui fed the experimental diets for 7 weeks.	65
Table 5 -	Plasma metabolism (mg dL^{-1}) of juvenile Tambaqui fed the experimental diets for 7 weeks.	66
Table 6 -	Liver fatty acid profile (% of total fatty acids) of juvenile Tambaqui fed the experimental diets for 7 weeks.	67
Table 7 -	White muscle fatty acid profile (% of total fatty acids) of juvenile Tambaqui fed the experimental diets for 7 weeks.	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ARA	Ácido araquidônico
RD	Dieta referência
DHA	Ácido docosahexaenoico
EFA	Ácidos graxos essenciais
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FA	Ácidos graxos
G6PD	Glicose 6-fosfato desidrogenase
HSI	Índice hepatossomático
LC-PUFA	Ácidos graxos altamente insaturados
LA	Ácido linoleico
ALA	Ácido α -linolênico
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
SAFA	Ácidos graxos saturados
TAG	Triacilglicerol
VO	Óleo vegetal
VSI	Índice viscerossomático

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	21
1	INTRODUÇÃO	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1	ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS À NUTRIÇÃO DE PEIXES	23
2.2	METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS EM PEIXES	26
2.3	TAMBAQUI (<i>COLOSSOMA MACROPOMUM</i>).....	33
2.4	ÁCIDOS GRAXOS NA NUTRIÇÃO HUMANA.....	34
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
	REFERÊNCIAS	41
	SEGUNDA PARTE.....	47
	ARTIGO 1 - Optimal dietary linoleic acid to linolenic acid ratio improved fatty acid profile of the juvenile tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	47
1	INTRODUCTION	51
2	MATERIAL AND METHODS	53
3	RESULTS.....	61
4	DISCUSSION.....	71
5	CONCLUSION.....	77
	REFERENCES	79

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Os peixes, assim como os demais vertebrados, não podem sintetizar *de novo* os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) da série n-3 ou n-6, tais como ácido α -linolênico (ALA, 18:3n-3) e linoleico (LA, 18:2n-6) e, conseqüentemente, requerem a suplementação desses ácidos graxos na dieta (SARGENT; TOCHER; BELL, 2002). Esses ácidos graxos de 18 carbonos são, assim, convertidos em compostos, biologicamente, ativos chamados de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA), tais como ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), docosaexaenoico (DHA, 22:6n-3) e ácido araquidônico (ARA, 20:4n-6). Tal conversão, ocorre em maior ou menor extensão, dependendo da presença e expressão de genes relacionados com o alongamento e dessaturação dos ácidos graxos (TOCHER et al., 2015).

Em nutrição, mais importante que o fornecimento de cada precursor da série n-3 e n-6, separadamente, é garantir a relação adequada entre n-6/n-3. Isso, porque a via metabólica da série n-3 produz EPA e DHA, enquanto a via de síntese da série n-6 leva à formação de ARA. Ambas as vias compartilham as mesmas enzimas, o que pode favorecer a síntese de EPA/DHA ou ARA ou até inibir tal via.

As referências em nutrição de peixes nativos, ainda, são pobres em informações sobre os requerimentos nutricionais de LA e ALA, separadamente e não há informações sobre a relação n-6/n-3 mais adequadas. O tambaqui (*Collossoma macropomum*) é uma espécie de peixe de água doce, com hábito alimentar onívoro e com crescente interesse na aquicultura brasileira. Essa espécie aceita altos níveis de fontes proteicas vegetais, na dieta, não sendo necessária a utilização de ingredientes de origem animal (VAN DER MEER et

al., 1996). Pouco se sabe sobre as exigências nutricionais dessa espécie e não há estudos sobre o efeito da relação LA/LNA. De acordo com Oliveira, Miranda e Correa (2012), há necessidade de estudar as exigências de PUFA, para o tambaqui, além de avaliar o efeito da relação de ácidos graxos das séries n-6/n-3 no desempenho e metabolismo dessa espécie.

Uma vez que se tenha informações sobre os requerimentos de ácidos graxos, formular dietas com níveis e proporções adequadas, sem, necessariamente, utilizar óleo de peixe, é possível, uma vez que fontes de óleo vegetais como a soja, linhaça e o milho apresentam em suas composições LA e ALA. Em síntese, avaliar os efeitos do LA, ALA e da relação n-6/n-3 ideal na ração é importante, para o uso inteligente das fontes lipídicas disponíveis, na formulação de dietas para tambaquis. Para um melhor entendimento sobre esse tema, variáveis acerca do crescimento, metabolismo e perfil de ácidos graxos, no fígado e filé dos peixes, serão tomadas como parâmetros de resposta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ácidos graxos essenciais à nutrição de peixes

A rápida expansão da aquicultura, nos últimos anos e o aumento, na utilização de rações formuladas, produziram um volume considerável de pesquisas sobre exigências de lipídeos na dieta de peixes. A maior parte desses trabalhos aborda a utilização de ácidos graxos essenciais e fosfolipídeos por peixes juvenis e adultos, utilizando-se o crescimento e a sobrevivência como principais parâmetros indicadores da qualidade da dieta. O alto índice de sobrevivência e a manutenção do crescimento, geralmente, indicam que a dieta satisfaz as exigências mínimas nutricionais da espécie alimentada. No entanto a sobrevivência e o crescimento podem ser insuficientes para inferir sobre a real condição de saúde dos peixes (MAITA, 2007).

Os peixes, assim como outros vertebrados, não são capazes de sintetizar *de novo* os PUFA da série n-3 e n-6 e, conseqüentemente, requerem uma suplementação dietética de ácidos graxos essenciais (EFA – *essential fatty acids*) (HENDERSON; TOCHER, 1987; NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC, 2011; SARGENT; TOCHER; BELL, 2002). Peixes não possuem as enzimas dessaturases $\Delta 12$ e $\Delta 15$, necessárias à produção de 18:2n-6 (LA-*linoleic acid*) e 18:3n-3 (ALA-*linolênic acid*), respectivamente, a partir de 18:1n-9. Porém, alguns peixes, incluindo aqueles de água doce, apresentam capacidade inata de alongar e dessaturar LA para 20:4n-6 (ácido araquidônico, ARA) e ALA para 20:5n-3 (ácido eicosapentaenoico, EPA) e, finalmente, para 22:6n-3 (ácido docosahexaenoico, DHA) (SARGENT; TOCHER; BELL, 2002).

Assim, LA e ALA são exigidos, nas dietas, para o crescimento normal, sobrevivência, estrutura e função celular, incluindo manutenção de membranas e

síntese de mediadores lipídicos (eicosanoides) em espécies de peixes de água doce (HENDERSON; TOCHER, 1987; OLSEN; RINGO, 1992; SARGENT; TOCHER; BELL, 2002). Entre os sintomas de deficiência de EFA, dois parâmetros foram reportados, em diversas espécies de peixe: lento crescimento e baixa eficiência alimentar. Outros sintomas específicos, como a necrose tanto da cauda quanto da nadadeira dorsal, necrose ou erosão da mandíbula, aumento do índice hepático, fígado pálido e inchado, também, foram relatados (SARGENT; TOCHER; BELL, 2002).

Verifica-se, portanto, que peixes alimentados com dietas, contendo diferentes fontes de ácidos graxos, podem apresentar várias alterações, no metabolismo de lipídeos, como, por exemplo, alterações na lipogênese. Além disso, os ácidos graxos desempenham outras inúmeras funções metabólicas, inclusive, no metabolismo intermediário, de carboidratos e no consumo.

Diversos estudos apontam a importância da relação n-6/n-3 no metabolismo de peixes. Trutas arco-íris, alimentadas com excesso de n-3 PUFA, em relação à sua exigência, tiveram pior desempenho e baixa eficiência alimentar (WATANABE, 1982). A competição entre os ácidos graxos n-3 e n-6 como substrato para as mesmas dessaturases, envolvida no metabolismo lipídico, foi reportado, sugerindo a importância da relação n-6/n-3 PUFA (SARGENT; TOCHER; BELL, 2002). A avaliação do efeito dos n-3 e n-6 PUFA, no metabolismo lipídico, é dificultada, uma vez que o efeito do n-3 PUFA muda com o nível de n-6 PUFA (e vice-versa) (BLANCHARD; MAKOMBU; KESTEMONT, 2008). Um dos principais indicadores do desequilíbrio entre n-6/n-3 PUFA é o aumento dos níveis de deposição lipídica no fígado (ROBAINA et al., 1998).

Os efeitos interativos entre LA e ALA dietético, também, foram observados por outros pesquisadores, os quais, também, destacaram a importância do balanço entre os n-3 e n-6 PUFA (GLENCROSS et al., 2002;

TAN et al., 2009). No entanto, junto com o desempenho, é importante avaliar o efeito da relação n-6/n-3, na deposição lipídica, composição de ácidos graxos do tecido (BLANCHARD; MAKOMBU; KESTEMONT, 2008). O balanço entre os n-3 e n-6 PUFA dietéticos são tão importantes, quanto às suas quantidades absolutas e a alteração da relação n-6/n-3 afeta a homeostase animal, bem como as respostas imunes e inflamatórias (LEAF; WEBER, 1988).

Mediante a importância da relação dos PUFA da série n-3 e n-6, faz-se necessário o estudo de sua influência na nutrição e metabolismo de peixes nativos. Além de alterar o desempenho, parâmetro tido como de primeira importância, em sistemas de produção, a relação n-6/n-3 está, diretamente, relacionada com a manutenção da saúde, alterações, em diversas funções fisiológicas e composição de ácidos graxos dos tecidos.

Os peixes são tidos como alimento de alta qualidade, uma vez que são fonte de ácidos graxos da série n-3. Observa-se, porém, que esses animais, assim como os demais monogástricos, refletem na carne a composição de ácidos graxos fornecidos na dieta, o que altera a qualidade do produto final. Estudos sobre o efeito da relação n-6/n-3, na qualidade de filé de peixes, são importantes, uma vez que se busca, cada vez mais, a produção de alimentos de qualidade para a nutrição humana.

O salmão do Atlântico (*Salmo salar L.*) é o principal representante dos peixes gordos com alta concentração de n-3 LC-PUFA. Esses peixes, quando cultivados em viveiros, são, tradicionalmente alimentados com uma dieta com altos níveis de ingredientes marinhos, óleo de peixe (OP) e farinha de peixe (FP), derivados de espécies pelágicas. Entretanto, em razão dos altos custos gerados pela inclusão de FP/OP, nessas rações, buscou-se substituí-los por ingredientes de origem vegetal, principalmente, oleaginosas, sem causar prejuízo ao crescimento. No entanto os perfis de ácidos graxos de óleos vegetais diferem dos de OP sendo mais ricos em n-6 PUFA e desprovidos de n-3 LC-PUFA e

resultam em mudanças na composição de ácidos graxos no salmão produzido em cativeiro. Conseqüentemente, o benefício nutricional, para o consumidor final, é redução na concentração de n-3 LC-PUFA na carcaça (TOCHER, 2015).

2.2 Metabolismo de ácidos graxos em peixes

Os peixes, assim como os mamíferos, podem produzir 16:1n-7 (ácido palmitoleico) e 18:1n-9 (ácido oleico), por meio da enzima $\Delta 9$ -fad microsomal (BELL; KOPPE, 2010). Nos animais, duplas ligações subsequentes são introduzidas entre a dupla ligação existente (n-9) e o terminal carboxila da molécula. Os animais são incapazes de introduzir uma dupla ligação entre a primeira dupla e o terminal metil, por não possuírem as dessaturases $\Delta 12$ e $\Delta 15$, (TOCHER, 2003). Os requerimentos de EFA, para peixes de água doce, geralmente, podem ser atendidos pela inclusão de LA e ALA em cerca de 1,0% da matéria seca da dieta (TOCHER, 2010). Enquanto LA e ALA podem ser considerados essenciais, eles devem, ainda, ser alongados e dessaturados para formar os LC-PUFA, ARA, EPA e DHA, seus produtos bioativos (Figura 1).

Existe uma clara distinção, proposta por Gurr e Harwood (1991), entre “metabólito essencial” e “nutriente essencial”, de modo que a utilização dessas terminologias, LA e ALA, deveria ser considerada nutrientes essenciais, para peixes de água doce, enquanto os LC-PUFA deveriam ser considerados metabólitos essenciais. Para peixes marinhos, ARA, EPA e DHA devem ser considerados nutrientes essenciais (PARRISH, 2009).

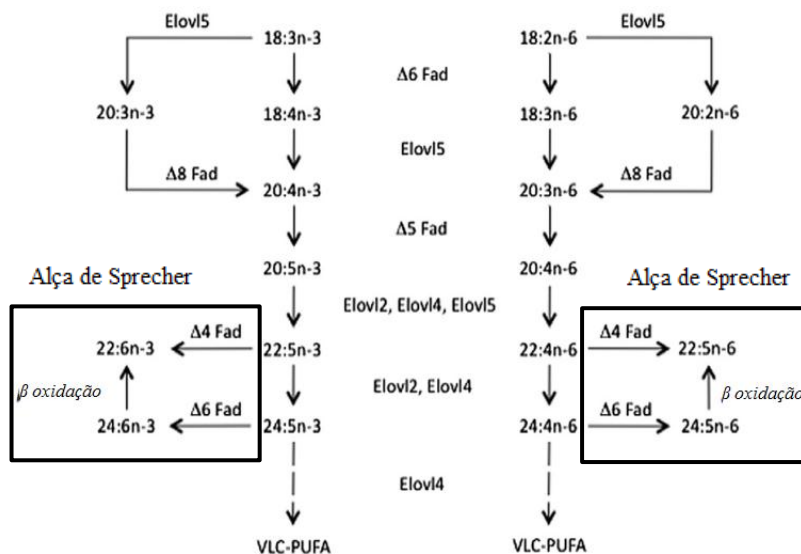
Algumas espécies de peixes, incluindo aqueles de água doce, apresentam capacidade inata de alongar e dessaturar LA para ARA e ALA para EPA e, finalmente, para DHA (SARGENT; TOCHER; BELL, 2002). O processo de dessaturação dos ácidos graxos em peixes ocorre, no retículo endoplasmático das células em tecidos particulares, por meio de um processo

aeróbico, utilizando o substrato ligado à Coenzima A e exigindo NADPH e O_2 , catalisada por um sistema de múltiplos componentes compreendendo o NADPH-citocromo b5 redutase, citocromo b5 e enzimas de dessaturação terminais (BRENNER, 1974), sendo esse processo de dessaturação de grande importância fisiológica.

O alongamento é efetuado, em quatro passos, cada um catalisado por uma enzima específica. O primeiro passo é uma reação de condensação do precursor da acil ácido graxo com o malonil-CoA, para produzir um β -cetoacil, que é, subsequentemente, hidrogenado em três passos sucessivos. A condensação determina a especificidade do substrato e é o passo limitante do processo, sendo, portanto, reconhecida como a enzima “alongase” (BELL; TOCHER, 2009).

Acredita-se que ARA, EPA e DHA sejam os principais LC-PUFA para mamíferos e peixes (PARRISH, 2009). Assim, o valor nutricional de 18:2n-6 e 18:3n-3 é inferior ao dos seus produtos de LC-PUFA, tais que o EFA é funcional no sentido de formar os LC-PUFA acima descritos. O requisito essencial, para a 18:2n-6 e 18:3n-3, foi estabelecido em truta arco-íris por Castell et al. (1972), embora a superior eficácia de EPA e DHA, na forma de óleo de salmão, na promoção do crescimento de peixes, também, foi identificada no mesmo estudo (BELL; KOPPE, 2010).

Figura 1 - Vias de biossíntese de PUFA em peixes. Todas as atividades foram demonstradas, em espécies de peixes teleósteos, mas não foram expressas em todas as espécies de peixe. $\Delta 4$ Fad, $\Delta 5$ Fad e $\Delta 6$ Fad são acil dessaturases; Elovl2, Elovl4 e Elovl5 são alongases de FA.



Fonte: Adaptado de Tocher (2015).

Com exceção do passo final de encurtamento, que ocorre no peroxissoma, todas as demais reações de alongar e dessaturar ocorrem, no retículo endoplasmático liso, pela ação das mesmas enzimas nos ácidos graxos da série n-3 e n-6, embora, geralmente, tenham maior afinidade para os da série n-3. DHA, em vez de EPA, é o principal produto final da dessaturação e alongamento de ALA, enquanto ARA, em vez de 22:5n-6, é o principal produto final do metabolismo do LA. No entanto C18 $\Delta 6$ -fad é considerado o passo limitante da via, pelo menos até ARA ou EPA (BELL; KOPPE, 2010).

De acordo com a ilustração da Figura 1, a atividade da $\Delta 8$ fad é dependente da $\Delta 6$ Fad, na maioria dos teleósteos, especialmente, em espécies marinhas (MONROIG; LI; TOCHER, 2011). Uma distinta $\Delta 5$ Fad foi isolada,

em salmão do atlântico, embora bifuncional $\Delta 6$ $\Delta 5$ Fads tenham sido caracterizadas em zebrafish, rabbitfish, *Siganus canaliculatus* e Mexican silverside (FONSECA-MADRIGAL et al., 2014; HASTINGS et al., 2001; LI et al., 2010). A presença da $\Delta 4$ fad possibilita a produção direta de DHA, por meio do EPA e foi demonstrada em rabbitfish, Senegalese sole, *Solea senegalensis* e Mexican silverside (FONSECA-MADRIGAL et al., 2014; LI et al., 2010; MORAIS et al., 2012). A alça de Sprecher, via FA intermediário de C24, foi demonstrada em truta (BUZZI; HENDERSON; SARGENT, 1997) e a $\Delta 6$ Fad em salmão do atlântico e Zebrafish pode atuar em FA de C18 e C24 (TOCHER, 2003).

Os primeiros estudos de nutrição sugeriram que LA e/ou ALA poderiam satisfazer os requerimentos de EFA, para peixes de água doce, enquanto n-3 LC-PUFA, EPA e DHA seriam necessários para satisfazer os requerimentos de EFA de peixes marinhos (SARGENT; TOCHER; BELL, 2002). Há, também, um vasto conjunto de evidências, baseado em estudos de alimentação direta, bem como naqueles com avaliação da conversão de radioisótopos administrados *in vivo* de que a conversão de 18:3n-3 e 20:5n-3 até 22:6n-3 ocorre, em muitas espécies de peixes de água doce, incluindo truta marrom (*Salmo trutta*), tilápia (*Oreochromis niloticus*) e zebrafish (*Danio rerio*) (TOCHER et al., 2001). As etapas de alongamento e de dessaturação parecem ser, qualitativamente semelhantes, às dos mamíferos (BELL; KOPPE, 2010). Estudos de conversão alimentar, realizados em experimentos com Turbot (*Scophthalmus maximus*), usando substrato radioativo *in vivo*, sugerem, fortemente, que essa espécie marinha foi incapaz de produzir EPA e ARA, com base em LA e ALA, respectivamente, embora tal experimento não tenha sido capaz de determinar, precisamente, a deficiência na via de síntese de LC-PUFA (TOCHER, 2003).

O grau, em que um animal pode realizar estas conversões, é dependente das atividades relativas de alongases de ácidos graxos e de dessaturases, tais

como $\Delta 6$ e $\Delta 5$, nos seus tecidos. Suas atividades, por sua vez, são dependentes da extensão em que a espécie pode ou não obter, facilmente, o produto final ARA, EPA e DHA pré-formado das suas dietas naturais. Por exemplo, um carnívoro estrito tal como o gato, que pode obter de forma abundante esses FA pré-formados, a partir da sua presa natural, parece faltar ou expressar muito pouca atividade da $\Delta 6$ e $\Delta 5$ fads (BELL; TOCHER, 2009).

Assinala-se que larvas e juvenis de peixes, bem como outros animais, tendem a ter uma maior exigência, para n-3 LC-PUFA, que aquelas apresentadas nos estágios posteriores de vida (SARGENT; TOCHER; BELL, 2002). Em peixes de água doce tropicais, tais como a tilápia (*Oreochromis niloticus*), as vias para a síntese de DHA foram elucidadas (OLSEN; HENDERSON; MCANDREW, 1990; TOCHER et al., 2001) e são consideradas baixas, quando comparadas, por exemplo, com os salmonídeos. Isso pode acontecer em virtude da baixa exigência de LC-PUFA dessa espécie, quando comparada com espécies de água fria. Tilápias alimentadas com dietas ricas em 18:3n-3 apresentaram aumento nas concentrações de n-3 LC-PUFA, com concomitante diminuição nas concentrações de n-6 PUFA, no músculo, embora as vias biossintéticas não estivessem, suficientemente, ativadas para aumentar n-3 LC-PUFA, nos níveis observados nos peixes alimentados com óleo de peixe (KARAPANAGIOTIDIS et al., 2007).

As mesmas enzimas dessaturases e alongases são ativas sobre os ácidos graxos das séries n-3, n-6 e n-9. Porém, em decorrência da competição entre os PUFAs n-3 e n-6, um excesso dietético de 18:3 n-3 deprime o metabolismo de 18:2n-6 e vice-versa. No entanto, na maioria, mas não em todas as espécies de peixes estudadas, a afinidade das enzimas e da via, principalmente, das dessaturases é maior para n-3 do que para n-6 e ambos são substratos preferenciais quando comparados ao n-9 (BELL; KOPPE, 2010). Uma relação PUFA n-6/n-3 desequilibrada aumenta o risco de várias doenças, além de

favorecer o aparecimento de diversos sintomas, tais como o lento crescimento, baixa eficiência alimentar, necrose tanto da cauda quanto da nadadeira dorsal, necrose ou erosão da mandíbula, aumento do índice hepático e fígado pálido e inchado (SARGENT; TOCHER; BELL, 2002). Isso ocorre pelo fato de que tanto LA quanto ALA são metabolizados pelo mesmo conjunto das enzimas dessaturase e alongases. No entanto é necessário mencionar, neste contexto, que as variações nas taxas de EPA/ARA e DHA/ARA nos tecidos também podem ocorrer por causa das variantes genéticas das dessaturases de ácidos graxos e, também, das enzimas alongases (MORALES et al., 2011).

Os ácidos graxos são importantes fontes de energia para o organismo, inclusive, os PUFA (TOCHER, 2003). A energia é gerada na forma de ATP. Uma exceção ocorre junto à molécula de DHA, a qual tende a ser conservada, ou seja, não oxidada para geração de energia, por não ser um substrato adequado para a β -oxidação (SARGENT; TOCHER; BELL, 2002). De acordo com Bell et al. (2001), existem evidências crescentes de que MUFA e SAFA são substratos preferenciais para β -oxidação em salmonídeos. Os PUFA não são utilizados, prioritariamente, com a função de armazenar energia. Eles atuam, nos parâmetros fisiológicos, pelo seu impacto sobre a fluidez da membrana celular e pela produção de eicosanoides. Os eicosanoides são uma classe de compostos bioquímicos, associados com uma ampla variedade de processos fisiológicos (TOCHER, 2015).

Mudanças, na fluidez da membrana, são importantes à adaptação hidrostática nos processos de mudança ambiental. Em baixas temperaturas, o organismo se adapta com o acréscimo na quantidade de PUFA, na membrana celular, aumentando, assim, a sua fluidez e, por conseguinte, diminuindo a temperatura de congelamento. Portanto o PUFA atua como agente anticongelante da membrana celular (BRETT; MÜLLER-NAVARRA, 1997; NRC, 2011).

Os eicosanoides são uma classe de compostos que incluem as prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas, oriundos dos LC-PUFA. São compostos altamente bioativos, com atuação autócrina. Não são armazenados e têm um tempo de meia-vida extremamente curto. São produzidos em pequenas quantidades em quase todos os tecidos. Possuem uma vasta gama de ações fisiológicas, que atuam, por exemplo, nos processos de coagulação sanguínea, resposta imune, resposta inflamatória, tônus vascular, função renal, função neural e reprodução (SARGENT; TOCHER; BELL, 2002).

Na formação dos eicosanoides, a via seguida pelo ARA e EPA é basicamente, a mesma. Porém o tromboxano formado, a partir do ARA (denominado TXA₂), é um potente vasoconstritor e promove um aumento da agregação plaquetária, enquanto o tromboxano formado pelo EPA (denominado TXA₃) atua como vasodilatador, diminuindo a agregação plaquetária (SCHMITZ; ECKER, 2008).

Os ácidos graxos da série ômega-3 atuam, também, como sinalizadores intracelulares, suprimem a expressão de genes envolvidos na lipogênese e induzem a transcrição de genes envolvidos na oxidação lipídica e termogênese (GRIMM et al., 2002). Em mamíferos, observa-se que os PUFA podem regular a expressão de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídeos, como o da glicocinase hepática, piruvato quinase, piruvato desidrogenase, acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintetase, por fatores de transcrição como SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Proteins*) e PPAR (WORGALL et al., 1998). Estão, portanto, diretamente, envolvidos no metabolismo intermediário.

Estudos têm demonstrado que a atividade de enzimas lipogênicas hepáticas é modificada pela substituição total ou parcial do óleo de peixe por óleos vegetais na dieta. Dentre elas, a ácido graxo sintetase (FAS – *fatty acid synthase*), diretamente, responsável pela produção de ácidos graxos, a glicose-6-

fosfato desidrogenase (G6PD) e enzima málica (EM), as quais são fornecedoras de NADPH, estão incluídas nesse contexto (MENOYO et al., 2004). Em peixes, o EPA e o DHA parecem inibir a lipogênese em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e em salmão (*Salmo salar*) (ALVAREZ et al., 2000; MENOYO et al., 2006). A lipogênese em tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*) e pacu, também, é influenciada pela composição lipídica da dieta (RIBEIRO et al., 2008).

2.3 Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Cuvier, 1818) pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, que inclui as piranhas, a pirapitinga e os pacus. É uma das principais espécies da piscicultura brasileira e é reconhecido como um alimento de primeira classe tendo boas perspectivas no mercado nacional e internacional (GOMES; SIMÕES; ARAUJO-LIMA, 2010). A espécie foi disseminada, praticamente, em todo o Brasil, apesar de temperaturas abaixo de 20°C serem limitantes ao seu crescimento e bem-estar (OLIVEIRA; MIRANDA; CORREA, 2012). Atualmente, é a segunda espécie mais cultivada no Brasil (BRASIL, 2011).

Essa espécie apresenta hábito alimentar onívoro e possui um comportamento oportunista: quando as frutas e sementes não estão disponíveis, ela se alimenta de itens de origem animal, particularmente, zooplâncton (SILVA; PEREIRA FILHO; OLIVEIRA-PEREIRA, 2000). Em sistemas de produção, o ciclo de cultivo compreende duas fases: recria (até 45g) e engorda (OLIVEIRA; MIRANDA; CORREA, 2012). A quantidade de proteína nas rações varia de 19% a 40%, enquanto a energia é em torno de 12 a 17kJ/g. Essas dietas são mais ricas em proteína que a dieta natural (GOMES; SIMÕES;

ARAUJO-LIMA, 2010). Em geral, o peso comercial é acima de 1kg (OLIVEIRA; MIRANDA; CORREA, 2012).

Estudos demonstram que o tambaqui aproveita, eficientemente, lipídeos e carboidratos como fonte energética e, portanto, para uma maior eficiência alimentar da espécie, recomenda-se um teor de lipídeos entre 6% a 11% da dieta (OLIVEIRA; MIRANDA; CORREA, 2012). Em relação aos ácidos graxos, escassos são os resultados que propiciem informações aplicáveis aos sistemas de produção. Assim, existe a necessidade de estudos que avaliem as exigências de ácidos graxos essenciais, para o tambaqui, com o objetivo de permitir a formulação de dietas que atendam à demanda nutricional dessa espécie.

2.4 Ácidos graxos na nutrição humana

As alterações relacionadas ao consumo da dieta ocidental são caracterizadas pelo aumento do consumo de gordura saturada (especialmente vinda da carne), óleos vegetais ricos em LA e por um lado uma diminuição global no consumo de n-3 PUFA em relação ao n-6 PUFA. Isto se deve, principalmente, ao consumo insuficiente de peixes gordos, baixo consumo de nozes, sementes e cereais integrais na alimentação e uso preferencial de óleos vegetais pobres em n-3 PUFA. Como resultado, o consumo de n-6 PUFA tornou-se, progressivamente, muito mais elevado que a dos n-3 PUFA, de modo que as dietas ocidentais apresentam uma proporção de n-6/n-3 que varia de 10/1 a 20/1, visto que uma proporção de 1/1 era encontrada nas dietas dos nossos antepassados (MOLENDI-COSTE; LEGRY; LECLERCQ, 2011). Portanto essa nova relação n-6/n-3 é contraditória à nossa genética, estabelecida para uma taxa de 1:1 (KANG, 2008).

Verifica-se que os FA das séries n-6 e n-3 são essenciais para o desenvolvimento e crescimento. Os ácidos graxos, altamente insaturados, EPA e

DHA, são metabolitos do ALA. Já o LA é o precursor chave para a formação do ARA, predominante na dieta ocidental. A enzima Δ -6 fad desempenha papel fundamental, uma vez que tem maior afinidade para ALA do que para LA, inibindo, competitivamente, a formação dos seus derivados insaturados (CANDELA; LÓPEZ; KOHEN, 2011). O coeficiente de conversão de LA para ARA no fígado é muito menor do que para o DHA formado a partir do ALA (GAO et al., 2011). No entanto os tipos de dietas acima mencionadas ricas em LA estão, habitualmente, associados a um aumento do risco de doenças crônico-degenerativas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, doenças autoimunes, alguns tipos de câncer, doença degenerativas (DAS, 2006). Evidências indicam que o consumo de dietas com baixos níveis de alimentos marinhos e seus 20 e 22 n-3LC-PUFA estão associados a sérias doenças no mundo. Neste contexto, evidências experimentais indicam que a razão ótima entre estes ácidos deve estar perto de 4:1-5:1 e não deve ser superior a 10:1 (RUSSO, 2009).

Nos seres humanos, a atividade das dessaturases Δ 5 e Δ 6 e, assim, a taxa de conversão de ALA em EPA/DHA, é baixa. Apenas de 5-10% são convertidos em EPA e um mínimo de 2-5% para DHA. O processo de conversão parece ser mais eficiente em mulheres. Além disso, esse processo pode ser modulado por fatores genéticos e ambientais e cofatores dietéticos, incluindo o magnésio, zinco e vitamina B6. Portanto fontes exógenas de EPA/DHA são importantes uma vez que fornecem mediadores de proteção derivados de n-3 PUFA mais potentes (MOLENDI-COSTE; LEGRY; LECLERCQ, 2011).

As recomendações de ingestão de n-3 LC-PUFA foram apresentadas por diversas organizações em todo o mundo (Tabela 1), direcionadas, geralmente, para os indivíduos saudáveis. A maioria se concentra, na prevenção primária das doenças cardíacas, enquanto outras objetivam apenas prevenir deficiências nutricionais. Algumas (por exemplo, a *American Heart Association*),

recomendam os alimentos (ou seja, óleo de peixe), enquanto outros (por exemplo, a OIM) recomendam os nutrientes. Sendo as recomendações, para peixe ou para EPA+DHA, os valores resultantes delas de EPA+DHA, normalmente, ficam entre 200 e 600 mg/d (HARRIS et al., 2009).

Um consumo adequado de ALA foi definido como, aproximadamente, 0,6% da energia pelo painel de nutriente da OIM. Isto se traduz como, aproximadamente, 0,5 g/d para crianças, 1,1 g/d para as mulheres e 1,6 g/d para os homens. O consumo adequado baseia-se no consumo médio de ALA, nos Estados Unidos, de acordo com a Pesquisa Contínua de Ingestão de Alimentos por Indivíduos (CSFII) 1994-1996 e 1998 e concomitante falta de deficiência aparente na população.

Tabela 1 - Recomendações do consumo de peixes e/ou EPA+DHA para adultos saudáveis pelo governo e organizações de saúde em todo o mundo.

Organização	Ano	Recomendação
Eurodiet Conference	2000	200 mg/dia
Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Centre national de coordination des études et recherches sur la nutrition et l'alimentation, et Centre national de la recherche scientifique (France)	2001	500 mg/dia
UK Scientific Advisory Committee on Nutrition	2004	Peixe 2x/semana (1 deve ser gordo), consumo mínimo 450 mg/dia
International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids	2004	500 mg/dia
Australian Department of Health and Ageing (Australia and New Zealand)	2005	442 mg/dia para homem, 318 mg/dia para mulher
American Heart Association	2006	Peixes 2x semana (preferencialmente gordo)
Health Council of the Netherlands	2006	Peixe 2x/semana (1 deve ser gordo), consumo mínimo 450 mg/dia
Superior Health Council of Belgium	2006	Mínimo de 0,3% da energia para adultos (667 mg/dia)
American Dietetic Association/ Dietitians of Canada	2007	Peixes 2x semana (ambos gordos) ou 500 mg/dia

Fonte: Adaptado de Harris et al. (2009).

Neste contexto, as recomendações (por exemplo), (LÓPEZ-HUERTAS, 2010) tomam em conta a frequência média de consumo semanal de EPA / DHA como duas porções de peixe (incluindo um de peixes gordos). A ingestão recomendada de EPA + DHA varia entre 200 (Reino Unido) a 680 (Bélgica) mg por dia (GIVENS; GIBBS, 2008). As recomendações da Organização Mundial de Saúde, para a população em geral, ficam na faixa de 200-1000 mg por semana (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2003). A *American Heart Association* recomenda 430 mg EPA + DHA por dia, para a população geral e 2-4 g como suplemento para indivíduos com triglicerídeos plasmático elevado (KRIS-ETHERTON et al., 2003). A Agência Europeia de Segurança Alimentar propôs rotular os valores referência de consumo de 250 mg de EPA + DHA por dia (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA, 2009). É importante ressaltar que a ingestão diária de EPA + DHA entre 250 e 500mg é nutricionalmente viável. Além do mais, uma vez que nenhum efeito adverso relevante foi, clinicamente, relatado mesmo com doses farmacológicas de 3 g por dia, não existem provas de que as doses aconselhadas acima mencionadas de EPA + DHA são prejudiciais (HARRIS et al., 2009).

O interesse industrial pelo aumento da produção de alimentos, desde os 1940s-1950s, causou a mudança na composição dos alimentos que eram, naturalmente, ricos em n-3 (carne, peixe, aves, etc.) como resultado de uma mudança na composição nutricional da ração animal empregada, diminuindo, assim, a composição de n-3 (CANDELA; LÓPEZ; KOHEN, 2011). Além disso, o teor de FAn-6 aumentou, consideravelmente, como um resultado do aumento (até 70%) na utilização de grãos ricos em n-6 e, também, com a adição de óleos vegetais (SIMOPOULOS, 2006). Atualmente, a ingestão de n-3 é muito menor em consequência da redução no consumo de peixe. Outro acontecimento importante é o fato de que a maior parte do peixe consumido vem de produções

piscícolas, em que a principal alimentação empregada apresenta baixos níveis de FA n-3 (CANDELA; LÓPEZ; KOHEN, 2011).

Os peixes marinhos, assim como os crustáceos, são considerados as principais fontes de FA n-3 para a humanidade. É indiscutível que toda a cadeia alimentar marinha favoreça a incorporação desses EFA, que se originam dos fitoplânctons e têm como elo final os peixes. Esses animais necessitam de uma suplementação dietética de n-3 LC-PUFA, para a sua saúde e, também, para a produção de produtos saudáveis (SARGENT; TOCHER; BELL, 2002; TOCHER, 2003). Já os peixes tropicais e diadromos têm capacidade inata de alongar e dessaturar os precursores para formar EPA e DHA (SARGENT; TOCHER; BELL, 2002; TOCHER, 2003). Assim, as exigências nutricionais desses peixes são de FA linoleico e linolênico. No entanto a suplementação com ALA, em algumas espécies tropicais, como a tilápia, não proporcionou níveis elevados de EPA e DHA no músculo quando comparado com animais suplementados com óleo de peixe (NG; CHONG, 2004).

A substituição na dieta de óleo de peixe por óleos vegetais pode ter efeitos deletérios, na composição de FA dos peixes, diminuindo sua qualidade nutricional em termos de n-3 LC-PUFA para o consumidor. Portanto diversos trabalhos avaliando a viabilidade dessa substituição têm sido realizados, principalmente, com a utilização de óleos vegetais ricos em ALA e 18:4n-3 (OLSEN et al., 2011).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os peixes tropicais apresentam capacidade de metabolizar os precursores n-3 PUFA para a síntese de EPA e DHA. A qualidade do produto a ser formado vai depender da capacidade desses animais em metabolizar os precursores, além da disponibilidade de n-3 e n-6 PUFA na dieta. O balanço adequado entre LA e ALA favorece a síntese e deposição de n-3 LC-PUFA, o que culmina em um produto de melhor qualidade para a nutrição humana.

O tambaqui é uma espécie nativa que apresenta grande potencial para a aquicultura nacional. No entanto há necessidade de se determinar a exigência de ácidos graxos para essa espécie. Além disso, estudos que busquem avaliar o potencial desses animais na síntese de n-3 LC-PUFA (EPA e DHA) são de grande importância.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, M. J. et al. Short-term modulation of lipogenesis by macronutrients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 84, n. 5, p. 619-628, 2000.

BELL, J. G. et al. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, n. 5, p. 1535-1543, May 2001.

BELL, J. G.; KOPPE, W. Lipids in aquafeeds. In: _____. (Ed.). **Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds**: New York: CRC, 2010. p. 21-59.

BELL, M. V.; TOCHER, D. R. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. In: _____. **Lipids in aquatic ecosystems**. New York: Springer, 2009. p. 211-236.

BLANCHARD, G.; MAKOMBU, J.G.; KESTEMONT, P. Influence of different dietary 18:3n-3/18:2n-6 ratio on growth performance, fatty acid composition and hepatic ultrastructure in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 284, n. 1, p. 144-150, 2008.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília, 2011. 60 p.

BRENNER, R. R. The oxidative desaturation of unsaturated fatty acids in animals. **Molecular and cellular biochemistry**, The Hague, v. 3, n. 1, p. 41-52, 1974.

BRETT, M.; MÜLLER-NAVARRA, D. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. **Freshwater Biology**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 483-499, Dec. 1997.

BUZZI, M.; HENDERSON, R. J.; SARGENT, J. R. Biosynthesis of Docosahexaenoic acid in Trout Hepatocytes Proceeds Via 24-Carbon Intermediates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 116, n. 2, p. 263-267, Feb. 1997.

CANDELA, C. G.; LÓPEZ, L. M. B.; KOHEN, V. L. Importance of a balanced omega 6 / omega 3 ratio for the maintenance of health: nutritional recommendations. **Nutrición Hospitalaria**, Barcelona, v. 26, n. 2, p. 323–329, 2011.

DAS, U. N. Essential fatty acids: a review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Boca Raton, v. 7, n. 6, p. 467-482, 2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the Commission related to labelling reference intake values for n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. **EFSA Journal**, Parma, v. 1176, p. 1–11, 2009.

FONSECA-MADRIGAL, J. et al. Diversification of substrate specificities in teleostei Fads2: characterization of $\Delta 4$ and $\Delta 6\Delta 5$ desaturases of *Chirostoma* estor. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 55, n. 7, p. 1408-1419, 2014.

GAO, F. et al. Retracted: Liver conversion of docosahexaenoic and arachidonic acids from their 18-carbon precursors in rats on a DHA-free but α -LNA-containing n- 3 PUFA adequate diet. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam, v. 1811, n. 7/8, p. 484-489, 2011.

GLENCROSS, B. D. et al. The effect of dietary n- 3 and n- 6 fatty acid balance on the growth of the prawn *Penaeus monodon*. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 43-51, 2002.

GOMES, L. C.; SIMÕES, L. N.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2010. p. 175-204.

GRIMM, H. et al. Regulatory potential of n-3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 87, p. S59-S67, 2002.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L. **Lipid Biochemistry: an introduction**. London: Chapman and Hall, 1991. 406 p.

HARRIS, W. S. et al. Towards establishing dietary reference intakes for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 139, n. 4, p. 804S-819S, 2009.

HASTINGS, N. et al. A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ and $\Delta 6$ activities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, n. 25, p. 14304-14309, Dec. 2001.

HENDERSON, R. J.; TOCHER, D. R. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 281-347, 1987.

KANG, J. X. Omega-6/Omega-3 fatty acid ratio is important for health. In: _____. **Wild-type food in health promotion and disease prevention**. Totowa: Humana, 2008. p. 35-49.

KARAPANAGIOTIDIS, I. T. et al. Replacement of dietary fish oils by alpha-linolenic acid-rich oils lowers omega 3 content in tilapia flesh. **Lipids**, Champaign, v. 42, n. 6, p. 547-559, 2007.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease new recommendations from the American Heart Association. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 23, n. 2, p. 151-152, 2003.

LEAF, A.; WEBER, P. C. Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 318, n. 9, p. 549-557, 1988.

LI, Y. et al. Vertebrate fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 107, n. 39, p. 16840-16845, Sept. 2010.

LOPEZ-HUERTAS, E. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. **Pharmacological Research**, London, v. 61, n. 3, p. 200-207, 2010.

MAITA, M. Fish health assessment. In: NAKAGAWA, H. et al. (Ed.). **Dietary supplements for the health and quality of cultured fish**. Cambridge: CAB International, 2007. p. 10-34.

MENOYO, D. et al. Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to the replacement of dietary fish oil by linseed and soyabean oils. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 92, n. 1, p. 41-52, July 2004.

MENOYO, D. et al. Dietary fat type affects lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and differentially regulates glucose transporter GLUT4 expression in muscle. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 261, n. 1, p. 294-304, Nov. 2006.

MOLENDI-COSTE, O.; LEGRY, V.; LECLERCQ, I. A. Why and How Meet n-3 PUFA dietary recommendations? **Gastroenterology Research and Practice**, Cairo, v. 2011, p. 1-11, 2011.

MONROIG, Ó.; LI, Y.; TOCHER, D. R. Delta-8 desaturation activity varies among fatty acyl desaturases of teleost fish: High activity in delta-6 desaturases of marine species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 159, n. 4, p. 206-213, Aug. 2011.

MORAIS, S. et al. Long chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a marine vertebrate: Ontogenetic and nutritional regulation of a fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam, v. 1821, n. 4, p. 660-671, Apr. 2012.

MORALES, E. et al. Genetic variants of the FADS gene cluster and ELOVL gene family, colostrums LC-PUFA levels, breastfeeding, and child cognition. **PloS one**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. 17181, 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of fish**. Washington: National Academy, 2011. 376 p.

NG, W. K.; CHONG, C. Y. **An overview of lipid nutrition with emphasis on alternative lipid sources in tilapia feeds**. 2004. Disponível em: <<https://cals.arizona.edu/azaqua/ista/ista6/ista6web/pdf/241.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2016.

OLIVEIRA, A. C. B.; MIRANDA, E. C.; CORREA, R. Exigências nutricionais e alimentação do Tambaqui. In: FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. (Ed.). **Nutriaqua, nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2012. v. 1, p. 231-240.

OLSEN, R. E. et al. Alternative marine resources. In: TURCHINI, G. M.; NG, W. K.; TOCHER, D. R. (Ed.). **Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds**. Boca Raton: CRC, 2011. p. 21-59.

OLSEN, R. E.; HENDERSON, R.; MCANDREW, B. The conversion of linoleic acid and linolenic acid to longer chain polyunsaturated fatty acids by Tilapia (*Oreochromis nilotica*) in vivo. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 261-270, 1990.

OLSEN, R. E.; RINGØ, E. Lipids of arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) II. Influence of dietary fatty acids on the elongation and desaturation of linoleic and linolenic acid. **Fish physiology and biochemistry**, Amsterdam, v. 9, n. 5/6, p. 393-399, 1992.

PARRISH, C. C. Essential fatty acids in aquatic food webs. In: ARTS, M. T.; BRETT, M. T.; KAINZ, M. J. (Ed.). **Lipids in aquatic ecosystems**. New York: Springer, 2009. p. 309-326.

RIBEIRO, P. A. P. et al. Efeito do uso de óleo na dieta sobre a lipogênese e o perfil lipídico de tilápias-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, p. 1331-1337, Aug. 2008.

ROBAINA, L. et al. Increase of the dietary n-3/n-6 fatty acid ratio and addition of phosphorus improves liver histological alterations induced by feeding diets containing soybean meal to gilthead seabream, *Sparus aurata*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 161, n. 1, p. 281-293, 1998.

RUSSO, G. L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 77, n. 6, p. 937-946, 2009.

SARGENT, J. R.; TOCHER, D. R.; BELL, J. G. The Lipids. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Ed.). **Fish nutrition**: New York: Academic, 2002. p. 182-259.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 147-155, 2008.

SILVA, J. A. M. D.; PEREIRA FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. D. Seasonal variation of nutrients and energy in tambaqui's (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) natural food. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 60, p. 599-605, 2000.

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 60, n. 9, p. 502-507, 2006.

TAN, X. Y. et al. Effect of dietary linolenic acid/linoleic acid ratio on growth performance, hepatic fatty acid profiles and intermediary metabolism of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 296, n. 1/2, p. 96-101, Nov. 2009.

TOCHER, D. R. et al. Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 309-320, 2001.

TOCHER, D. R. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 717-732, Apr. 2010.

TOCHER, D. R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. **Reviews in Fisheries Science**, Berlin, v. 11, n. 2, p. 107-184, 2003.

TOCHER, D. R. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 449, p. 94-107, 2015.

VAN DER MEER, M. B. Feed consumption, growth and protein utilization of *Colossoma macropomum* (Cuvier) at different dietary fish meal / soya meal ratios. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 27, n. 7, p. 531-538, 1996.

WATANABE, T. Lipid nutrition in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Oxford, v. 73, n. 1, p. 3-15, 1982.

WORGALL, T. S. et al. Polyunsaturated fatty acids decrease expression of promoters with sterol regulatory elements by decreasing levels of mature sterol regulatory element-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 40, p. 25537-25540, Oct. 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Gêneva, 2003. (WHO Technical Report Series, 916). Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42665/1/WHO_TRS_916.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2017.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO 1****Optimal dietary linoleic acid to linolenic acid ratio improved fatty acid profile of the juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*)**

Renan Rosa Paulino^a, Raquel Tatiane Pereira^a, Táfanie Valascio Fontes^a, Aires Oliva-Teles^b, Helena Peres^b, Dalton José Carneiro^c, Priscila Vieira Rosa^a

^a *Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, Brazil*

^b *Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal*

^c *Departamento de Zootecnia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP, Brazil.*

Correspondence: P. Rosa. Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil. Email: priscila@dzo.ufla.br

ABSTRACT

The present study aimed to determine the effect of dietary LA/ALA ratios on growth performance, feed utilization, plasma metabolite profiles and muscle and liver fatty acid profile of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. Six diets were formulated to contain incremental levels of corn oil (rich in LA) from 0 to 7% at the expense of linseed oil (rich in ALA), resulting in six dietary treatments with LA to ALA ratios ranging from 3.1 to 26.9. Fish oil was used for the seventh diet (reference). Sextuplicate groups of fish (initial body weight 43 g) were fed each diet for 49 days. At the end of the trial, dietary LA/ALA ratio did not affect growth performance, feed utilization and plasma metabolite profile, except for HDL-C that was lower in fish fed the 3.8 LA/ALA diet than those fed the 3.1 or 5.0 LA/ALA diets. Whole-body protein content was lower in fish fed reference and 3.1 LA/ALA diets. Liver and muscle composition was unaffected by the dietary treatment, but generally, liver and muscle FA compositions reflected dietary FA profile. EPA content of muscle decreased with the increase of LA/ALA ratio ($P < 0.05$). In particular, fish fed with the 5.0 LA/ALA diet showed the highest concentration of muscle ARA, EPA+DHA and DHA (arachidonic acid, 20:4n-6, eicosapentaenoic acid, 20:5n-3, and docosahexaenoic acid, 22:6n-3, respectively) than with the other vegetable oils diets, but lower than that with the fish oil based diet. In conclusion, the dietary LA/ALA ratio of 5.0 increased the muscle DHA and ARA content, suggesting an improvement of the nutritional quality of tambaqui.

1 INTRODUCTION

Fish, like other vertebrates, cannot synthesize de novo n-3 or n-6 series of C18-polyunsaturated fatty acids (PUFA), such as α -linolenic acid (ALA, 18:3n-3) and linoleic acid (LA, 18:2n-6), and consequently require a dietary supply of essential fatty acids (EFAs) (Henderson and Tocher, 1987; Sargent et al., 2002). The dietary C18-PUFA are then converted into the biologically active LC-PUFA (namely, eicosapentaenoic acid, EPA, 20:5n-3; and docosahexaenoic acid, DHA and 22:6n-arachidonic acid, ARA, 20:4n-6; 3) to a greater or less extent depending upon the presence and expression of genes of fatty acid desaturation and elongation (Tocher et al., 2015). Contrarily to marine fish marine species, that requires a dietary source of LC-PUFA, tropical freshwater species can convert the C18 PUFA into the LC-PUFA and EFA requirements can be satisfied generally by LA and ALA at around 1.0% of the diet dry weight (Tocher, 2010; Tocher et al., 2015). Due to the importance of n-3 LC-PUFA (EPA and DHA) on human health and well-being (Calder, 2014), the rate of this bioconversion is of paramount importance in determining the final nutritional quality of aquaculture products. The recommendations for consumption of EPA + DHA are normally between 200 and 600 mg per day (Harris et al., 2009), and fish and seafood are the unique and rich source of these FA.

In freshwater species, the extension of bioconversion of PUFA into LC-PUFA may be modulated by the dietary FA profile. The same elongase and desaturase enzymes are active on the n-3, n-6, and n-9 FA series, but due to competition between the n-3 and n-6 PUFA, a dietary excess of linoleic acid (LA) will depress metabolism of α -linolenic acid (ALA), and vice versa (Bell and Koppe, 2010). Therefore, the conversion of ALA to n-3 LC-PUFA is affected by the total dietary supply of LA (Tocher, 2003), being needed to optimize the dietary balance of LA/ALA to guarantee the maximum n-3 LC-

PUFA synthesis. Other studies in fish have demonstrated that different LA/ALA ratios influenced the growth performance of yellow catfish (Tan et al., 2009), the FA metabolism of rainbow trout (Thanuthong, 2011) and Murray cod (Senadheera, 2010), the immune response of juvenile grouper (Wu, 2012), the reproduction of the Japanese eel (Furuita, 2007), the tissue FA deposition of *Cyprinus Carpio* (Tian et al., 2015), and immunity and absorptive capacities in the mucosa intestine of Grass carp (Zeng et al., 2015; Zeng et al., 2016).

Tambaqui (*Colosoma macropomum*) is a freshwater species of fish, omnivorous, with increasing interest in Brazilian aquaculture. Tambaqui accepts high levels of vegetable protein sources, and dietary animal sources is not necessary. (Van der Meer et al., 1996). Juvenile of this specie showed better performance feeding diets with a minimum of 30% crude protein (Van der Meer et al., 1995). Little is known on nutrition of this Brazilian's fish about the nutritional requirements of LA and ALA and there are no studies on the effect of n-6/n-3 ratios. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of dietary LA/ALA ratios on growth performance, carcass composition, plasma lipoprotein and fatty acid profile of muscle and liver of juvenile tambaqui.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Experimental diets and feeding trial

Seven isoprotein and isolipid diets were formulated according the tambaqui's nutritional requirements based on de Almeida et al. (2011) (Table 1). Reference diet (RD) was formulated to contain 35% protein of vegetable sources and 7% lipid of fish oil (FO). Six other diets were formulated similar to reference, but with a different n-6/n-3 ratio by change the vegetable oils (VO) source (Table2). Incremental addition of corn oil (rich LA) at the expense of linseed oil (rich in ALA) resulted in six dietary treatments with LA to ALA ratios ranging from 3.2 to 26.9. Palm oil was add to maintain saturated FA level constant among diets, except for reference diet. All ingredients were ground, weighed, mixed in an automatic paddle mixer (Inbramaq®, São Paulo, Brazil), extruded in a single-screen extruder (Inbramaq®, São Paulo, Brazil) in pellets of 4 mm, and dried for 12 h by oven-drying at 50° C. Dietary oil was incorporated to the dried pellets, at the end of the extrusion process, by manual spraying method. Experimental diets were manufactured at the Laboratory of Aquaculture (LAQUA) of the Federal University of Minas Gerais, UFMG.

Table 1 - Composition and proximate analyses of the experimental diets.

	Reference	Dietary LA/ALA ratio					
		3.1	3.8	5.0	7.2	12.0	26.9
Ingredients (% dry weight)							
Soybean meal ¹	37	37	37	37	37	37	37
Corn meal ²	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2
Soy protein concentrate ³	15	15	15	15	15	15	15
Wheat Flour ⁴	10	10	10	10	10	10	10
Fish oil ⁵	7.0	-	-	-	-	-	-
Linseed oil ⁶	-	6.3	5.0	3.8	2.5	1.3	-
Corn Oil ⁶	-	-	1.4	2.8	4.2	5.6	7.0
Palm oil ⁶	-	0.7	0.6	0.4	0.3	0.1	-
Yeast ⁷	5	5	5	5	5	5	5
Dicalcium phosphate ⁸	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Mineral and Vitamin mix ⁹	1	1	1	1	1	1	1
L-Lysine HCl ¹⁰	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
DL-Methionine ¹¹	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
L-threonine ¹⁰	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Antioxidant BHT	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Proximate composition (% dry weight)							
Dry Matter	90.9	91.3	90.8	90.6	91.1	91.1	91.1
Crude protein	36.2	35.9	36.0	36.2	36.1	35.4	36.5
Crude lipid	7.9	8.1	7.0	7.1	7.2	7.4	8.0
Ash	5.7	5.6	5.7	5.6	5.6	5.8	5.9
Energy (MJ/kg)	20.9	20.3	21.0	20.6	20.3	19.9	20.7

¹ Crude protein 60%, Crude lipids 1.8 %, dry matter 12.5% Cargill, SP, Brazil

² Crude protein 7.9%, Crude lipids 3 %, dry matter 13.9% Bioquima, MG, Brazil

³ Crude protein 46%, Crude lipids 3 %, dry matter 12.5% Cargill, SP, Brazil

⁴ Crude protein 14%, crude fiber 11%, lipids 3 %, dry matter 13.5% Bioquima, MG, Brazil

⁵ Refined oil Total Alimentos, MG, Brazil

⁶ Refined oil Mundo dos Óleos, DF, Brazil

⁷ From *Saccharomyces cerevisiae* Grupo Ullmann, MG, Brazil

⁸ Nutrimix, MS, Brazil

⁹ Mix Vita/Min Omnivorous fish 5kg/ton Cargill, SP, Brazil

¹⁰ Ajinomoto, SP, Brazil

¹¹ Evonik, SP, Brazil

Table 2 - Fatty acid composition (% of total fatty acids) of the experimental diets.

	Reference	Dietary LA/ALA ratio					
		3.1	3.8	5.0	7.2	12.0	26.9
C14:0	3.5	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0
C16:0	21.2	12.6	12.5	12.6	12.7	12.6	12.7
C16:1	4.7	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C17:0	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C18:0	4.9	3.8	3.5	3.1	2.9	2.6	2.4
C18:1n9c	22.7	25.5	27.2	28.5	30.1	31.4	32.6
C18:2n-6c	16.7	42.0	43.1	44.4	45.4	46.8	48.3
C18:3n-6	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0
C18:3n-3	1.6	13.4	11.2	8.9	6.3	3.9	1.8
C20:0	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4
C20:1	0.8	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C20:4n-6	1.0	-	-	-	-	-	-
C20:5n-3	5.1	-	-	-	-	-	-
C22:0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2
C22:6n-3	8.1	-	-	-	-	-	-
C24:0	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Σ SAFA	32.6	17.5	17.1	16.7	16.7	16.3	16.0
Σ MUFA	28.6	25.9	27.7	29.0	30.5	31.9	33.1
Σ PUFA	32.8	55.5	54.3	53.4	51.7	50.7	50.1
Σ n-6	16.9	42.1	43.2	44.5	45.4	46.8	48.3
Σ n-3	6.7	13.4	11.2	8.9	6.3	3.9	1.8
LA/ALA	10.4	3.1	3.8	5.0	7.2	12.0	26.9

Palm oil was added to the total lipid content to adjust saturated fatty acids on Linseed oil treatment. Σ SAFA: sum of saturated fatty acids; Σ MUFA: sum of monounsaturated fatty acids; Σ PUFA: sum of polyunsaturated fatty acids.

2.2 Animal and experimental conditions

The experiment was conducted according to the Ethics Committee of Animal Welfare of the Federal University of Lavras, protocol number 036/2015. Feeding trial was conducted at the Fish Laboratory of the Federal University of

Lavras, UFPA, Brazil, and experimental facilities consisted in an indoor thermoregulated recirculation water system, equipped with 42 fiberglass tanks (100-litre capacity each), and supplied with a continuous flow of aerated, filtered (sand filter and biofilters) and ultraviolet sterilized water. During the trial, water quality was monitored daily to support optimal conditions and welfare for Tambaqui; dissolved oxygen averaged 3.7 ± 0.6 mg/L, total ammonia 0.24 ± 0.20 ppm, pH 6.31 ± 0.32 and temperature $28.0 \pm 0.41^\circ\text{C}$.

Tambaqui juveniles were obtained from Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista (UNESP) and acclimated to the rearing conditions for 15 days. Then, fish were randomly distributed into 42 groups of 10 fish each (42-g mean initial weight) by each tank. Experimental diets were randomly assigned to six of these groups, and were hand-fed to apparent visual satiation, twice a day, during 49 days.

2.3 Sampling

At the end of the feeding trial, fish feeding was discontinued 24 h before sampling. All fish were counted and weighted. Two fish per tank were randomly selected. Blood samples were obtained from the caudal vasculature with heparinized needles and blood glucose was analyzed using a digital glucometer (Accu-Check® Performa, Roche, Brazil). Plasma was recovered after centrifugation (1,000g, 10 min), used to quantify total protein by refractometer and stored at -80°C until analysis. Then, fish was killed by an overdose of 2-phenoxyethanol (1:500 v/v, Fluka; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and rinsed in distilled water to remove residual anesthetic. Length, and whole fish, viscera and liver weights of these fish were recorded for determination of condition factor (CF), hepatosomatic index (HSI) and viscerosomatic index (VSI). Liver and

dorsal white muscle of these fish were collected and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analyses were performed.

2.4 Analytical methods

2.4.1 Proximate analysis

Chemical composition of ingredients, diets and carcass were analyzed according to AOAC methods (AOAC 2005). In fillet, measurement of crude lipid was made to calculating EPA and DHA recommendations. Briefly, moisture was determined after drying at $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h; ash by incineration in a muffle furnace at $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h; crude lipid by petroleum ether extraction in a Soxtec System; crude protein (N-6.25) by the Kjeldahl method after acid digestion using a Kjeldahl System. Gross energy of diets was determined by direct combustion in an adiabatic bomb calorimeter.

2.4.2 Plasma metabolites

Commercial kits (Labtest Diagnóstica SA) were used to quantify TAG (Triglycerides Liquiform, Cat. 87), cholesterol (Cholesterol Liquiform, Cat. 76), HDL-cholesterol (HDL-C LE, Cat. 98) and LDL-cholesterol (LDL-C Liquiform, Cat. 111) lipoproteins in plasma samples. All samples were measured in triplicate in a 96-well plate and read in a spectrophotometer (Multiskan GO, Thermo Scientific, USA).

2.4.3 Liver and muscle composition

Liver and muscle homogenates were obtained according to Costa et al. (2015) with slight modifications. White muscle and liver samples homogenized in ice-cold deionized water, centrifuged ($13,400 \times g$, 10 min; 4°C) and the resultant supernatant collected and stored at -80°C. Glucose and triglyceride levels were measured by commercial kits (Glucose HK Liquiform, Cat. 85 and Triglycerides Liquiform, Cat. 87) and soluble protein content was determined according to Bradford, (1976), using bovine serum albumin solution as a standard.

2.5 Fatty acid profile analysis

Lipid extraction and FA profile of diet, liver and muscle were analyzed according to Araujo et al. (2016). Briefly, total lipid was extracted using a modification of the method from Folch et al. (1957). FA profile was determined using a GC2010 gas chromatograph (GC) (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a flame ionization detector (FID) and a SP-2560 fused silica capillary column (100.0 m \times 0.25 mm, 0.20 μ m film; Supleco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Fatty acid peaks were integrated using GC solution chromatography software (version 4.02), and peaks were identified by comparison to known standards (37 Component FAME Mix; Supelco, Sigma-Aldrich). The total lipids on fillet composition was used to express the amount of milligrams of EPA, DHA and EPA+DHA in 100 grams of fillet and fillet consumption recommendation.

2.6 Statistical analysis

Results are presented as the mean \pm pooled standard of mean. The statistical evaluation of data was done by one-way analysis of variance (ANOVA) after testing for normality and homogeneity of variances with Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Regression analysis was done on dietary n3 between VO diets. Percentage data were transformed to square-root arcsine values to homogenize variance. Contrasts were used to test differences in RD and VO diets. Significant differences among means were determined using Tukey's HSD test. A probability level of 0.05 was used to reject the null hypothesis. Statistical analyses were carried out using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0 (Armonk, NY, USA).

3 RESULTS

Practical diets were made with vegetable ingredients to have minimal n-3 content and no fishmeal or fish oil. Reference diet (RD) was formulated with fish oil and characterized by a higher content of n-3 LC-PUFA, mainly represented by EPA (5.1%) and DHA (8.1%). In the other six experimental diets with LA/ALA ratio, the concentrations of saturated fatty acid (SFA), monounsaturated fatty acids (MUFA) and PUFA were similar and the only variation in the actual LA and ALA content.

Data on growth performance and feed efficiency is presented in Table 3. The overall mortality was low and did not seem to be affected by the dietary treatment. Fish showed good growth performance with a daily growth index (DGI) ranging from 3.3 and 3.5%. No significant differences in final weight, DGI, protein efficiency ratio, feed efficiency, survival, CF, HSI or VSI were observed among treatments. Feed intake was lower for fish fed 7.2 than 3.1 LA/ALA diets.

Table 3 - Growth performance, feed utilization, condition factor, hepatosomatic and visceral indices of juvenile tambaqui fed the experimental diets for 7 weeks.

	Reference	Dietary LA/ALA ratio						SEM	<i>p</i> -value	Contrast RD x VO
		3.1	3.8	5.0	7.2	12.0	26.9			
Initial body weight (g)	43.0	42.9	43.1	42.9	42.9	42.8	42.5	0.1	0.695	ns
Final body weight (g)	144.7	141.7	139.4	134.1	135.4	133.7	135.5	2.8	0.675	ns
Weight gain (g kg ABW ⁻¹ day ⁻¹)	21.9	21.7	21.4	20.9	21.0	20.9	21.1	0.3	0.858	ns
Daily growth index (%) ¹	3.5	3.5	3.4	3.3	3.3	3.3	3.3	0.1	0.789	ns
Feed intake (g kg ABW ⁻¹ day ⁻¹)	23.40 ^{ab}	23.43 ^b	23.31 ^{ab}	22.85 ^{ab}	22.0 ^a	23.29 ^{ab}	23.31 ^{ab}	0.2	0.038	ns
Feed efficiency ratio ²	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	0.9	0.9	0.0	0.370	ns
Protein efficiency ratio ³	2.6	2.6	2.5	2.5	2.6	2.5	2.5	0.0	0.215	ns
Survival	97	98	100	98	100	97	100	0.0	0.617	ns
Condition Factor ⁴	3.3	3.5	3.3	3.3	3.4	3.3	3.2	0.0	0.404	ns
HSI ⁴	2.2	2.3	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	0.0	0.141	ns
VSI ⁵	6.3	6.9	6.5	6.3	6.3	6.6	6.5	0.1	0.212	ns

Values are means of six tanks. SEM is pooled of standard error of mean. Mean in the same row with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$). Average body weight (ABW): (initial body weight + final body weight)/2. ns: not significant. RD: Reference diet. VO: Vegetal oil diet. ¹ DGI: ((final body weight^{1/3}-initial body weight^{1/3})/time in days)x100. ² FER: (wet weight gain/dry feed intake). ³ PER: (wet weight gain/dry crude protein intake). ⁴ Hepatosomatic index: (liver weight/body weight) x 100. ⁵ Visceral index: (viscera weight/body weight) x 100

At the end of the trial, whole-body protein content of fish the reference and 3.1 LA/ALA ratio diets was lower than in the other groups, and moisture content of fish fed the reference diet was higher than in fish fed the 5.0 LA/ALA (Table 4). Further, RD showed higher protein content than VO diets. No differences among groups in liver and muscle composition were noticed, except the muscle glucose content that was lower in fish fed the 26.9 LA/ALA diet that with the 3.1, 5.0, 7.4 and 12.0 LA/ALA diets (Table 4).

Plasma cholesterol, triglycerides, LDL-C and protein showed no significant difference among treatments. By contrast, cholesterol and LDL-C were higher to fish fed RD than VO diets. Plasma HDL-C was lower in fish fed 3.8 LA/ALA diet than those fed the 3.1 LA/ALA diet and plasma glucose was higher in 7.2 LA/ALA group than in reference and 3.1 LA/ALA groups (Table 5).

Liver FA profile was significantly affected by dietary treatment (Table 6). Fish fed reference diet showed lowest LA and ARA than VO diets. In contrast, the highest hepatic content of EPA, DHA, total LC-PUFA, and total n-3 were observed in fish fed the RD. Among the VO based diets, increasing dietary ALA linearly increased ALA ($R^2=0.854$; $P<0.001$) and EPA ($R^2=0.882$; $P<0.001$) in liver, and was observed a quadratic effect of DHA content ($R^2=0.861$; $P<0.001$).

The muscle fatty acid profile is presented in Table 7. Higher contents of EPA, DHA and total LC-PUFA in fish muscle was recorded in fish fed the RD. Muscle ALA ($R^2=0.921$; $P<0.001$) and EPA ($R^2=0.891$; $P<0.001$) increased with the increase of dietary ALA in fish fed VO diet. No significant difference were observed on LA and total n-6 FA in muscle among fish fed the VO diets. Furthermore, DHA ($R^2=0.943$; $P<0.01$) showed a quadratic effect with increased dietary ALA. Based on the quadratic regression analysis of DHA, with the equation $y=-0.0020x^2+0,0350x$, optimal ALA/LNA ratio for maximum DHA

deposition on muscle of juvenile tambaqui was estimated to be 5.09. Similarly, expressed in mg per 100 g of muscle, the amount of DHA and EPA+DHA of fish fed were greater for 3.8 and 5 LA/ALA diets (Figure 1), although no differences were observed between 3.1, 7.2 and 12.0 dietary LA/LNA ratio. The recommendation of fillet consumption to obtain 200mg of EPA+DHA (1.4 g per week) of tambaqui juvenile is showed in Figure 2. Among VO, the lowest recommendation of fillet consumption was observed in 5.0 LA/ALA diet, although it is not statistically different of 3.1, 3.8 or 7.2 LA/ALA diets.

Table 4 - Whole-body (% dry matter), liver (mg g⁻¹) and white muscle (mg g⁻¹) composition of juvenile Tambaqui fed the experimental diets for 7 weeks.

	Reference	Dietary LA/LNA ratio						SEM	<i>p</i> -value	Contrast RDxVO
		3.1	3.8	5.0	7.2	12.0	26.9			
Moisture	70.1 ^b	69.5 ^{ab}	68.1 ^{ab}	67.6 ^a	68.9 ^{ab}	69.5 ^{ab}	68.4 ^{ab}	0.2	0.029	*
Lipid	30.2	29.3	30.8	29.6	30.3	29.5	31.3	0.4	0.748	ns
Protein	60.6 ^a	60.9 ^a	65.7 ^b	65.7 ^b	65.9 ^b	67.1 ^b	65.6 ^b	0.2	0.000	**
Ash	12.7	13.0	13.0	12.8	12.6	12.8	13.1	0.1	0.915	ns
Liver composition										
Triglycerides	14.4	14.2	13.7	13.8	12.9	14.1	13.3	0.3	0.934	ns
Glucose	15.3	15.6	14.0	12.7	12.9	14.6	15.7	0.5	0.380	ns
Protein	123.2	114.4	103.7	109.6	109.4	102.6	114.8	2.2	0.158	ns
Muscle composition										
Triglycerides	1.0	1.1	1.2	1.3	1.2	1.0	1.1	0.0	0.390	ns
Glucose	0.8ab	0.9b	0.8ab	1.0b	1.0b	1.0b	0.6a	0.0	<0.001	ns
Protein	42.8	39.9	43.3	45.8	50.2	48.6	45.9	1.6	0.633	ns

Values are means of six tanks. SEM is pooled of standard error of mean. Contrast test: *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ns: not significant. Mean in the same row with different letters are significantly different (P < 0.05). RD: Reference diet. VO: Vegetal oil diet.

Table 5 - Plasma metabolism (mg dL⁻¹) of juvenile Tambaqui fed the experimental diets for 7 weeks.

	Dietary LA/ALA ratio							SEM	<i>p-value</i>	Contrast RDxVO
	Reference	3.1	3.8	5.0	7.2	12.0	26.9			
Cholesterol	128.0	121.8	115.4	113.9	117.0	107.6	116.8	1.9	0.127	*
Triglycerides	296.8	300.2	312.2	307.3	353.6	307.0	313.8	8.5	0.628	ns
HDL-C	9.8 ^{ab}	11.8 ^b	7.1 ^a	12.6 ^b	9.5 ^{ab}	10.1 ^{ab}	10.7 ^{ab}	0.4	0.009	ns
LDL-C	46.5	38.1	41.4	37.7	40.0	41.1	38.8	1.0	0.397	*
Protein (g dL ⁻¹)	5.2	5.1	5.2	5.3	5.1	5.0	5.1	0.0	0.682	ns
Glucose	55.0 ^a	54.8 ^a	56.4 ^{ab}	60.1 ^{ab}	69.8 ^b	61.3 ^{ab}	55.6 ^{ab}	1.4	0.023	ns

Values are means of nine fish. SEM is pooled of standard error of mean. Contrast test: *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ns: not significant. Mean in the same row with different superscript letters are significantly different (P<0.05). RD: Reference diet. VO: Vegetal oil diet.

Table 6 - Liver fatty acid profile (% of total fatty acids) of juvenile Tambaqui fed the experimental diets for 7 weeks.

	Reference	Dietary LA/ALA ratio						SEM	<i>p</i> -value	Contrast RDxVO
		3.1	3.8	5.0	7.2	12.0	26.9			
C14:0	0.5 ^b	0.3 ^a	0.3 ^a	0.3 ^a	0.3 ^a	0.2 ^a	0.3 ^{ab}	0.0	<0.001	***
C16:0	19.2 ^b	15.6 ^a	16.3 ^{ab}	16.6 ^{ab}	16.3 ^{ab}	16.3 ^{ab}	18.1 ^{ab}	0.3	0.014	**
C16:1	1.8 ^b	1.0 ^a	1.1 ^a	1.2 ^a	1.1 ^a	1.1 ^a	1.3 ^a	0.0	<0.001	***
C18:0	16.6	17.1	16.6	16.0	17.2	16.4	16.1	0.1	0.223	ns
C18:1n9c	24.6	22.3	24.9	23.6	23.4	23.6	25.1	0.4	0.414	ns
C18:2n-6c LA	5.1 ^a	8.7 ^{bc}	9.0 ^c	7.5 ^b	7.9 ^{bc}	7.7 ^{bc}	7.5 ^b	0.2	<0.001	***
C20:1	1.7	1.7	1.6	1.7	1.8	1.7	1.7	0.0	0.535	ns
C18:3n-3 ALA	0.1 ^{ab}	0.4 ^c	0.3 ^c	0.2 ^b	0.1 ^{ab}	0.1 ^{ab}	0.1 ^a	0.0	<0.001	ns
C20:2	1.3 ^a	2.2 ^b	1.9 ^b	2.0 ^b	2.0 ^b	1.9 ^b	1.8 ^b	0.1	<0.001	**
C22:0	0.2 ^a	0.4 ^b	0.4 ^b	0.4 ^{bc}	0.4 ^{bc}	0.5 ^c	0.4 ^{bc}	0.0	<0.001	***
C20:3n-6	1.7 ^a	5.0 ^b	4.6 ^b	4.6 ^b	4.5 ^b	4.5 ^b	4.3 ^b	0.2	<0.001	***
C20:4n-6	3.1 ^a	7.8 ^b	7.5 ^b	9.1 ^{bc}	9.5 ^{bc}	10.5 ^c	10.3 ^c	0.4	<0.001	***
C20:5n-3	1.6 ^e	0.9 ^d	0.6 ^{cd}	0.5 ^c	0.3 ^b	0.2 ^b	0.1 ^a	0.1	<0.001	***
C22:6n-3	17.0 ^e	9.9 ^d	8.7 ^d	8.2 ^{cd}	6.4 ^{bc}	5.7 ^b	3.1 ^a	0.6	<0.001	***
n-3	18.7 ^e	11.3 ^d	9.7 ^{cd}	9.1 ^c	6.9 ^b	6.0 ^b	3.3 ^a	0.6	<0.001	***
n-6	9.6 ^a	21.2 ^{bc}	21.1 ^b	21.3 ^{bc}	22.0 ^{bc}	23.0 ^{bc}	23.9 ^c	0.6	<0.001	***
n-6/n-3	0.5 ^a	1.8 ^b	2.2 ^{bc}	2.4 ^c	3.2 ^d	4.0 ^e	6.5 ^f	0.2	<0.001	***
LA/ALA	35.1 ^{bc}	22.6 ^a	23.7 ^{ab}	39.1 ^{cd}	61.2 ^{de}	79.3 ^e	122.2 ^f	5.3	<0.001	*
Σ SAFA	36.6 ^b	33.3 ^a	33.5 ^a	33.8 ^{ab}	34.3 ^{ab}	33.6 ^{ab}	34.2 ^{ab}	0.3	0.019	**
Σ MUFA	29.1	24.9	28.1	26.5	26.3	26.5	27.3	0.4	0.208	*
Σ PUFA	28.6 ^{ab}	31.9 ^b	30.8 ^{ab}	30.4 ^{ab}	28.9 ^{ab}	29.1 ^{ab}	26.3 ^a	0.4	0.022	ns
Σ LC-PUFA	23.4 ^b	23.4 ^b	22.1 ^b	22.6 ^b	20.8 ^{ab}	17.9 ^a	16.8 ^a	0.5	<0.001	**

Values are means of nine fish. SEM is pooled of standard error of mean. Contrast test: *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ns: not significant. Mean in the same row with different superscript letters are significantly different (P < 0.05). RD: Reference diet. VO: Vegetal oil diet.

Table 7 - White muscle fatty acid profile (% of total fatty acids) of juvenile Tambaqui fed the experimental diets for 7 weeks.

	Reference	LA/ALA ratio						SEM	<i>p</i> -value	Contrast RDxVO
		3.1	3.8	5.0	7.2	12.0	26.9			
C14:0	1.1 ^b	0.5 ^a	0.4 ^a	0.4 ^a	0.5 ^a	0.5 ^a	0.5 ^a	0.0	<0.001	***
C16:0	21.4 ^b	19.7 ^{ab}	19.1 ^{ab}	18.9 ^a	21.0 ^{ab}	19.8 ^{ab}	19.5 ^{ab}	0.2	0.009	**
C16:1	3.3 ^c	2.3 ^{ab}	1.9 ^{ab}	1.8 ^a	2.6 ^{bc}	2.1 ^{ab}	2.0 ^{ab}	0.1	<0.001	***
C18:0	10.0	9.7	10.3	10.4	9.8	9.9	10.1	0.1	0.457	ns
C18:1n9c	27.4 ^a	31.8 ^{ab}	29.0 ^{ab}	27.6 ^a	32.8 ^b	31.7 ^{ab}	32.0 ^{ab}	0.5	0.002	*
C18:2n-6c LA	10.5 ^a	17.5 ^b	18.9 ^b	17.7 ^b	18.4 ^b	18.8 ^b	18.5 ^b	0.4	<0.001	***
C18:3n-6	0.1 ^a	0.2 ^{bc}	0.2 ^{bc}	0.2 ^b	0.3 ^{bc}	0.3 ^{bc}	0.3 ^c	0.0	<0.001	***
C20:1	0.9 ^b	0.7 ^a	0.8 ^{ab}	0.8 ^b	0.8 ^b	0.8 ^b	0.9 ^b	0.0	0.001	ns
C18:3n-3ALA	0.6 ^{ab}	3.2 ^e	2.5 ^{de}	1.8 ^{cd}	1.4 ^c	1.1 ^{bc}	0.4 ^a	0.1	<0.001	***
C20:2	0.7	0.7	0.8	0.9	0.7	0.8	0.7	0.0	0.073	ns
C22:0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0	0.760	ns
C20:3n-6	1.1 ^a	1.3 ^{ab}	1.9 ^{bc}	2.2 ^c	1.5 ^{ab}	1.9 ^{bc}	1.8 ^{bc}	0.1	<0.001	**
C20:4n-6	2.4 ^{ab}	1.9 ^a	2.8 ^{ab}	3.6 ^b	2.5 ^{ab}	3.2 ^{ab}	2.9 ^{ab}	0.1	0.052	ns
C22:2	0.2 ^e	0.2 ^e	0.2 ^{de}	0.1 ^{cd}	0.1 ^{bc}	0.1 ^b	0.0 ^a	0.0	<0.001	***
C20:5n-3	2.11 ^d	0.44 ^c	0.43 ^{bc}	0.38 ^c	0.20 ^{abc}	0.20 ^{ab}	0.14 ^a	0.1	<0.001	***
C22:6n-3	7.5 ^c	1.7 ^{ab}	2.1 ^{ab}	2.2 ^b	1.6 ^{ab}	1.3 ^{ab}	1.0 ^a	0.3	<0.001	***
n-3	10.3 ^d	5.8 ^c	5.3 ^c	4.5 ^c	3.1 ^b	2.4 ^{ab}	1.8 ^a	0.4	<0.001	***
n-6	14.0 ^a	21.2 ^b	24.1 ^b	23.7 ^b	22.6 ^b	24.2 ^b	24.1 ^b	0.6	<0.001	***
n-6/n-3	1.4 ^a	3.9 ^b	4.6 ^{bc}	5.3 ^c	7.8 ^d	9.5 ^d	15.2 ^e	0.6	<0.001	***
LA/ALA	18.8 ^c	5.5 ^a	7.2 ^a	10.2 ^b	13.3 ^b	18.2 ^c	44.0 ^d	1.8	<0.001	***
Σ SAFA	32.8 ^b	30.6 ^{ab}	30.3 ^{ab}	30.2 ^a	31.9 ^{ab}	30.7 ^{ab}	30.9 ^{ab}	0.2	0.005	*
Σ MUFA	31.6	33.8	31.7	30.9	35.4	34.7	33.7	0.5	0.040	ns
Σ PUFA	51.8 ^a	59.5 ^b	58.9 ^b	55.9 ^b	58.1 ^b	58.6 ^b	56.7 ^b	0.5	<0.001	***
Σ LC-PUFA	14.1 ^a	5.5 ^b	7.1 ^b	7.9 ^b	6.7 ^b	6.6 ^b	5.8 ^b	0.5	<0.001	***

Values are means of nine fish. SEM is pooled of standard error of mean. Contrast test: *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ns: not significant. Mean in the same row with different superscript letters are significantly different (P<0.05). RD: Reference diet. VO: Vegetal oil diet.

Figure 1 - Muscle EPA and DHA content (mg per 100 g of muscle) in juvenile tambaqui fed the experimental diets for 7 weeks.

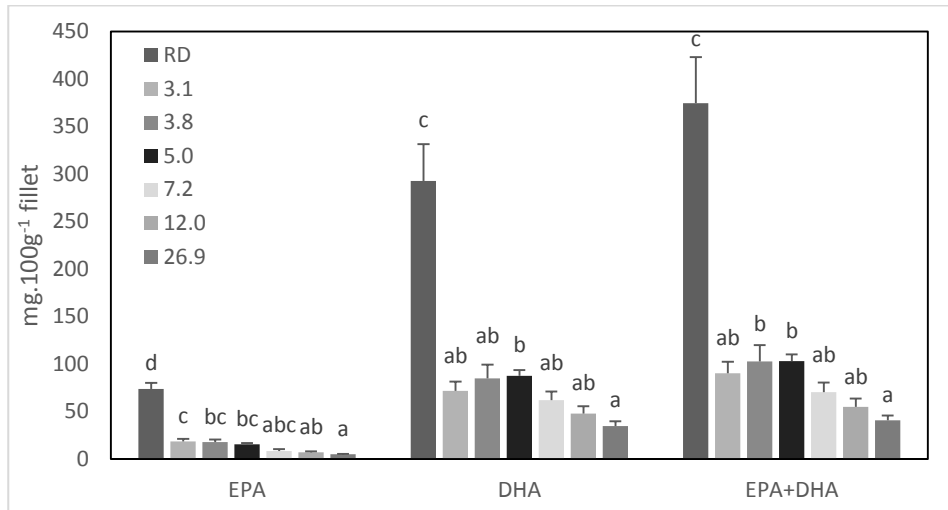
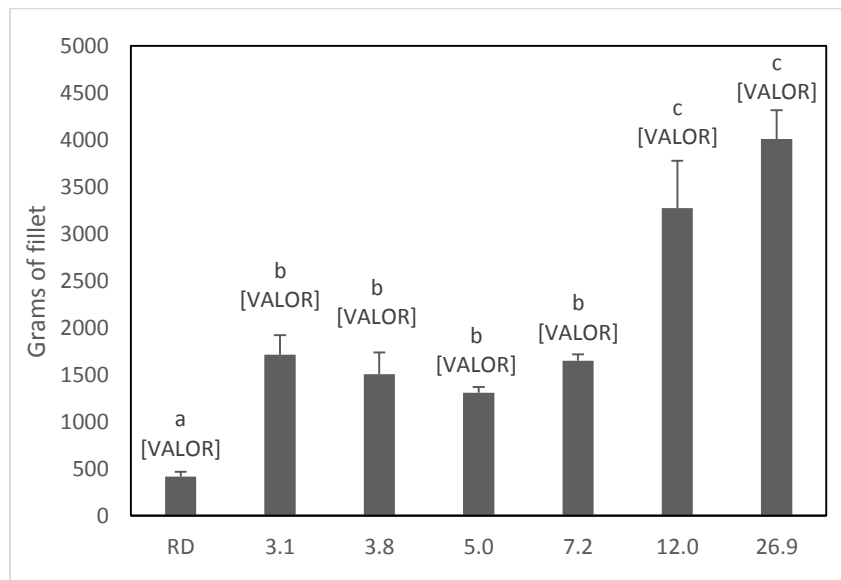


Figure 2 - Recommendations of Tambaqui fillet consumption to meet the requirements 1.4 grams of EPA + DHA per week (200 mg daily).



4 DISCUSSION

Juvenile tambaqui is a filter omnivorous (trophic level of 2.0) feeding predominantly on vegetable ingredients in its natural habitat, including algae, fruit or seeds (Van der Meer et al., 1996), with variable dietary content of n-6/n-3 ratio or EPA and DHA. Present study, clearly suggests that EFA requirements can be satisfied by C18 PUFA, as no growth depression observed when fed VO diets compared to those fed the fish oil diet (RD), as previously observed in studies with other freshwater fish (Sargent et al., 2002; Tocher, 2010). Indeed, growth performance obtained in this study was within the higher range obtained in other studies with this specie (DGI ranging from 2.9 to 4.9) (Silva et al., 2007, Van der Meer et al., 1996; de Almeida et al., 2011). Moreover, growth performance of tambaqui was not affected by dietary LA/ALA ratio. The effect of dietary LA/ALA on growth performance of fresh water species is still controversy. While some studies showed no differences on growth performance (Blanchard et al., 2008; Karapanagiotidis et al., 2007; Senadheera et al. 2010; Thanuthong et al., 2011; Tian et al., 2015), other studies observed that growth is negatively affected by increasing the LA/ALA ratio (Tan et al., 2009; El-Husseiny et al., 2010; Wu and Chen, 2012). This apparent discrepancy of results is likely linked to the effect of dietary FA balance on the bioconversion of PUFA into LC-PUFA, which is dependent on the presence, abundance and activity of the specific enzymes in the metabolic pathway (Emery et al., 2013). In the present study, the lack of significant differences on growth performance among treatments is indicative that dietary LA/ALA ratio did not limited the endogenous syntheses of LC-PUFA to a level that compromised fish growth.

Oil sources and its different fatty acids profile can affect the feed utilization by fish. Usually, freshwater fish have high feed utilization efficiency for various dietary oil sources, hence variable LA/ALA ratios (Blanchard et al.,

2008; Karapanagiotidis et al., 2007; Senadheera et al. 2010; Thanuthong et al., 2011; Tian et al., 2015). Considering that many fruits are naturally presents in the diet of tambaqui, and it is a filter feed fish, this species is adapted to varied dietary oil source, and showed high feed utilization efficiency for dietary LA/ALA ratios. In the present study, we observed lower carcass protein in fish fed RD and diet with 3.1 ratios. There are conflicting reports concerning the effects of FO substitution by other lipid sources with different LA/ALA ratios on carcass proximal composition. Studies on brown trout showed no difference on carcass protein of fish fed fish oil or linseed oil (Turchini et al., 2003). However, our results corroborate with Bell et al. (2002) and Wu et al. (2014). They found that Atlantic Salmon and Chinese sturgeon, respectively, fed FO diet showed lower protein content than fish fed vegetable oil. Growth performance, proximate composition of whole body and muscle were similar among a tropical marine fish, Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*), fed with different diets (pollock oil, soybean or mixed oil) (Deng et al., 2014). Nevertheless, more studies are needed to explain the effect of oil sources on carcass protein deposition.

The transport of FA and other lipid-soluble components to peripheral tissues is predominantly mediated by lipoproteins (Tocher, 2015). FA composition of dietary lipids have been reported to affect plasma lipoprotein composition and metabolism in different fish species (Caballero et al., 2006; Ferreira et al., 2011; Jordal et al., 2007; Torstensen et al., 2000, 2004). Generally, saturated FA are reported to increase plasma cholesterol levels (Gody and Denke, 1990). The saturate FA of experimental diets were controlled by addition of palm oil, except RD. Other studies related higher cholesterol levels in fish fed FO than vegetable oils, probably because FO is an animal origin source (Ferreira et al., 2011). Plant oils contain phytosterols, which can induce, in some species of fish, a decrease in total cholesterol and LDL-C by decreasing

the intestinal cholesterol absorption (Gilman et al., 2003). Our results are in agree with this works. They indicated that fish fed RD showed higher cholesterol and LDL-C than VO diets, but no differences were found between dietary LA/LNA ratios.

Replacement of FO by VO was accompanied by the increased of circulating HDL-C in European sea bass (Castro et al. 2016). Accordingly with Geay et al. (2011), VO stimulates the liver LPL and apolipoproteins ApoA1 genes, the major protein constituent of HDL-C, increasing HDL-C level. Nevertheless, in salmon, rapeseed-oil-fed replacing 75% of fish oil decreased the plasma HDL-C (Tortensen et al., 2004). No differences were observed between FO and VO in this study, but the LA/ALA ratios affect HDL-C levels in tambaqui juvenile. However, not only the oil source but also the LA/ALA ratios affects the level of HDL-C.

The LA/ALA ratios seemed to alter the utilization of glucose for energy by juvenile tambaqui. The increase of dietary LA/ALA ratio increased plasm glucose level, attaining a maximum with the 7.2 LA/ALA diet and then decreased with further increase of dietary LA/ALA ratio. The lowest values of plasm glucose level were observed with reference or 3.1. The insulin sensibility might be modified as a function of dietary FA quality, since several studies in animals have demonstrated a differential impairment in the degree of insulin sensitivity after feeding with SFA, n-6 PUFA or n-3 PUFA (Storlien et al. 1987, Jucker et al. 1999, Ghafoorunissa et al. 2005). Ghafoorunissa et al. (2005) demonstrated that substituting one third dietary LA with ALA, lowering the LA/ALA ratios, significantly improved insulin sensitivity in sucrose-induced IR rats, but not affect the glucose level. Further, fish oil improve the glucose utilization and normalizes the glucose homeostasis in rats (D'Alessandro et al., 2008; Al-Amoudi and Abu Araki, 2013). In the present study, the lowest plasm glucose (RD and 3.1), and the lowest glucose muscle content (26.9) may be

related with poor glucose uptake and worsened insulin sensitivity by increased dietary LA. Our results agree in these studies, suggesting that the LA/ALA ratio may be a modulator of glucose utilization on plasma and muscle of juvenile tambaqui, although not affect the performance.

In the present study, we observed that the liver is an organ able to make a metabolism/retention of selective FA to meet energy demands of the fish (Dosanjh et al., 1988; Luo et al., 2008). Early studies in salmonid have observed that the liver and intestine had relatively higher desaturase and elongase activity than other tissues (Tocher et al., 2006). Also in tambaqui, the liver FA profile was not a simple reflection of the dietary FA profile, indicating an active *in vivo* FA metabolism. Indeed, even though dietary LC-PUFA were presented only in the fish oil based diet (reference diet), whereas PUFA were presented in all treatments, liver and muscle FA profile presented absolute amounts of LC-PUFA (EPA and DHA, and ARA). These results, clearly suggest EFA requirements can be satisfied by 18C-PUFA, since they are able to elongate and desaturate LA and ALA to their end products, as other freshwater fish (Sargent et al., 2002; Ruyter et al., 2006; Turchini et al., 2006; Blanchard et al., 2008, Tan et al. 2009, Tian et al. 2015). It is known that ARA is the main end product of desaturation and elongation of LA, DHA is the main end product of further desaturation and elongation of ALA (Bell and Tocher, 2009), suggesting the difference of affinity between n-6 PUFA and n-3 PUFA for the desaturase and elongase (Glencross 2009). In the present study, we observed that ARA and DHA seems to be the main end product of metabolism of n-6 and n-3 PUFA, respectively, of tambaqui.

The rates of muscle deposition of LA appeared higher than that of ALA, comparable to their dietary inclusion levels. The apparent preferential utilization of ALA rather than LA has been reported, being the result of the preferential catabolism or bioconversion of ALA (Francis et al., 2009), while LA is

preferentially deposited directly in the fish tissues (Francis et al., 2009; Trushenski et al., 2008). Interestingly, dietary 5.0 LA/ALA ratio lead to the closest n-6/n-3 (5.3) ratios in muscle, possibly due this dietary n-6/n-3 ratios enhanced elongase and desaturase of juvenile Tambaqui.

In this study, with the increase of LA/ALA ratios in the diet, ARA presented increased trends and DHA showed decreased trends on liver of juvenile tambaqui, which was possibly because of the variation of LA and ALA as the substrates for elongation and desaturation (Tian et al. 2014), and was consistent with other studies (Tan et al. 2009, Wu, 2012, Tian et al.2015). Based on quadratic regression analysis of DHA, the higher deposition in muscle were in fish fed 5.1 LA/ALA ratios in fish fed VO diets. Although this species is able to elongation and desaturation FA, the fish fed RD had the highest levels of n-3 LC-PUFA in both tissues. The use of dietary alternatives to FO is becoming more common and incorporated at higher levels in aquaculture feeds as global FO supplies are becoming more costly and less available (Turchini et al., 2009; Sprague et al., 2016). The use of VO decrease the concentrations of beneficial n-3 LC-PUFA in Tilapia (Ng and Chong 2004, Ng et al. 2013) and Murray cod (Senadheera, et al. 2010) fillets destined for the human consumer. Although the deposition of DHA, and EPA + DHA in muscle were greater for RD, the animals fed the LA/ALA diet of 5.0 ratio showed the highest deposition of theses FA among VO diet, though no differences were observed between 3.1, 3.8, 7.2 or 12.0 LA/LNA ratio. Hence, to meet the weekly demands of EPA and DHA (0.2 g per day or 1.4 g per week) are recommended the consumption of 417g of tambaqui fillet fed RD, or 1300g of fish fed 5.0 ratio. The benefits of consuming n-3 LC-PUFA in the diet by human with respect to health and well-being are well known. Functionally the most important n-3 fatty acids appear to be EPA and DHA (Calder, 2014). Therefore, the greater deposition of DHA, and

EPA + DHA in the muscle found in the dietary LA/ALA of 5.0 ratio provides a better quality of food for human nutrition.

5 CONCLUSION

In conclusion, the results of this study highlights that the dietary LA and ALA ratio is an important factor in FA nutrition of tambaqui. The results prove that tambaqui possess the ability of elongating and desaturating LA and ALA to their corresponding end products (ARA, EPA and DHA). Although the LA/ALA ratio does not affect the performance, an optimal dietary LA/ALA ratio of 5.0 provided the best tissue lipid content of juvenile tambaqui, providing best quality food for human consumption.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We would also like to thank NAQUA staff for their assistance during the experiments.

REFERENCES

- Al-Amoudi, N.S., Abu Araki, H. a, 2013. Evaluation of vegetable and fish oils diets for the amelioration of diabetes side effects. *J. Diabetes Metab. Disord.* 12, 13. doi:10.1186/2251-6581-12-13
- Araújo, F.G., Costa, D.V., Machado, M.R.F., Paulino, R.R., Okamura, D., Rosa, P.V., 2016. Dietary oils influence ovary and carcass composition and embryonic development of zebrafish. *Aquac. Nutr.* doi:10.1111/anu.12432
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2005. *Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists International*, 16th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., McGhee, F., Dick, J.R., Porter, A., Smullen, R.P., Sargent, J.R., 2002a. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 132, 222–230.
- Bell, J.G., Koppe, W., 2010. Lipids in Aquafeeds. In: Turchini, G.M., Ng, W.K., Tocher, D.R. (Eds.), *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, pp. 21–59.
- Bell, J.G., McGhee, F., Dick, J.R., Tocher, D.R., 2002b. Dioxin and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Scottish farmed salmon (*Salmo salar*): effects of replacement of dietary marine fish oil with vegetable oils. *Aquaculture* 243, 305–314.
- Bell, M.V., Tocher, D.R., 2009. Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acid in Aquatic Ecosystems. In: Arts, M.T., Brett, M.T., Kainz, M.J. (Eds),

- Lipids in Aquatic Ecosystems. Springer Dordrecht Heidelberg, New York, USA, 309-326.
- Blanchard, G., Makombu, J.G., Kestemont, P., 2008. Influence of different dietary 18:3n-3/18:2n-6 ratio on growth performance, fatty acid composition and hepatic ultrastructure in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquaculture* 284, 144–150. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.07.011
- Blanchard, G., Makombu, J.G., Kestemont, P., 2008. Influence of different dietary 18:3n-3/18:2n-6 ratio on growth performance, fatty acid composition and hepatic ultrastructure in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquaculture* 284, 144–150.
- Caballero, M.J., Gallardo, G., Robaina, L., Montero, D., Fernandez, A., Izquierdo, M., 2006. Vegetable lipid sources affect in vitro biosynthesis of triacylglycerols and phospholipids in the intestine of sea bream (*Sparus aurata*). *Brit J Nutr.* 95, 448-454.
- Caballero, M.J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., 2002. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* 214, 253–271.
- Calder, P.C., 2014. Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, 1280–1300. doi:10.1002/ejlt.201400025
- Castro, C., Couto, A., Pérez-Jiménez, A., Serra, C.R., Díaz-Rosales, P., Fernandes, R., Corraze, G., Panserat, S., Oliva-Teles, A., 2016. Effects of fish oil replacement by vegetable oil blend on digestive enzymes and tissue histomorphology of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Fish Physiol. Biochem.* 42, 203-217.
- Costa, D.V. da, Paulino, R.R., Okamura, D., Oliveira, M.M. de, Rosa, P.V. e, 2015. Growth and energy metabolism of Nile tilapia juveniles fed

- glycerol. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 347–354. doi:10.1590/S0100-204X2015000500001
- de Almeida, L.C., Avilez, I.M., Honorato, C.A., Hori, T.S.F., Moraes, G., 2011. Growth and metabolic responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed different levels of protein and lipid. *Aquacult Nutr.* 17, E253-E262.
- Deng, D., Ju, Z., Dominy, W., Conquest, L., Smiley, S., Bechtel, P., 2014. Effect of replacing dietary menhaden oil with pollock or soybean oil on muscle fatty acid composition and growth performance of juvenile Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*). *Aquaculture.* 422, 91-97.
- Dietary requirements, In: Lovell, T. (Ed.), *Nutrition and Feeding of Fish*, 2nd ed. Kluwer Academic, London, UK, pp. 13–70.
- Dosanjh, B.S., Higgs, D.A., Plotnikoff, M.D., Markert, J., Buckley, J., 1988. Preliminary evaluation of canola oil, pork lard and marine lipid singly and in combination as supplemental dietary lipid sources for juvenile fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture.* 68, 325-343.
- Emery, J.A., Hermon, K., Hamid, N.K.A., Donald, J.A., Turchini, G.M., 2013. Δ -6 Desaturase Substrate Competition: Dietary Linoleic Acid (18:2n-6) Has Only Trivial Effects on α -Linolenic Acid (18:3n-3) Bioconversion in the Teleost Rainbow Trout. *PLOS ONE.* 8, e57463.
- Ferreira, M.W., de Araujo, F.G., Costa, D. V., Rosa, P. V., Figueiredo, H.C.P., Murgas, L.D.S., 2011. Influence of Dietary Oil Sources on Muscle Composition and Plasma Lipoprotein Concentrations in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. World Aquac. Soc.* 42, 24–33. doi:10.1111/j.1749-7345.2010.00440.x

- Folch, J., Lees, M., Slone Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509. doi:10.1371/journal.pone.0020510
- Francis, D.S., Peters, D.J., Turchini, G.M., 2009. Apparent in vivo A-6 desaturase activity, efficiency, and affinity are affected by total dietary C18 PUFA in the freshwater fish murray cod. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4381–4390. doi:10.1021/jf900094w
- Furuita, H., Hori, K., Suzuki, Sugita, T., Yamamoto, T., 2007. Effect of n-3 and n-6 fatty acids in broodstock diet on reproduction and fatty acid composition of broodstock and eggs in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 267, 55–61. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.01.039
- Geay, F., Ferraresso, S., Zambonino-Infante, J.L., Bargelloni, L., Quentel, C., Vandeputte, M., Kaushik, S., Cahu, C.L., Mazurais, D., 2011. Effects of the total replacement of fish-based diet with plant-based diet on the hepatic transcriptome of two European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) half-sibfamilies showing different growth rates with the plant-based diet. *BMC Genomics.* 12, 522.
- Ghafoorunissa, Ibrahim, A., Natarajan, S., 2005. Substituting dietary linoleic acid with α -linolenic acid improves insulin sensitivity in sucrose fed rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 1733, 67-75.
- Gilman, C.I., Leusch, F.D., Breckenridge, W.C., MacLatchy, D.L., 2003. Effects of a phytosterol mixture on male fish plasma lipoprotein fractions and testis P450_{scc} activity. *General and Comparative Endocrinology.* 130, 172-184.

- Glencross, B.D., 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Rev. Aquac.* 1, 71–124. doi:10.1111/j.1753-5131.2009.01006.x
- Gody, S., Denke, M., 1990. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res.* 31, 1149-1172.
- Harris, W.S., Mozaffarian, D., Lefevre, M., Toner, C.D., Colombo, J., Cunnane, S.C., Holden, J.M., Klurfeld, D.M., Morris, M.C., Whelan, J., 2009. Towards Establishing Dietary Reference Intakes for Eicosapentaenoic and J. *Nutr.* 139, 804–819. doi:10.3945/jn.108.101329.and
- Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog Lipid Res.* 26, 281-347.
- Jordal, A.-E.O., Lie, Ø., Torstensen, B.E., 2007. Complete replacement of dietary fish oil with a vegetable oil blend affect liver lipid and plasma lipoprotein levels in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Nutr.* 13, 114–130. doi:10.1111/j.1365-2095.2007.00455.x
- Jucker, B.M., Cline, G.W., Barucci, N., Shulman, G.I., 1999. Differential effects of safflower oil versus fish oil feeding on insulin-stimulated glycogen synthesis, glycolysis, and pyruvate dehydrogenase flux in skeletal muscle: A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *Diabetes* 48, 134–140. doi:10.2337/diabetes.48.1.134
- Karapanagiotidis, I.T., Bell, M. V, Little, D.C., Yakupitiyage, A., 2007. Replacement of dietary fish oils by alpha-linolenic acid-rich oils lowers omega 3 content in tilapia flesh. *Lipids* 42, 547–59. doi:10.1007/s11745-007-3057-1
- Luo, Z., Li, X., Bai, H., Gong, S., 2008. Effects of dietary fatty acid composition on muscle composition and hepatic fatty acid profile in juvenile *Synechogobius hasta*. *J. Appl. Ichthyol.* 24, 116–119.

- Meer, M.B. Van Der, 1996. Feed consumption , growth and protein utiization of *Colossoma macropomum* (Cuvier) at different dietary fish meal / soya meal ratios 531–538.
- Ng, W., Chong, C., Wang, Y., Romano, N., 2013. Effects of dietary fi sh and vegetable oils on the growth , tissue fatty acid composition , oxidative stability and vitamin E content of red hybrid tilapia and ef fi cacy of using fi sh oil fi nishing diets. *Aquaculture* 372–375, 97–110. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.10.030
- Ng, W.-K., Chong, C.-Y., 2004. An overview of lipid nutrition with emphasis on alternative lipid sources in tilapia feeds. At: ag. arizona. edu/azaqua/ista/ista6/6abstracts/Ng/Ng_lipids. doc.
- Oliveira, A. C. B., Miranda, E. C., Correa, R., 2013. Exigências Nutricionais e Alimentação do Tambaqui, in: Fracalossi, D., Cyrino, J., (Eds.) *Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*. Florianópolis, SC: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, pp. 231-240.
- Ribeiro, P.A.P., Costa, L.S., Pereira, R.T., Murgas, L.D.S., Rosa, P.V., 2013. Parâmetros metabólicos de pacus alimentados com diferentes fontes de óleo. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 48, 1035–1042. doi:10.1590/S0100-204X2013000800032
- Ruyter, B., Moya-Falcón, C., Rosenlund, G., Vegusdal, A., 2006. Fat content and morphology of liver and intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects of temperature and soybean oil. *Aquaculture* 252, 441–452.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids. in: *Halver, J.E., Hardy, R.W.* (Eds.), *Fish nutrition*, 3rd Edition. *Academic Press*, pp. 181-257.
- Senadheera, S.P.S.D., Turchini, G.M., Thanuthong, T., Francis, D.S., 2010. Effects of dietary α -linolenic acid (18:3n-3)/linoleic acid (18:2n-6)

- ratio on growth performance, fillet fatty acid profile and finishing efficiency in Murray cod. *Aquaculture*. 309, 222-230.
- Sprague, M., Dick, J.R., Tocher, D.R., 2016. Impact of sustainable feeds on omega-3 long-chain fatty acid levels in farmed Atlantic salmon , 2006 – 2015. *Nat. Publ. Gr.* 1–9. doi:10.1038/srep21892
- Sprague, M., Dick, J.R., Tocher, D.R., 2016. Impact of sustainable feeds on omega-3 long-chain fatty acid levels in farmed Atlantic salmon , 2006 – 2015. *Nat. Publ. Gr.* 1–9. doi:10.1038/srep21892
- Storlien, L.H., Kraegen, E.W., Chisholm, D.J., Ford, G.L., Bruce, D.G., Pascoe, W.S., 1987. Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science*. 237, 885-888.
- Tan, X., Luo, Z., Xie, P., Liu, X., 2009. Effect of dietary linolenic acid/linoleic acid ratio on growth performance, hepatic fatty acid profiles and intermediary metabolism of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture* 296, 96–101. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.08.001
- Thanuthong, T., Francis, D.S., Senadheera, S.D., Jones, P.L., Turchini, G.M., 2011. Fish oil replacement in rainbow trout diets and total dietary PUFA content: I) Effects on feed efficiency, fat deposition and the efficiency of a finishing strategy. *Aquaculture*. 320, 82-90.
- Tian, J.-J., Lei, C.-X., Ji, H., 2015. Influence of dietary linoleic acid (18:2n-6) and α -linolenic acid (18:3n-3) ratio on fatty acid composition of different tissues in freshwater fish Songpu mirror carp, *Cyprinus Carpio*. *Aquac Res*, n/a-n/a.
- de Almeida, L.C., Avilez, I.M., Honorato, C.A., Hori, T.S.F., Moraes, G., 2011. Growth and metabolic responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed different levels of protein and lipid. *Aquacult Nutr*.

- 17, E253-E262. Tocher, D.R., 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac Res.* 41, 717-732.
- Tocher, D.R., 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac Res.* 41, 717-732.
- Tocher, D.R., Glencross, B.D., 2015. Lipids and fatty acids. *Dietary Nutrients, Additives and Fish Health*; Cheng-Sheng, L., Chhorn, L., Delbert-M, GI, Webster, CD, Eds, 47.
- Tocher, D.R., Zheng, X., Schlechtriem, C., Hastings, N., Dick, J.R., Teale, A.J., 2006. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids.* 41, 1003-1016.
- Torstensen, B.E., Frøyland, L., Lie, Ø., 2004. Replacing dietary fish oil with increasing levels of rapeseed oil and olive oil – effects on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissue and lipoprotein lipid composition and lipogenic enzyme activities.
- Torstensen, B.E., Lie, Ø., Frøyland, L., 2000. Lipid Metabolism and Tissue Composition in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.)— Effects of Capelin Oil, Palm Oil, and Oleic Acid-Enriched Sunflower Oil as Dietary Lipid Sources 35.
- Trushenski, J.T., Lewis, H.A., Kohler, C.C., 2008. Fatty acid profile of sunshine bass: I, profile change is affected by initial composition and differs among tissues. *Lipids* 43, 629–641.
- Turchini, G.M., Francis, D.S., De Silva, S.S., 2006. Fatty acid metabolism in the freshwater fish Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) deduced by the whole body fatty acid balance method. *Comp. Biochem. Physiol.* 144B, 110–118.
- Turchini, G.M., Mentasti, T., Frøyland, L., Orban, E., Caprino, F., Moretti, V.M., 2003. Effects of alternative dietary lipid sources on performance,

- tissue chemical composition, mitochondrial fatty acid oxidation capabilities and sensory characteristics in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture* 225, 251–267.
- Wu, F., Liu, W., Wei, Q.W., Wen, H., Jiang, M., Yang, C.G., Tian, J., 2014. Effects of dietary lipid sources on growth performance, carcass composition, and blood parameters of juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis* Gray, 1835). *J. Appl. Ichthyol.* 30, 1620-1625.
- Wu, F.-C., Chen, H.-Y., 2012. Effects of dietary linolenic acid to linoleic acid ratio on growth, tissue fatty acid profile and immune response of the juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture* 324-325, 111–117. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.10.030
- Zeng, Y.-Y., Jiang, W.-D., Liu, Y., Wu, P., Zhao, J., Jiang, J., Kuang, S.-Y., Tang, L., Tang, W.-N., Zhang, Y.-A., Zhou, X.-Q., Feng, L., 2016. Dietary alpha-linolenic acid/linoleic acid ratios modulate intestinal immunity, tight junctions, anti-oxidant status and mRNA levels of NF- κ B p65, MLCK and Nrf2 in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*. 51, 351-364.
- Zeng, Y.Y., Jiang, W.D., Liu, Y., Wu, P., Zhao, J., Jiang, J., Kuang, S.Y., Tang, L., Tang, W.N., Zhang, Y.A., Zhou, X.Q., Feng, L., 2015. Optimal dietary alpha- linolenic acid/linoleic acid ratio improved digestive and absorptive capacities and target of rapamycin gene expression of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquacult Nutr*.