



TESE DE DOUTORADO

Uso de enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829)

BRUNO ADAN SAGRATZKI CAVERO

0413

u

Manaus - AM

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA

BIBLIOTECA DO INPA

Uso de enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de pirarucu,
Arapaima gigas (Cuvier, 1829)

BRUNO ADAN SAGRATZKI CAVERO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus, AM
2004.

UNIVERSIDADE DO FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA

BIBLIOTECA DO INPA

Uso de enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de pirarucu,
Arapaima gigas (Cuvier, 1829)

BRUNO ADAN SAGRATZKI CAVERO

ORIENTADOR: Manoel Pereira Filho, Dr.

Co-ORIENTADOR: Rodrigo Roubach, Dr.

**FONTE FINANCIADORA: Agência Espanhola de Cooperação Internacional (AECI),
Governo da Espanha – Projeto Pirarucu.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus, AM
2004.

T
597.50413
C38Ju
ex. 2

FICHA CATALOGRÁFICA

Cavero, Bruno Adan Sagratzki

Uso de enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) / Bruno Adan Sagratzki Cavero - 2003.

75f.

Tese (doutorado) - INPA/UFAM, 2003

1. Peixe de água doce – *Arapaima gigas*/Pirarucu 2. Treinamento alimentar 3. Enzimas digestivas exógenas. 4. Aqüicultura 5. Desempenho zootécnico

CDD 19 ed. 597.50413

Sinopse:

Foram realizados cinco experimentos, nos quais foi determinado o perfil e a resposta enzimática de juvenis de pirarucu à introdução de alimento seco. Ainda, foram avaliados o efeito isolado e as interações da inclusão das enzimas digestivas exógenas: amilase, lipase e protease.

Palavras-chave: Pirarucu, *Arapaima gigas*, Treinamento alimentar, enzimas digestivas exógenas, Aqüicultura, Desempenho zootécnico.

DEDICATÓRIA

A minha esposa,

Taty.

A minha mãe

Yolanda

A meus filhos

Bruna e Bruno

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e sabedoria proporcionadas durante a minha existência;

Aos Drs. Manoel Pereira Filho pela orientação e Rodrigo Roubach pela co-orientação, apoio e amizade proporcionados durante a elaboração deste trabalho;

Ao amigo Fernando Bibiano Melo e ao Dr. Gilberto Moraes pelos ensinamentos práticos e teóricos que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho;

Ao amigo Daniel Rabello Ituassú, pela colaboração e assistência prática e teórica deste trabalho. Aos amigos André M. Bordinhon e Flávio A. L. da Fonseca pela colaboração na realização deste trabalho;

A Sra. Maria Inêz de Oliveira Pereira, pela colaboração nas análises enzimáticas, e amizade;

A Sra. Suzana Kawashima, pela ajuda na parte prática deste trabalho e pela sua inestimável amizade;

Ao pesquisador Atílio Storti Filho pela ajuda no monitoramento das instalações e aos trabalhadores de apoio da Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura (CPAQ) pela ajuda na parte prática dos experimentos;

À Agência Espanhola de Cooperação Internacional (AECI), Governo da Espanha pelo suporte financeiro que contribuiu para a realização deste trabalho;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas, FAPEAM, pelo suporte financeiro que contribuiu para a realização deste trabalho;

Ao CNPq pelo suporte financeiro que possibilitou a elaboração deste trabalho e pela bolsa concedida;

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela oportunidade oferecida para a realização deste curso; A Alltech do Brasil pela doação das enzimas exógenas;

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

NH_3 = amônia não ionizada

$\text{NH}_3 + \text{NH}_4$ = amônia total

NO_2 = nitrito

mg/L = miligrama por litro

μL = microlitro

pH = potencial hidrogeniônico

g = gramas

mg = miligrama

$^{\circ}\text{C}$ = graus Celcius

OD = oxigênio dissolvido

μS = microSiemens

kg = kilograma

CAA = conversão alimentar aparente

CMFi = consumo médio ao final do experimento

GP = ganho de peso

cm = centímetro

TCE = taxa de crescimento específico

Ln = logaritmo natural

S = sobrevivência

LISTA DE QUADROS

Página

CAPÍTULO II

Quadro 1 – Composição centesimal da ração comercial para peixes carnívoros com 45% de proteína e 3000 Kcal de Energia Bruta/Kg, extrusada (Purina TC45, Agribands, Paulínia, SP, Brasil).....33

CAPÍTULO III

Quadro 1 – Composição centesimal da ração comercial para peixes carnívoros com 45% de proteína e 3000 Kcal de Energia Bruta/Kg, extrusada (Purina TC45, Agribands, Paulínia, SP, Brasil).....44

CAPÍTULO IV

Quadro 1 – Composição centesimal da ração comercial para peixes carnívoros com 45% de proteína e 3000 Kcal de Energia Bruta/Kg, extrusada (Purina TC45, Agribands, Paulínia, SP, Brasil).....55

CAPÍTULO V

Quadro 1 – Composição centesimal da ração comercial para peixes carnívoros com 45% de proteína e 3000 Kcal de Energia Bruta/Kg, extrusada (Purina TC45, Agribands, Paulínia, SP, Brasil).....66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Parâmetros da qualidade da água (média \pm desvio padrão), durante o treinamento alimentar de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*, com alimento vivo como dieta inicial.....19

Tabela 2. Sobrevivência, percentual de comedores e ganho de peso de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*, submetidos a treinamento alimentar com alimento vivo como dieta inicial.....23

CAPÍTULO II

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água, durante o período experimental de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* alimentados com ração+protease.....34

Tabela 2. Médias do peso inicial, do peso final, do ganho de peso, da taxa de crescimento específico, da conversão alimentar aparente e da sobrevivência de juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*) mantidos em condições experimentais e alimentados com suplementação de protease exógena durante 37 dias ⁽¹⁾.....36

CAPÍTULO III

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água, durante o período experimental de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* alimentados com ração+lipase.....46

Tabela 2. Médias do peso inicial, do peso final, do ganho de peso, da taxa de crescimento específico, da conversão alimentar aparente e da sobrevivência de juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*) mantidos em condições experimentais e alimentados com suplementação de lipase exógena durante 37 dias.....48

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água, durante o período experimental de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* alimentados com ração+amilase.....56

Tabela 2. Médias do peso inicial, do peso final, do ganho de peso, da taxa de crescimento específico, da conversão alimentar aparente e da sobrevivência de juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*) mantidos em condições experimentais e alimentados com suplementação de amilase exógena durante 37 dias.....59

CAPÍTULO V

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água, durante o período experimental na criação de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* mantidos em condições experimentais e alimentados com suplementação de lipase e protease exógena durante 28 dias ⁽¹⁾. L+P = Lipase + Protease.....68

Tabela 2. Médias do peso inicial, do peso final, do ganho de peso, da taxa de crescimento específico, da conversão alimentar aparente e da sobrevivência de juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*) mantidos em condições experimentais e alimentados com suplementação de lipase e protease exógena durante 28 dias ⁽¹⁾. L+P = Lipase + Protease.....69

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Perfil da atividade enzimática, protease alcalina (pH 8,0)(A) e protease ácida (pH 3,0)(B), de juvenis de pirarucu ao longo do treinamento alimentar. Substrato de caseína 1%, 100µL de homogeneizado21

Figura 2. Perfil enzimático, amilase (A) e lipase (B), de juvenis de pirarucu ao longo do treinamento alimentar. Amilase: Amido 1%, pH 8,0, 100µL de homogeneizado. Lipase: p-nitrophenyl myristate 0,4mM, Sigma N2502, pH 8,0, 100µL de homogeneizado.....22

CAPÍTULO II

Figura 1. Atividade enzimática da protease ácida exógena em razão do tempo, temperatura e pH, utilizando caseína 1% como substrato, 100µL de protease (0,05 g/mL de água destilada).....37

CAPÍTULO III

Figura 1. Atividade enzimática da lipase exógena em razão do tempo, temperatura e pH, utilizando como substrato p-nitrophenyl myristate, 100µL de amilase (0,05 g/mL de água destilada).....47

CAPÍTULO IV

Figura 1. Atividade enzimática da amilase exógena em razão do tempo, temperatura e pH, utilizando amido 2% como substrato, 200µL de amilase (0,05 g/mL de água destilada).....59

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL.....	xi
ABSTRACT.....	xii
APRESENTAÇÃO.....	01
INTRODUÇÃO GERAL.....	03
A ALIMENTAÇÃO DE PEIXES CARNÍVOROS.....	03
ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM PEIXES.....	04
A ALIMENTAÇÃO NATURAL DO PIRARUCU.....	06
A CRIAÇÃO DO PIRARUCU.....	06
PERSPECTIVAS DA INCLUSÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS NA ALIMENTAÇÃO DO PIRARUCU.....	07
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	09
CAPÍTULO I.....	14
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO TRATO DIGESTÓRIO DE JUVENIS DE PIRARUCU, <i>ARAPAIMA GIGAS</i>, DURANTE O TREINAMENTO ALIMENTAR USANDO ALIMENTO VIVO COMO DIETA INICIAL.....	14
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
CONCLUSÕES.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
CAPÍTULO II.....	30

EFEITO DA INCLUSÃO DE PROTEASE EXÓGENA NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE JUVENIS DE PIRARUCU, <i>ARAPAIMA GIGAS</i> (CUVIER, 1829).....	30
RESUMO.....	30
ABSTRACT.....	30
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
 CAPÍTULO III.....	44
EFEITO DA INCLUSÃO DE LIPASE EXÓGENA NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE JUVENIS DE PIRARUCU, <i>ARAPAIMA GIGAS</i> (CUVIER, 1829).....	44
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	44
INTRODUÇÃO.....	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
 CAPÍTULO IV.....	55
EFEITO DA INCLUSÃO DE AMILASE EXÓGENA NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE JUVENIS DE PIRARUCU, <i>ARAPAIMA GIGAS</i> (CUVIER, 1829).....	55
RESUMO.....	55
ABSTRACT.....	55
INTRODUÇÃO.....	56
MATERIAL E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
 CAPÍTULO V.....	69

EFEITO DA INCLUSÃO DE PROTEASE E LIPASE EXÓGENAS, E SUA INTERAÇÃO, NA ALIMENTAÇÃO DE JUVENIS DE PIRARUCU.....	69
RESUMO.....	69
ABSTRACT.....	69
INTRODUÇÃO.....	70
MATERIAL E MÉTODOS.....	71
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES.....	79

RESUMO GERAL

Os objetivos deste trabalho foram verificar a resposta enzimática a introdução de alimento seco, testar a eficiência do alimento vivo como dieta inicial no treinamento alimentar e o efeito da adição das enzimas digestivas exógenas amilase, lipase e protease na ração sobre o desempenho de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*. O trabalho foi realizado em três fases. Na primeira fase foram realizados o treinamento alimentar e o perfil enzimático dos peixes. Foram usados dois tratamentos, *Artemia* sp. e mistura de zooplâncton nativo. O ganho de peso, a porcentagem de comedores e a sobrevivência não apresentaram diferença estatística significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). A atividade enzimática lipolítica e proteolítica dos juvenis de pirarucu, apresentaram gradiente positivo durante o treinamento alimentar. Na segunda fase foram testados três níveis de inclusão das enzimas amilase, lipase e protease, sendo cada uma em três níveis distintos, além do controle: 0, 0,1; 0,2 e 0,4%, seguindo um delineamento inteiramente casualizado. Na terceira fase foi testada a combinação dos melhores níveis de inclusão enzimática da primeira fase (lipase 0,1% e protease 0,1%). Este experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial de 2×2 . Na terceira fase o efeito da adição de protease e lipase na ração no desempenho dos peixes foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) com relação ao controle. Na segunda fase foi verificada a mesma tendência, entretanto as interações dos tratamentos não apresentaram nenhuma vantagem sobre a inclusão de lipase e protease isoladamente. A introdução de ração durante o treinamento alimentar influencia na atividade enzimática digestiva de juvenis de pirarucu. A dieta inicial a base de alimento vivo é eficiente no treinamento alimentar de juvenis de pirarucu. As enzimas digestivas exógenas lipase e protease, quando adicionadas à ração, possuem efeito positivo no desempenho zootécnico de juvenis de pirarucu.

ABSTRACT

This work objective was to verify the enzymatic response to the introduction of dry food, to test the efficiency of live feed as initial diet in the feed training and to test the effect of exogenous digestive enzymes addition (amylase, lipase and protease) in the feed on growth performance of pirarucu, *Arapaima gigas*, juveniles. The work was carried through in three phases. In the first phase feed training and an enzymatic profile was carried through. Two treatments with *Artemia* sp. and native zooplankton mix were used. Weight gain, feeders' percentage and survival did not presented significant statistical difference between treatments ($p>0.05$). Lipolytic and proteolytic enzymatic activity from pirarucu juveniles presented a positive gradient during feed training. In the second phase three levels of enzymes inclusion were tested with: amylase, lipase and protease, each one in three distinct levels of 0, 0.1; 0.2 and 0.4%, in a complete randomized design. In the third phase a combination with the best enzymatic levels from the first phase was tested (lipase 0.1% and protease 0.1%). This experiment was carried in a complete randomized design in a factorial design of 2x2. In the third phase, the addition effect of protease and lipase in the feed in fish performance was statistically significant ($p<0.05$) when compared to the control. The same trend was verified in the second phase, however treatments interactions did not presented any advantage regarding the inclusion of lipase and protease separately. Dry feed introduction during feed training influences the digestive enzymatic activity of pirarucu juvenile. A initial diet based on live feed is efficient for pirarucu juvenile feed training. Exogenous digestive enzymes, lipase and protease, when added to the feed possess a positive effect in pirarucu juvenile growth performance.

Apresentação

A criação do pirarucu, *Arapaima gigas*, na Região Amazônica encontra-se em pleno desenvolvimento, aliada a expectativa da abertura do mercado nacional e internacional, o que tem despertado um peculiar interesse em melhorar as condições e técnicas do seu cultivo.

O pirarucu apresenta uma grande facilidade de ser condicionado para aceitar alimento seco além de ser resistente ao manuseio. Embora as exigências nutricionais desta espécie sejam apenas parcialmente conhecidas, apresenta excelentes taxas de crescimento quando é submetida a um manejo alimentar e densidade de estocagem adequados. Ainda, o pirarucu apresenta ótimo desempenho zootécnico quando criado em tanques escavados e/ou em tanques-rede, sendo que nesta última situação são recomendados tanques-rede de grande volume, devido ao crescimento que o peixe alcança em curto intervalo de tempo.

Inovações tecnológicas como o desenvolvimento de enzimas digestivas exógenas e sua inclusão nas rações de suínos e aves são realizados rotineiramente com a finalidade de melhorar o processo produtivo. Na piscicultura existe ainda, uma grande resistência na adoção desta tecnologia, provavelmente pela falta de resultados satisfatórios que encorajem a sua adoção. Desta forma os testes realizados neste trabalho foram encorajados pela necessidade de conhecer em que situação ocorre a digestão de juvenis de pirarucu com o intuito de otimizar os índices zootécnicos em escala intensiva.

Esta tese apresenta os resultados experimentais que permitem treinar juvenis de pirarucu eficientemente e os resultados do efeito da inclusão de enzimas digestivas exógenas na dieta sobre o crescimento dos peixes.

A divisão da tese em capítulos tem o objetivo de facilitar a leitura e consulta de acordo com as fases experimentais e de reduzir esforços para sua publicação.

Na introdução geral são abordados assuntos que abordam a problemática da criação de peixes carnívoros, como as experiências da atividade enzimática endógena em peixes, as características alimentares do pirarucu, e sobre os sistemas de criação realizados com esta espécie e também as vantagens que a adição de enzimas digestivas exógenas podem trazer à alimentação de peixes.

No capítulo I, é formalizado um protocolo para o treinamento alimentar de juvenis de pirarucu e a obtenção do perfil da resposta enzimática à inclusão de alimento seco.

Nos capítulos II, III e IV foram observados o efeito da inclusão de enzimas digestivas exógenas amilase, lipase e protease, no desempenho zootécnico de juvenis de pirarucu.

No capítulo V é relatado o teste realizado com os melhores níveis encontrados nas experiências dos capítulos III e IV, verificando o efeito isolado e a interação da inclusão das enzimas exógenas no desempenho zootécnico de juvenis de pirarucu.

Finalmente são apresentadas as considerações finais do trabalho e as recomendações para a adoção de enzimas digestivas exógenas na alimentação do pirarucu.

Neste trabalho a inclusão de enzimas digestivas exógenas na ração para juvenis de pirarucu teve efeito positivo no desempenho zootécnico do pirarucu e abre precedentes para novos trabalhos que visem melhorar a digestibilidade de nutrientes de origem vegetal com a finalidade de substituir a farinha de peixe, melhorar os índices zootécnicos e baixar os custos de produção na criação de peixes carnívoros.

Introdução geral

A alimentação de peixes carnívoros

A alimentação dos peixes na piscicultura intensiva é o fator mais oneroso chegando a representar até 60% dos investimentos (Kubitza, 1998). No caso de peixes carnívoros, que precisam de altas concentrações de proteína bruta, a ração torna-se ainda mais cara devido aos ingredientes, como a farinha de peixe e de carne que tem que ser usados para sua formulação. Estes ingredientes além de encarecerem a ração, não apresentam padrão de qualidade constante, são de difícil aquisição e possuem características que dificultam seu armazenamento por longos períodos. Para resolver este problema alguns ingredientes de origem vegetal, como o farelo de soja, milho e trigo, são amplamente utilizados na composição das dietas, incorporando altos níveis de amido e tornando obrigatório o monitoramento da capacidade do fígado desses peixes de metabolizar e/ou armazenar carboidratos (Legate *et al.*, 2001).

Peixes herbívoros e onívoros não apresentam problema para digerir o amido devido secretarem amilase em todas as porções do intestino e no pâncreas, ao contrário dos carnívoros que além de possuírem baixas taxas de secreção de amilase, essa secreção ocorre em alguns locais específicos como o pâncreas (Hepher, 1988). A pré-gelatinização do amido através de um processo de cozimento aumenta a sua digestibilidade e seu aproveitamento por peixes carnívoros (Hepher, 1988; Kubitza, 1998) mas. Entretanto podem desnaturar as proteínas presentes no ingrediente, importantes para o crescimento do peixe. Além do mais o fornecimento de ração de má qualidade ou elaborada de forma que não atenda as exigências nutricionais da espécie, promove deficiências na resposta imunológica do peixe (Landolt, 1989) aumentando a probabilidade de incidência de doenças e parasitoses. Da mesma forma, o acúmulo de material orgânico proveniente dos restos alimentares e fezes e a baixa digestibilidade do

alimento, também podem causar alterações na água e afetar o crescimento dos peixes (Pinheiro & Santos, 1993). Quanto pior a qualidade nutricional, a digestibilidade e a estabilidade da ração, maior a carga poluente na água e menor a produtividade do cultivo (Lovell, 1989; Kubitza, 1998).

Atividade enzimática em peixes

Experiências com “sea bass” (*Lates calcarifer*) de hábito alimentar carnívoro e com “rabbitfish” (*Siganus canaliculatus*) de hábito alimentar onívoro mostraram que as atividades das enzimas digestivas presentes no trato digestivo desses peixes dependem dos seus hábitos alimentares (Sabapathy & Teo, 1993). Ribeiro *et al.* (1999), estudando a atividade das enzimas digestivas nas larvas e juvenis de *Solea senegalensis*, observaram que o aumento dessa atividade depende da maturação das células do intestino. Galvão *et al.* (1997) observaram tendência semelhante estudando a tainha, *Mugil planatus*, durante as fases de larva e juvenil, estabelecendo que a atividade enzimática aumenta de acordo com a idade. Outro fato importante foi observado por Kurokawa *et al.* (1998) os quais verificaram que a contribuição de enzimas digestivas exógenas em *Sardinops melanoticus* a partir do zooplâncton é insignificante, podendo indicar que as enzimas digestivas presentes no período larval dos peixes sejam suficientes para desempenhar as funções digestivas. Embora essa contribuição seja pequena, a retirada do alimento vivo e a introdução de alimento artificial na fase larval pode ser dificultada por causa da baixa atividade enzimática.

A presença de atrativos na ração pode facilitar a ingestão do alimento e estimular o sistema digestivo (Kolkovski, 2001), principalmente na secreção de enzimas digestivas. No caso de peixes carnívoros submetidos a treinamento alimentar, o sucesso da aceitação de alimento exógeno artificial aumenta com o crescimento dos peixes e

também com a introdução de peixes treinados (Kubitza, 1995). No caso específico do pirarucu o sucesso do treinamento alimentar tende a ser mais eficiente quando os peixes são menores (cerca de 1,5 g) (Ituassú *et al.*, submetido).

A regulação da atividade enzimática no trato digestivo dos peixes pode também estar associada a períodos de inanição e/ou a ausência de alimento no trato digestivo. No salmão do atlântico, *Salmo salar*, esta situação causa o acúmulo de tripsina na forma de tripsinogênio no pâncreas (Kolkovski, 2001).

A temperatura é um outro fator que pode influenciar na regulação enzimática dos peixes, já que na estação de inverno estes costumam ingerir menos alimentos, causando uma redução da estimulação mecânica no trato digestivo, e dessa forma diminuindo com isso a estimulação para a secreção de colecistoquinina (Einarsson *et al.*, 1997), hormônio este, que é responsável pela ativação da secreção pancreática (Schmidt-Nielsen, 1996).

O estudo da alimentação é básico para viabilizar o cultivo de indivíduos em ambientes confinados, tendo em vista o objetivo de maximizar sua taxa de crescimento (Fonteles-Filho, 1989), sendo que o estudo da fisiologia digestiva em larvas e juvenis de peixes tem se resumido, na maioria dos casos, a satisfazer às necessidades da formulação de dietas, sem antes entender a ontogenética dos seus sistemas digestivos (Kolkovski, 2001) e o perfil da atividade das suas enzimas digestivas.

Glass *et al.* (1989) reportaram que o conhecimento exato da quantidade e da especificidade de cada enzima presente num sistema digestivo e também das condições em que ocorre a hidrólise, permitirá estimar a digestibilidade dos alimentos com maior precisão. Por outro lado, Cardenete *et al.* (1993) afirmam que a adição de preparados de enzimas digestivas em dietas para peixes, é um tema recente, centrado em espécies e

idade dos animais. Os autores sugerem que o aporte de enzimas digestivas exógenas na dieta pode contribuir na melhora do desempenho e na sobrevivência dos peixes.

A alimentação natural do pirarucu

O pirarucu é um peixe de respiração aérea (Fontenele, 1955; Sanchez, 1960), desova parcelada (Fontenele, 1955), pertencente à família Osteoglossidae (Nelson, 1994; Li & Wilson, 1996) de hábito alimentar essencialmente piscívoro, sendo que sua alimentação varia de acordo com a idade.

Fontenele (1953; 1955) observando larvas de pirarucu no posto de piscicultura de Lima Campos (Icó, Ceará), verificou que estas começam a procurar alimento exógeno a partir do 5º dia após a eclosão, mesmo sem ter o saco vitelino totalmente absorvido. Os organismos encontrados no trato digestivo das larvas de pirarucu consistiram principalmente de micro-crustáceos e algas. Queiroz & Sardinha (1999) em estudos realizados na reserva de desenvolvimento sustentável de Mamirauá observaram que pirarucus de até 50 cm apresentam como o principal item alimentar os ostrácodos e conostracos, com aumento na participação de camarões concomitante ao crescimento dos peixes, sendo comum peixes até maiores que 1,5 m comerem camarões e caranguejos. O pirarucu, na natureza, começa a se alimentar de peixes por volta do sexto mês de vida, e a partir daí esse é seu principal item alimentar. Os únicos itens alimentares comuns em todas as idades são os insetos aquáticos.

A criação do pirarucu

O pirarucu possui um grande potencial para o cultivo intensivo devido às suas características fisiológicas, como a respiração aérea (Fontenele, 1953; 1955) que lhe proporciona grande rusticidade (Imbiriba, 1991) e permite a sua criação em água com

baixa concentração de oxigênio; excelente taxa de sobrevivência; não manifesta canibalismo (Bard & Imbiriba, 1986); possui grande velocidade de crescimento (Sanchez, 1960) podendo atingir 10 kg em um ano (Moura Carvalho & Nascimento, 1992) e ótima conversão alimentar (Imbiriba, 2001; Cavero, 2002).

Trabalhos mais recentes demonstraram que o pirarucu suporta altas densidades de estocagem (Cavero *et al.*, 2003), possui excelente taxa de crescimento em tanques-rede (Cavero, 2002) e também em tanques escavados (Pereira-Filho *et al.*, no prelo) além de tolerarem a exposição longa a concentrações de amônia acima de 20 mg/L (Cavero *et al.* submetido). Ainda, o pirarucu é facilmente treinado quando se utiliza alimento vivo como dieta inicial (Cavero *et al.*, 2003a)

O uso de peixes como tilápias (Bard & Imbiriba, 1986; Moura Carvalho & Nascimento, 1992; Imbiriba, 2001) e acarás (Alcântara & Guerra, 1992) é muito comum no cultivo do pirarucu, sendo que este tipo de criação não apresenta uma constância de resultados no desempenho dos peixes, provavelmente devido ao sistema de manejo que precisa de uma fonte fertilizante externa para aumentar a produtividade primária do viveiro, e de uma espécie forrageira altamente prolífica. Este tipo de criação também não favorece altas densidades de estocagem de pirarucu.

Perspectivas da inclusão de enzimas digestivas exógenas na alimentação do pirarucu

O desenvolvimento de rações balanceadas que atendam as exigências nutricionais do pirarucu e que estejam adaptadas aos órgãos digestivos desta espécie são requisitos muito importantes para o sucesso da piscicultura intensiva deste peixe. Sendo assim a aplicação de enzimas digestivas exógenas pode permitir a reavaliação do uso de

fontes alimentares alternativas que já foram testadas porém não apresentaram resultados satisfatórios no desempenho e na sobrevivência de peixes carnívoros.

Devido a essas particularidades, típica dos peixes carnívoros, às características especiais do pirarucu, que o tornam uma espécie com grande potencial para a piscicultura, e as vantagens que a introdução de enzimas digestivas pode trazer para melhorar o aproveitamento de ingredientes até então sub-aproveitados no desempenho desta espécie, propõe-se a realização deste trabalho como parte das soluções que possam contribuir com informações necessárias para a viabilização da criação intensiva do pirarucu.

Referências bibliográficas

- Alcantara, F. B. & Guerra, H. F., 1992. Cultivo del paiche, *Arapaima gigas*, utilizando bujurqui, *Cichlassoma bimaculatum*, como presa. *Folia Amazonica*. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. vol. 4(1) : 129-139.
- Bard, J. & Imbiriba, E. P., 1986. Psicultura do pirarucu, *Arapaima gigas*. Boletim EMBRAPA-CPATU, 52:17 p.
- Cardenete, G.; Morales, S. E.; Moyano, F. J.; Sanz, A. & Higuera, M., 1993. Adición de enzimas exogenas como médio de mejora de la utilización digestiva de las materias primas en dietas para trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*). Abstracts: From discovery to commercialization – *World Aquaculture* 93. 19: 211.
- Cavero, B. A. S. 2002. Densidade de estocagem de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), em tanques-rede de pequeno volume. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA / Universidade do Amazonas, UA. Manaus, AM, Brasil. 51p.
- Cavero, B. A. S.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Ituassú, D. R.; Gandra, A. L.; Crescêncio, R. 2003. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, (38) 103-107.
- Cavero, B. A. S., Ituassú D. R.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Bordinhon, A. M.; Fonseca, F. A. L.; Ono, E. A. 2003a. Uso de alimento vivo como dieta inicial no treinamento alimentar de juvenis de pirarucu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, (38) 1011-1015.
- Cavero, B. A. S., Ituassú D. R.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Bordinhon, A. M.; Fonseca, F. A. L.; Ono, E. A. 2003. Tolerância de juvenis de pirarucu ao aumento

da concentração de amônia em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Submetido.

Einarsson, S.; Jönsson, A. C. & Davies, S., 1997. Seasonal variation trypsin activity in juvenile atlantic salmon upper and lower modal groups. *Journal of Fish Biology*. 51(6): 1209-1218.

Fonteles-Filho, A. A., 1989. *Recursos pesqueiros: biologia e dinâmica populacional*. Fortaleza, Imprensa Oficial do Ceará. XVI + 296p.

Fontenele, O. 1953. Hábitos de desova do pirarucu *Arapaima gigas* (CUVIER) (PISCES: Isospondyli, Arapaimidae), e evolução da sua larva. Publicação Nº 153. *Departamento Nacional de Obras Contra as Secas - DNOCS*. Fortaleza, Ceará, Brasil.

Fontenele, O. 1955. Contribuição ao conhecimento do pirarucu *Arapaima gigas* (CUVIER) em cativeiro (Actinopterygii, Osteoglossidae), Publicação Nº 166. *Departamento Nacional de Obras Contra as Secas - DNOCS*. Fortaleza, Ceará, Brasil.

Galvão, M. S. N.; Yamanaka, N.; Fenerich-Verani, N. & Pimentel, C. M. M. 1997. Estudos preliminares sobre enzimas digestivas proteolíticas da tainha, *Mugil planatus*, Gunter, 1980 (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil. *Bol. Inst. Pesca*. n 24, p.101-110.

Glass, H. J.; MacDonald, N. L.; Moran, R. M. & Stark, J. R., 1989. Digestion of protein in different marines species. *Comp. Biochem. Physiol.* Oxford. 91B(3): 607-611.

Hepher, B. 1988. *Nutrition of pond fishes*. Cambridge University Press. New York, NY, USA. X + 388p.

Imbiriba, E. P., 1991. Produção e manejo de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas* (CUVIER). *Bol. EMBRAPA-CPATU*, 57:19 p.

Imbiriba, E. P., 2001. Potencial da criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro.

Acta Amazônica, 31(2): 299-316.

Ituassú, D. R.; Caveró, B. A. S.; Pereira-Filho, M.; Crescêncio, R.; Gandra, A. L. & Roubach, R. Observações sobre a utilização de zooplâncton no treinamento alimentar de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), submetido para aceite na Revista *Acta Amazônica* do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA/2001.

Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*. 200: 181-201.

Kubitza, F., 1995. Preparo de rações e estratégias de alimentação no cultivo intensivo de peixes carnívoros. *Anais do Simpósio Internacional sobre Nutrição de Peixes Carnívoros*. Campos do Jordão, SP. 91-115p.

Kubitza, F., 1998. *Nutrição e Alimentação dos Peixes Cultivados*. Campo Grande. MS.

Kurokawa, T.; Shiraishi, M. & Suzuki, T. 1998. Quantification of exogenous protease derived of zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanoticus*) larvae. *Aquaculture*. 161: 491-499.

Landolt, M. L., 1989. The Relationship Between Diet and the Immune Response of Fish. *Aquaculture*, 79. 193-206.

Legate, N. J., Bonen, A. & Moon, T. W. 2001. Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla rostrata*), and black bullhead catfish (*Ameiurus melas*). *General and Comparative Endocrinology* 122, 48-59.

Li, G. Q. & Wilson, M. V. H., 1996. Phylogeny of Osteoglossomorpha. In: *Interrelations of Fishes*. Ed. Melanie L. Stiassny; Lynne R. Parenti e G. David

- Johnson. Academic Press, Inc. 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California, USA. p. 163-174.
- Lovell, T. 1989. *Nutrition and feeding of fish*. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. 260p.
- Moura Carvalho, L. O. D. & Nascimento, C. N. B. do., 1992. Engorda de pirarucus (*Arapaima gigas*) em associação com búfalos e suínos. Belém: EMBRAPA-CPATU. Circular Técnica, 65. 21p.
- Nelson, J. S., 1994. *Fishes of the World*. 3^a ed. Ed. John Wiley & Sons. Inc. New York, N.Y. 600p.
- Pereira-Filho M.; Cavero, B. A. S.; Roubach, R.; Ituassú, D. R.; Gandra, A. L.; Crescêncio R. Cultivo do pirarucu (*Arapaima Gigas*) em viveiro escavado. *Acta Amazônica*. No prelo.
- Pinheiro, P. E. C. & Santos, M. S. B., 1993. Effects of fish ration types on water quality. *Ciência e Cultura*. 45 (6) : 399-402.
- Queiroz, H. L. & Sardinha, A. D., 1999. A preservação e o uso sustentados dos pirarucus em Mamirauá. In: *Estratégias para manejo de recursos pesqueiros em Mamirauá*. Ed. Helder L. Queiroz e William G. R. Crampton. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá: CNPq. 208p.
- Ribeiro, L.; Zambonino-Infante, J. L.; Cahu, C. & Dinis, M. T. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*. 179 : 465-473.
- Sabapathy, U. & Teo, H. 1993. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siiganus canaliculatus*, and the sea bass, *Lates calcarifer*. *Journal of Fish Biology*. 42 (4): 595-602.

Schmidt-Nielsen, K., 1996. *Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente*.

Cambridge University Press. Ed. Livraria Santos. Santos, SP. X + 600p

Sanchez, J. R., 1960. *El Paiche: gigante del Amazonas*. Instituto del Mar del Perú.

IMARPE.

CAPÍTULO I

Respostas enzimáticas do trato digestório de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*, durante o treinamento alimentar usando alimento vivo como dieta inicial

Resumo - O objetivo deste trabalho foi verificar as respostas enzimáticas do trato digestório e testar a eficiência do alimento vivo como dieta inicial no treinamento alimentar de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*. Foram usados dois tratamentos, *Artemia* sp. e mistura de zooplâncton nativo. O ganho de peso, a porcentagem de comedores e a sobrevivência não apresentaram diferença estatística significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). As atividades lipolítica e proteolítica dos juvenis de pirarucu apresentaram gradiente positivo durante o treinamento alimentar. A introdução de ração durante o treinamento alimentar influencia na atividade enzimática digestiva de juvenis de pirarucu. A dieta inicial à base de alimento vivo é eficiente no treinamento alimentar de juvenis de pirarucu.

Enzymatic activity from the digestive tract of pirarucu, *Arapaima gigas*, juveniles during feed training with live food as an initial diet.

Abstract – The objective of this work was to verify the enzymatic responses of the digestive tract and to test the efficiency of the live food as an initial diet in the feed training of pirarucu, *Arapaima gigas*, juveniles. Two treatments, *Artemia* sp. and a native zooplankton mix were used. Weight gain, percentage of eaters and survival did not present any significant statistical difference between treatments ($p > 0.05$). Lipolytic and proteolytic activity of pirarucu juvenile presented a positive gradient during feed training. Introduction of ration feed during the feed training influenced the digestive enzymatic activity of pirarucu juvenile. Live food as an initial diet in the feed training of pirarucu, *Arapaima gigas*, juveniles were efficient.

Introdução


A criação do pirarucu, *Arapaima gigas*, na Região Amazônica vem se tornando uma atividade comercial atrativa. O aprimoramento do conhecimento do seu manejo (Cavero, 2002; Gandra, 2002; Cavero *et al.*, 2003) e de suas exigências nutricionais (Ituassú, 2002) trará indubitavelmente melhores resultados quanto ao cultivo dessa espécie.

Por ser um peixe carnívoro o pirarucu teria sua criação, em regime intensivo, dificultada por não aceitar voluntariamente rações balanceadas. Outros peixes carnívoros, como o pintado, *Pseudoplatystoma coruscans*, e o tucunaré, *Cichla sp.*, enfrentam este tipo de entrave. O desenvolvimento de estratégias de manejo alimentar pode viabilizar a criação desses peixes em regime intensivo (Lopes *et al.*, 1996; Moura *et al.*, 2000).

Estratégias de treinamento alimentar são usadas em peixes carnívoros para facilitar a aceitação de ração seca. Kubitz & Lovshin (1997a) testaram a eficiência do krill desidratado no treinamento alimentar do “largemouth bass”, *Micropterus salmoides*, obtendo resultados satisfatórios de aceitação de ração seca. Crescêncio (2001) testou a eficiência de atrativos alimentares no treinamento alimentar de juvenis de pirarucu e verificou que estes animais podem ser treinados para aceitar alimentação à base de ração seca.


O alimento vivo é uma estratégia alimentar usada para facilitar o treinamento dos peixes a aceitação de rações secas (Kubitz & Lovshin, 1999) e por ser um alimento naturalmente consumido oferece a vantagem de dispensar o uso de atrativos e possibilitar o treinamento de peixes de tamanhos menores.

Experiências com “sea bass” (*Lates calcarifer*) de hábito alimentar carnívoro e com “rabbitfish” (*Siganus canaliculatus*) de hábito alimentar onívoro mostraram que as



atividades das enzimas digestivas presentes no trato digestivo desses peixes dependem dos seus hábitos alimentares (Sabapathy & Teo, 1993). Ribeiro *et al.* (1999), estudando a atividade das enzimas digestivas nas larvas e juvenis de *Solea senegalensis*, observaram que o aumento dessa atividade depende da maturação das células do intestino. Galvão *et al.* (1997) observaram tendência semelhante estudando a tainha, *Mugil planatus*, durante as fases de larva e juvenil, estabelecendo que a atividade enzimática aumenta de acordo com a idade.

Outro fato importante foi observado por Kurokawa *et al.* (1998) que verificaram que a contribuição de enzimas digestivas exógenas em *Sardinops melanoticus* a partir do zooplâncton é insignificante, podendo indicar que as enzimas digestivas presentes no período larval dos peixes sejam suficientes para desempenhar as funções digestivas. Embora essa contribuição seja pequena, a retirada do alimento vivo e a introdução de alimento artificial na fase larval pode ser dificultada por causa da baixa atividade enzimática.



Entretanto, o estudo da fisiologia digestiva em larvas e juvenis de peixes tem se resumido, na maioria dos casos, a satisfazer às necessidades da formulação de dietas, sem antes entender a ontogenética dos seus sistemas digestivos (Kolkovski, 2001) e o perfil da atividade das suas enzimas digestivas.

O objetivo deste trabalho foi verificar a resposta enzimática do trato digestório a introdução de alimento artificial e testar a eficiência do alimento vivo como dieta inicial no treinamento alimentar de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*.

Material e métodos

O trabalho foi realizado na Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) de 5 a 21 de dezembro de 2002.

Oitocentos e quatro juvenis de pirarucu com peso médio de $1,5 \pm 0,1$ g e comprimento total médio de $5,0 \pm 0,1$ cm, oriundos do município de Coari, AM, Brasil, foram distribuídos homogeneamente ($p > 0,05$) em seis tanques circulares de PVC com capacidade de 500 L (volume útil de 400 L) e vazão de 10 L/h.

Os peixes foram alimentados seis vezes ao dia às 8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00 e 18:00 h. O experimento teve duração de nove dias e foram testados dois tipos de alimento vivo como tratamentos, náuplios de *Artemia* sp. e mistura de zooplâncton, cada um com três repetições.

A mistura de zooplâncton foi coletada em um viveiro com fundo de argila de 120 m² através de uma rede de plâncton de 60 µm de malha. Nessa ocasião foi observada a predominância dos grupos copépoda e cladócera. Os peixes foram alimentados com zooplâncton diluído em 5 L de água por alimentação nas seguintes proporções: Copédoda 134.000 indivíduos/L e Cladocera 26.000 indivíduos/L. Para a alimentação com *Artemia* sp. foram eclodidas 60 g ao longo do experimento na proporção de 133.000 indivíduos/L por alimentação.

O experimento foi realizado em três fases (quatro dias cada). A primeira consistiu em fornecer o alimento vivo diluído em água. Na segunda fase, junto com alimento vivo diluído em água, introduziu-se gradativamente a ração nas seguintes proporções: 1º dia: 1% da biomassa dos peixes, 2º dia: 2% da biomassa dos peixes e 3º dia: 3% da biomassa dos peixes. Na terceira fase, os peixes foram alimentados apenas com ração até a saciedade. A ração utilizada no experimento foi comercial específica

para peixes carnívoros, com 45% de proteína bruta e 3.000 kcal de energia bruta/kg de ração, extrusada e triturada. O tamanho das partículas da ração em ambos os tratamentos foi de aproximadamente 100 μm .

Para determinar o perfil das enzimas digestivas presentes no trato digestório dos juvenis de pirarucu, foram sacrificados, em dias alternados, através de choque térmico, 6 peixes do lote de juvenis de pirarucu em processo de treinamento alimentar para coleta dos tratos digestivos, totalizando 72 amostragens (24) (em cada período). Cada um dos peixes foi necropsiado e deles coletados os tratos digestórios, os quais foram identificados e embalados individualmente em recipientes próprios e conservados a -20°C até o momento dos ensaios enzimáticos. O perfil enzimático foi descrito ao longo do treinamento alimentar. Os tratos digestórios dos peixes foram divididos em estômago para a determinação da protease ácida e em intestino para a determinação da protease alcalina. Cada porção foi homogeneizada em tampão Fosfato (10 mM)-tris (20 mM)/glicerina a 4°C . Com a finalidade de verificar se houve influencia dos parâmetros ambientais foi determinada a atividade da protease exógena.

Como solução de substrato da reação para a determinação da atividade proteolítica foi utilizada caseína a 1%. Para os ensaios de pH foi usado 1 mL de tampão glicina/HCl 0.1 M (pH ácido) e 1 ml de tampão tris-HCl 0,1 M (pH alcalino). A variação de temperatura foi de 20 a 45°C . A variação da concentração de enzima “*in vitro*” foi realizada usando protease endógena contida nos homogeneizados celulares. Após a incubação da mistura a reação foi interrompida pela adição de 250 μl de TCA (ácido tricloroacético) a 8% e centrifugada a 3000 g por 10 minutos. A absorbância do sobrenadante foi medida em 280 nm (Hidalgo *et al.*, 1999).

Para a determinação da atividade enzimática das proteases ácida e alcalina foi utilizada tirosina como padrão. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de 1µg de tirosina por minuto.

A atividade enzimática da lipase dos homogeneizados celulares foi medida segundo Gawlicka *et al.* (2000). O homogeneizado foi incubado em tampão bicarbonato de amônio 24 mM, pH 7.8, contendo 0,4 mM de substrato (p-nitrophenyl myristate, Sigma N2502) diluído em 0,5% de Triton X-100. O tempo de incubação foi de 30 minutos e a leitura da absorbância da amostras em 405 nm.

A atividade amilohidrolítica foi estimada segundo o método proposto por Bernfeld (1955) modificado. A reação foi incubada em 1,0 mL de tampão citrato de sódio/fosfato de sódio mono-básico 0,2M pH 8,0 e 1 mL de solução de amido a 0,5% em tampão adicionando 100µL de homogeneizado celular. A mistura da reação foi incubada por 30 minutos a 30°C. Decorrido o tempo de reação, foi adicionado 250µL de sulfato de zinco a 5% e seguidamente 250µL de hidróxido de bário 0,3N. Sendo a mistura da reação centrifugada a 12.000 g por 3 minutos. No sobrenadante foi estimada a concentração de glicose pelo método de Park-Johnson (1949).

A determinação das atividades de protease, lipase e amilase nos extratos obtidos dos tratamentos digestórios dos juvenis de pirarucu foram determinadas espectrofotometricamente por "end point" (Worthington Enzyme Manual, 1982) e foram expressos em UI/mg de proteína. Os teores de proteína dos homogeneizados foram obtidos pelo método de Lowry (Villela *et al.*, 1973).

Após a fase de treinamento os peixes passaram por um período de observação de seis dias com a finalidade de quantificar a porcentagem de comedores (% de peixes que aceitavam ração), a sobrevivência (100.nº de peixes finais/nº de peixes iniciais), e o ganho de peso (peso médio final – peso médio inicial).

Foram realizadas visualmente observações sobre o comportamento dos peixes quanto à ocorrência de agressões, competição por alimento e canibalismo.

Foram monitorados diariamente às 09:00 os seguintes parâmetros físico-químicos da água: oxigênio dissolvido (mg/L), pH, temperatura (°C), amônia total (NH₃ + NH₄) (mg/L), condutividade elétrica (μS/cm²), alcalinidade (CaCO₃g/L), dureza (CaCO₃g/l) e CO₂ (mg/L).

As médias dos tratamentos dos parâmetros da qualidade da água dos tanques, dos peixes que aceitavam ração (comedores), da sobrevivência, e do ganho de peso foram comparadas pelo teste “t” de student a 5% de significância (Mendes, 1999). Os valores da sobrevivência e dos comedores, expressos em porcentagens foram submetidos à transformação de arc seno (Mendes, 1999).

Resultados e discussão

Os parâmetros físico-químicos da água não apresentaram variações que pudessem interferir no desempenho dos peixes em ambos os tratamentos (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com os sugeridos para a espécie por Cavero (2002).

A temperatura é um dos fatores que influencia na regulação enzimática dos peixes, já que em dias frios estes costumam alimentar-se menos, causando menor estimulação mecânica no trato digestivo, diminuindo com isso a estimulação para a secreção de colecistoquinina (Einarsson *et al.*, 1997), hormônio responsável pela ativação da secreção pancreática (Schmidt-Nielsen, 1996). Durante o experimento a temperatura da água dos tanques experimentais permaneceu estável (Tabela 1) indicando que este fator não interferiu na atividade enzimática dos peixes, nas diferentes fases do treinamento alimentar.

Tabela 1. Parâmetros da qualidade da água (média \pm desvio padrão), durante o treinamento alimentar de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*, com alimento vivo como dieta inicial ⁽¹⁾.

Parâmetro observado	Tratamentos			
	<i>Artemia</i> sp.	Mistura de zooplâncton	"t"	GL
pH	6,1 \pm 0,4 a	6,2 \pm 0,4 a	1,23	35
Temperatura (°C)	26,3 \pm 0,4 a	26,4 \pm 0,5 a	1,26	35
Condutividade elétrica (μ S/cm ²)	33,9 \pm 4,6 a	39,4 \pm 5,0 a	1,30	35
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,1 \pm 0,3 a	5,9 \pm 0,2 a	1,26	35
Amônia total (NH ₃ + NH ₄)	3. 10 ⁻³ \pm 10 ⁻³ a	2. 10 ⁻³ \pm 10 ⁻³ a	1,77	35
Alcalinidade (mg de CaCO ₃ /L)	17,8 \pm 3,9 a	18,9 \pm 2,9 a	1,36	35
Dureza (mg de CaCO ₃ /L)	8,5 \pm 2,6 a	9,1 \pm 2,8 a	1,36	35
Gás Carbônico (mg/L)	0,6 \pm 0,2 a	0,5 \pm 0,1 a	1,57	35

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste "t" de student a 5% de probabilidade.

Glass *et al.* (1989) afirmaram que o conhecimento exato da quantidade e especificidade de cada enzima presente num sistema digestório, e as condições em que ocorre a hidrólise enzimática, permitem estimar a digestibilidade dos alimentos com maior precisão.

A presença de atrativos na ração pode facilitar a ingestão do alimento e estimular o sistema digestório (Kolkovski, 2001), principalmente na secreção de enzimas digestivas. No presente estudo a atividade enzimática das proteases alcalina e ácida e lipase foi maior quando a transição foi realizada a partir de zooplâncton nativo quando do que a partir de *Artemia* sp. (Figuras 1 e 2). Provavelmente essa relação seja devida a que esses microrganismos representam o alimento natural nas primeiras fases de vida do pirarucu. Entretanto em ambos os tratamentos, houve um incremento da atividade enzimática quando a ração foi introduzida.

A atividade enzimática dos peixes aumentou durante o treinamento alimentar (Figuras 1 e 2), mostrando que existe uma resposta enzimática à introdução de ração em juvenis de pirarucu durante a transição alimentar. Provavelmente esta situação seja otimizada pela aceitação de ração através deste método de condicionamento alimentar.

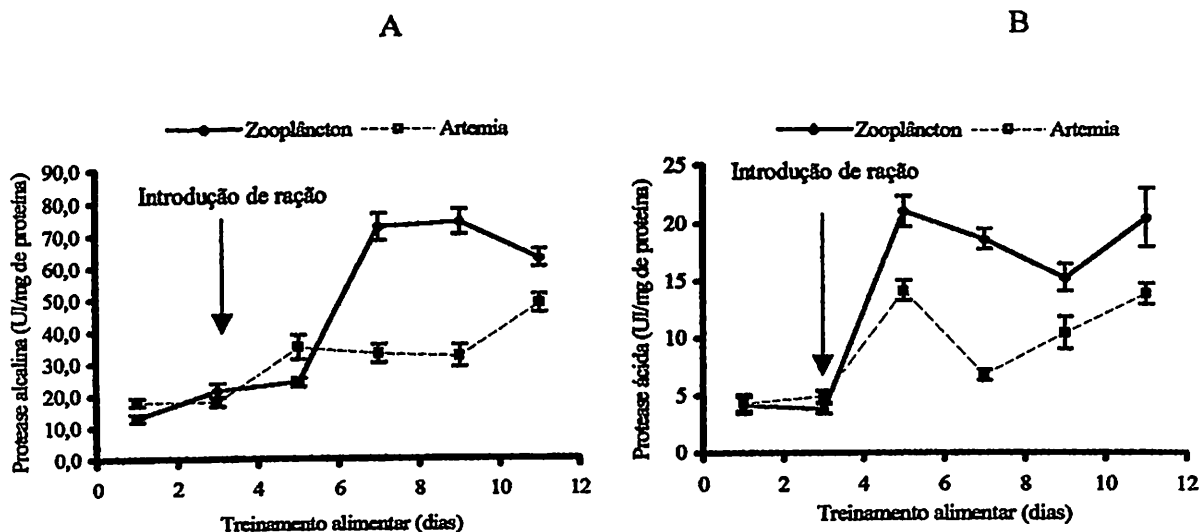


Figura 1. Perfil da atividade enzimática, protease alcalina (pH 8,0)(A) e protease ácida (pH 3,0)(B), de juvenis de pirarucu ao longo do treinamento alimentar. Substrato de caseína 1%, 100 μ L de homogeneizado.

Ribeiro *et al.* (1999) estudando a atividade das enzimas digestivas nas larvas e juvenis de *Solea senegalensis* observaram que o aumento dessa atividade depende da maturação das células do intestino. Galvão *et al.* (1997) observaram tendência semelhante estudando a tainha, *Mugil planatus*, durante as fases de larva e juvenil, estabelecendo que a atividade enzimática aumenta de acordo com a idade. O incremento da atividade enzimática dos juvenis de pirarucu constatada neste trabalho, parece estar associado aos fatores citados por Galvão *et al.* (1997) e Ribeiro *et al.* (1999).

Kurokawa *et al.* (1998) verificaram que a contribuição de enzimas digestivas exógenas em *Sardinops melanoticus* a partir do zooplâncton é insignificante, podendo indicar que as enzimas digestivas presentes no período larval dos peixes sejam suficientes para desempenhar as funções digestivas.

No decorrer do treinamento alimentar, os juvenis de pirarucu aceitaram a alimentação à base de ração, indicando que este tipo de sucessão é viável dispensando o uso de atrativos alimentares.

A baixa atividade enzimática amilolítica (Figura 2) é relacionada ao hábito alimentar do pirarucu, uma vez que peixes carnívoros possuem baixas taxas de secreção

de amilase (Hepher, 1988). Além disso, a atividade amilolítica não sofreu a influência da introdução de ração, mesmo contendo amido pré-gelatinizado, processo de cozimento que aumenta a digestibilidade e aproveitamento do amido por peixes carnívoros (Kubitza, 1998).

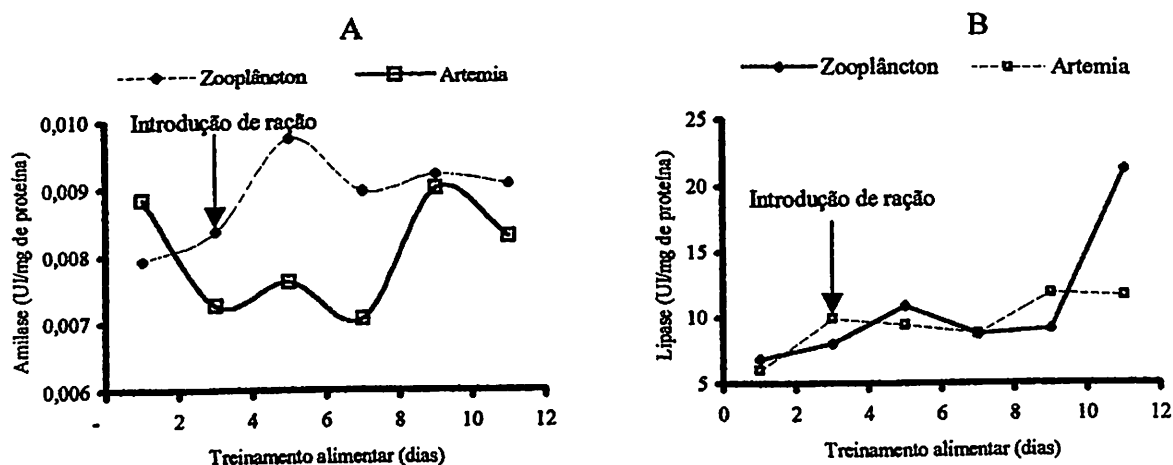


Figura 2. Atividade específica de amilase (A) e lipase (B), de juvenis de pirarucu ao longo do treinamento alimentar. Amilase: Amido 1%, pH 8,0, 100 μ L de homogeneizado. Lipase: p-nitrophenyl myristate 0,4mM, Sigma N2502, pH 7,8, 100 μ L de homogeneizado.

Com relação à porcentagem de comedores, ganho de peso e sobrevivência os tratamentos não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Moura *et al.* (2000) realizaram o treinamento alimentar de alevinos de tucunaré, *Cichla* sp. de aproximadamente 1,7 g, utilizando o método de transição gradual de ingredientes na ração, obtendo um sucesso de treinamento alimentar de 39,8% de comedores.

Crescêncio (2001), utilizando atrativos alimentares durante o treinamento de juvenis de pirarucu de aproximadamente 22 g, através do método de transição gradual de ingredientes de ração observou que os atrativos alimentares utilizados (camarão, glutamato monossódico e ensilado biológico) não foram diferentes estatisticamente em

relação ao tratamento sem atrativo. O método de treinamento usado por Crescêncio (2001) foi eficiente, apresentando um sucesso de 68,7% de comedores.

No presente trabalho a porcentagem de comedores foi de aproximadamente 99% utilizando alimento vivo como dieta inicial (Tabela 2).

Tabela 2. Sobrevivência, percentual de comedores e ganho de peso de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*, submetidos a treinamento alimentar com alimento vivo com dieta inicial ⁽¹⁾.

Dieta inicial	Sobrevivência (%)	% comedores	Ganho de peso (g)
<i>Artemia</i> sp.	99,0 ± 0,4 a	99,0 ± 0,4 a	1,0 ± 0,1 a
Zooplâncton	99,8 ± 0,4 a	99,8 ± 0,4 a	1,0 ± 0,1 a
Graus de Liberdade	2	2	2
“t”	4,03	4,03	4,27

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste “t” de student a 5% de probabilidade. Os valores expressam a média ± desvio padrão.

Kubitza & Lovshin (1997b) testaram o krill desidratado durante o treinamento alimentar do “largemouth bass” (*Micropterus salmoides*) como estratégia para a aceitação de rações secas e verificaram que o sucesso de treino aumenta proporcionalmente à concentração deste atrativo na dieta e inversamente ao número de dias de treinamento.

Lopes *et al.* (1996) utilizaram o rotífero marinho *Brachionus plicatillis*, náuplios de *Artemia salina* e o cladóceros *Moina micrura* na alimentação de larvas do surubim pintado, *P. coruscans*, e observaram que esta espécie aceita bem o alimento vivo como dieta inicial. No presente trabalho o uso de alimento vivo como dieta inicial no treinamento de juvenis de pirarucu apresentou a mesma tendência.

Kubitza & Lovshin (1999) afirmam que a produção intensiva de peixes carnívoros pode ser dificultada quando o alimento vivo é o único item alimentar. Entretanto, seu uso como dieta inicial no treinamento alimentar de peixes carnívoros é amplamente aceito. Provavelmente, o uso de alimento vivo seja a estratégia alimentar mais viável para facilitar a aceitação de rações por parte de juvenis de pirarucu, uma vez

que é um alimento naturalmente consumido, podendo oferecer a vantagem de treinar peixes de tamanhos menores e de não ser necessário o uso de atrativos.

O resultado de Crescêncio (2001), com tempo de treinamento de 20 dias, no melhor tratamento, foi de 68,7% para o número de comedores e de 68,8% para a sobrevivência. No presente trabalho o tempo de treinamento alimentar dos juvenis de pirarucu foi de nove dias mostrando índices de comedores e de sobrevivência satisfatórios em ambos os tratamentos (Tabela 2).

Juvenis de pirarucu apresentam associação gregária e podem ser influenciados por condições que favoreçam o estabelecimento de classes hierárquicas aumentando com isso a heterogeneidade do lote (Cavero *et al.*, 2003) e podendo resultar em agressões. Kubitzka & Lovshin (1999) citam que este tipo de comportamento pode ocorrer durante o treinamento alimentar de diversas espécies de peixes carnívoros. Provavelmente as agressões observadas no presente trabalho, mordidas nas nadadeiras caudais, estejam associadas à mudança repentina da alimentação durante o treinamento alimentar, fato que pode ter influenciado no comportamento dos peixes. Entretanto, não existem registros na literatura de canibalismo e/ou agressões entre juvenis de pirarucu criados em cativeiro.

Conclusões

O treinamento alimentar de juvenis de pirarucu com alimento vivo como dieta inicial é eficaz.

A resposta enzimática de juvenis de pirarucu com relação à introdução de alimento seco é positiva.


Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq e à Agência Española de Cooperación Internacional/AECI - Projeto Pirarucu, pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

- Bernfeld, P. 1955. α - and β -amylases. In *Methods in Enzymology*. Ed. Colowick, s.p. & Kaplan. vol 1. New York: Academic Press.
- Cavero, B. A. S. *Densidade de estocagem de juvenis de pirarucu, Arapaima gigas (Cuvier, 1829) em tanques-rede de pequeno volume*. 2002. 51f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, AM, 2002.
- Cavero, B. A. S.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Ituassú, D. R.; Gandra, A. L.; Crescêncio, R. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu, em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 1, p. 103-107, jan. 2003.
- Crescêncio, R. *Treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, Arapaima gigas (Cuvier, 1829), utilizando atrativos alimentares*. 2001. 35f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, AM, 2001.
- Einarsson, S.; Jönsson, A. C. & Davies, S., 1997. Seasonal variation trypsin activity in juvenile atlantic salmon upper and lower modal groups. *Journal of Fish Biology*. 51(6): 1209-1218.
- Galvão, M. S. N.; Yamanaka, N.; Fenerich-Verani, N. & Pimentel, C. M. M. 1997. Estudos preliminares sobre enzimas digestivas proteolíticas da tainha, *Mugil planatus*, Gunter, 1980 (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil. *Bol. Inst. Pesca*. n 24, p.101-110.
- Gandra, A. L. *Estudo da frequência alimentar do pirarucu, Arapaima gigas (Cuvier, 1829)*. 2002. 36f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 2002.

- Gawlicka, A., Parent, B., Horn, H.M., Ross, N., Opstad, I., Torrissen, J. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture*. (184) 303-314p.
- Glass, H. J.; MacDonald, N. L.; Moran, R. M. & Stark, J. R., 1989. Digestion of protein in different marine species. *Comp. Biochem. Physiol.* Oxford. 91B(3): 607-611.
- Hepher, B. 1988. *Nutrition of pond fishes*. Cambridge University Press. New York, NY, USA. X + 388p.
- Ituassú, D. R. *Exigência protéica de juvenis de pirarucu, Arapaima gigas (Cuvier, 1829)*. 2002. 38f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, AM, 2002.
- Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*. 200: 181-201.
- Kubitza, F., 1998. *Nutrição e Alimentação dos Peixes Cultivados*. Campo Grande. MS.
- Kubitza, F.; Lovshin, L. L. Formulated diets, feeding strategies, and cannibalism control during intensive culture of juvenile carnivorous fishes. *Reviews in Fisheries Science*, Amsterdam, v.7, p. 1-22, 1999.
- Kubitza, F.; Lovshin, L. L. Effects of initial weight and genetic strain on feed training largemouth bass *Micropterus salmoides* using ground fish flesh and freeze dried krill as starter diets. *Aquaculture*, Amsterdam, v.148, p. 179-190, 1997a.
- Kubitza, F.; Lovshin, L. L. The use of freeze-dried krill to feed train largemouth bass (*Micropterus salmoides*): feeds and training strategies. *Aquaculture*, Amsterdam, v.148, p.299-312, 1997b.




Kurokawa, T.; Shiraishi, M. & Suzuki, T. 1998. Quantification of exogenous protease derived of zooplankton in the intestine of Japanese sardine (*Sardinops melanoticus*) larvae. *Aquaculture*. 161: 491-499.

Lopes, M. C.; Freire, R. A. B.; Vicensotto, J. R. M.; Senhorini, J. A. 1996. Alimentação de larvas de surubim pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829), em laboratório, na primeira semana de vida. *B. Téc. CEPTA*, Pirassununga, v. 9, p. 11-29.

Mendes, P. P. *Estatística aplicada à aquicultura*. Recife: Bagaço. 1999. 265p.

Moura, M. A. M.; Kubitza, F.; Cyrino, J. E. P. 2000. Feed training of peacock bass (*Cichla* sp.). *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v. 60, n. 4, p. 645-654.

Park, J. T. & Johnson, M. J. 1949. A submicro determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 181: 149-151



Ribeiro, L.; Zambonino-Infante, J. L.; Cahu, C. & Dinis, M. T. 1999. Development of digestive enzymes in larvae of *Solea senegalensis*, Kaup 1858. *Aquaculture*. 179 : 465-473.

Sabapathy, U. & Teo, H. 1993. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siiganus canaliculatus*, and the sea bass, *Lates calcarifer*. *Journal of Fish Biology*. 42 (4): 595-602.

Schmidt-Nielsen, K., 1996. *Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente*. Cambridge University Press. Ed. Livraria Santos. Santos, SP. X + 600p

Villela, G. G.; Bacila, M & Tastaldi, H. 1973. *Técnicas e experimentos de bioquímica*. Ed. Gunabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 552p.

Worthington Enzyme Manual, 1982. Enzyme, enzyme reagents, related, biochemicals. *Worthington Biochemical Corporation*. Freshold. New Jersey, USA. 215p.

CAPÍTULO II


Efeito da inclusão de protease exógena no desempenho zootécnico de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829)

Resumo - O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da adição de enzima digestiva exógena de ação proteolítica na ração, sobre o desempenho de juvenis de pirarucu. O trabalho foi realizado com três níveis de inclusão da enzima, além do controle: 0,0; 0,1; 0,2 e 0,4%, seguindo um delineamento inteiramente casualizado. O efeito dos tratamentos com inclusão de protease exógena na ração apresentou diferença significativa no desempenho dos peixes ($p < 0,05$) com relação ao tratamento controle. A enzima digestiva exógena protease, quando adicionada à ração, influencia no desempenho zootécnico de juvenis de pirarucu.

The effect of exogenous protease inclusion on growth performance of pirarucu, *Arapaima gigas*, juveniles.


Abstract - The objective of this work was to verify the effect of the addition of exogenous digestive enzyme protease in the feed on the performance of pirarucu juveniles. The work was carried with three levels of the enzyme, beside the control: 0.0; 0.1; 0.2 and 0.4%, in a complete randomized design. Treatments effect from the exogenous protease inclusion in the feed presented significant difference ($p < 0.05$) in fish performance when compared to the control treatment. Exogenous protease enzyme when added to the feed presented a positive growth performance in pirarucu juvenile.

Introdução




A criação de peixes carnívoros apresenta uma situação bem particular, uma vez que estes animais possuem elevada exigência por proteína, item mais caro na formulação das rações, principalmente a de origem animal (Regost *et al.*, 1999) como a farinha de peixe, tradicionalmente utilizada na ração para espécies carnívoras (Cheng *et al.*, 2003). A necessidade de substituir parcialmente a fração protéica animal por vegetal é uma alternativa para baratear os custos de produção e tornar esta atividade mais atrativa comercialmente.

Alguns estudos testando a inclusão de insumos vegetais extrusados, como a leguminosa *Lupinus albus*, tiveram resultados satisfatórios (Burel *et al.*, 1998; 2000) na criação de peixes carnívoros em condições experimentais, entretanto o aporte de carboidratos junto aos ingredientes vegetais é um problema na alimentação desses peixes.




Os carboidratos poderiam ser utilizados como uma alternativa, porém o metabolismo dos peixes carnívoros está adaptado para utilizar proteínas como principal fonte energética (Peres & Oliva-Teles, 2002). Isto se deve ao aproveitamento mais eficiente de aminoácidos em relação à glicose, na obtenção de energia e a habilidade de excretar nitrogênio sob forma de amônia, dispensando o gasto de energia na formação de uréia ou ácido úrico, como no caso de mamíferos e aves, respectivamente (Chow e Halver, 1980).

McGoogan e Reigh (1996) estudando o “red drum”, *Scianops ocellatus*, espécie de peixe carnívoro, encontraram baixa digestibilidade para matéria prima vegetal da dieta. No mesmo estudo os autores concluíram que esta espécie utiliza maior quantidade de energia contida em lipídeos e proteínas, se comparado com carboidratos.



O pirarucu, *Arapaima gigas*, natural da bacia amazônica, é um peixe de grande porte, podendo alcançar 3 m de comprimento e 200 kg de peso na natureza (Souza & Val, 1991). Apresenta respiração aérea obrigatória (Brauner & Val, 1996), condição fisiológica que lhe permite tolerar águas com baixos níveis de oxigênio dissolvido.



A ausência de espinhas intramusculares, o rendimento médio de filé de 57% (Imbiriba 2001) e a excelente palatabilidade de sua carne fizeram deste peixe uma espécie de elevado valor comercial (Saint-Paul, 1986) mas devido ao seu hábito alimentar não está alheio à problemática que os peixes carnívoros apresentam. Sua exigência por proteína é elevada (Ituassú, 2002), mas apresenta boa conversão alimentar quando o manejo é adequado (Cavero *et al.*, 2003; Gandra, 2002). Apresenta ainda associação gregária e ausência de canibalismo, fato que permite sua estocagem em altas densidades (Cavero *et al.*, 2003). Estes resultados, aliados a sua alta taxa de crescimento, onde, em sistemas extensivos, pode chegar até 10 kg no primeiro ano de vida (Bard & Imbiriba, 1986), fazem desta espécie uma excelente opção para a piscicultura. Aceita rações formuladas quando treinado (Crescêncio, 2001) o que facilita a adoção de novas tecnologias e o teste de novos insumos através da alimentação. Provavelmente, com a ajuda da inclusão de enzimas digestivas exógenas esses resultados podem melhorar ainda mais. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da adição de protease exógena na ração sobre o desempenho de juvenis de pirarucu.

Material e métodos

Este trabalho foi realizado na Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura (CPAQ) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) no período de 13 de janeiro a 18 de fevereiro de 2003. Foi testada a adição de protease exógena em três

concentrações (0,1; 0,2 e 0,4%) com testemunha. A protease exógena utilizada neste trabalho foi obtida a partir do fungo *Aspergillus oryzae*. (Alltech do Brasil).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (incluindo o controle) e 4 repetições, totalizando 16 unidades experimentais. As unidades experimentais foram formadas por tanques de plástico de 310 L (volume útil de 250 L) com vazão aproximada de 5 L/h.

Os peixes foram inicialmente pesados e medidos e distribuídos homogeneamente em cada uma das unidades experimentais. Em cada unidade experimental foram estocados 10 juvenis de pirarucu de $6,6 \pm 0,5$ g e $10,0 \pm 0,1$ cm de comprimento total, os quais foram alimentados até a saciedade aparente 5 vezes ao dia (08:00; 11:00; 14:00; 17:00 e 19:00h) durante um período de 37 dias.

A ração utilizada no experimento foi comercial específica para peixes carnívoros (Purina TC45, Agribands, Paulínia, SP, Brasil), com 45% de proteína bruta e 3.000 kcal de energia bruta/kg de ração, extrusada e triturada (Quadro 1).

Quadro 1. Composição centesimal da ração comercial para peixes carnívoros com 45% de proteína e 3000 kcal de energia bruta/kg, extrusada (Purina TC45, Agribands, Paulínia, SP, Brasil)*.

Umidade (%)	Dados a 100% de matéria seca				
	PB	EE	CH ₂ O	Cinzas	FB
8,9*	46,5*	10,5*	30,6*	10,0*	2,4*
13,0**	45,0**	14,5**	20,5**	14,0**	6,0**


* Análise bromatológica realizada no laboratório de Nutrição de Peixes da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura/CPAQ do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA.

** Valores fornecidos pelo fabricante da ração.

Legenda:


PB = Proteína bruta; EE = Extrato etéreo (gordura); CH₂O = Carboidrato; FB = Fibra bruta

A qualidade da água foi monitorada, uma vez ao dia (17:00h) avaliando os seguintes parâmetros físico-químicos: amônia (mg/L), nitrito (mg/L), pH, temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg/L) e condutividade (µS/cm) da água.



Ao final do experimento os peixes foram pesados e medidos para verificar o efeito dos tratamentos sobre o desempenho dos mesmos. A partir dos resultados obtidos foram calculados os seguintes índices de desempenho zootécnico: Ganho de peso (GP) = peso final – peso inicial; Consumo médio de ração no final do experimento (CMFi) = Σ Consumo médio diário (por tanque experimental); Conversão alimentar aparente (CAA) = CMFi / (Peso médio final – Peso médio inicial); Taxa de crescimento específico (TCE) = $100 * (\ln \text{Peso médio Final} - \ln \text{Peso médio inicial}) / \text{tempo (dias)}$ e sobrevivência (S) = $100 * (\text{n}^\circ \text{ de peixes no final do experimento} / \text{n}^\circ \text{ de peixes no início do experimento})$.

Os tratos digestórios de trinta e seis peixes foram divididos em estômago para a determinação da protease ácida e em intestino para a determinação da protease alcalina. Cada porção foi homogeneizada em tampão Fosfato (10 mM)-tris (20 mM)/glicerina a 4°C. Com a finalidade de verificar se houve influencia dos parâmetros ambientais foi determinada a atividade da protease exógena.



Como solução de substrato da reação para a determinação da atividade proteolítica foi utilizada caseína a 1%. Para os ensaios de pH foi usado 1 mL de tampão glicina/HCl 0.1 M (pH ácido) e 1 ml de tampão tris-HCl 0,1 M (pH alcalino). A variação de temperatura foi de 20 a 45 °C. A variação da concentração de enzima “*in vitro*” foi realizada usando protease exógena diluída na seguinte proporção: 0,5 g de protease/10 mL de água destilada e protease endógena contida nos homogeneizados celulares. Após a incubação da mistura a reação foi interrompida pela adição de 250 μ l de TCA (ácido tricloroacético) a 8% e centrifugada a 3000 g por 10 minutos. A absorbância do sobrenadante foi medida em 280 nm (Hidalgo *et al.*, 1999).

Para a determinação da atividade enzimática das proteases ácida e alcalina foi utilizada tirosina como padrão. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de 1µg de tirosina por minuto.


Para garantir a homogeneidade dos peixes no início do experimento, estes foram pesados (g) e a seguir os dados foram analisados através de teste “F” a 5% de probabilidade (Ayres *et al.*,2000). Os dados da biometria final dos tratamentos foram submetidos á análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Mendes, 1999).

Resultados e discussão

As concentrações de amônia total (NH₃+NH₄) e nitrito (NO₂⁻), e as medidas de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade na água nos tanques experimentais, não apresentaram variações que pudessem indicar a influência destes parâmetros ambientais sobre o desempenho dos juvenis de pirarucu (Tabela 1). Estas variações estão de acordo com as sugeridas para a criação da espécie (Cavero *et al.*, 2003).

Tabela 1. Valores médios ± desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água, durante o período experimental de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* alimentados com ração+protease.


Parâmetro observado	Controle	Protease 0,1%	Protease 0,2%	Protease 0,4%
Ph	5,0 ± 0,1 a	4,9 ± 0,2 a	5,1 ± 0,1 a	4,9 ± 0,2 a
Temperatura (°C)	26,7 ± 0,4 a	26,5 ± 0,3 a	26,6 ± 0,2 a	27,0 ± 0,1 a
Condutividade elétrica (µS/cm ²)	34,7 ± 5,7 a	31,9 ± 3,1 a	39,8 ± 6,9 a	36,4 ± 8,9 a
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,3 ± 0,3 a	5,4 ± 0,2 a	4,9 ± 0,1 a	5,2 ± 0,2 a
Amônia total (NH ₃ + NH ₄)	0,3 ± 0,06 a	0,4 ± 0,1 a	0,4 ± 0,1 a	0,3 ± 0,1 a
Nitrito (mg/L)	4.10 ⁻³ ± 10 ⁻³ a	4.10 ⁻³ ± 2.10 ⁻³ a	5.10 ⁻³ ± 4.10 ⁻³ a	3.10 ⁻³ ± 2.10 ⁻³ a



Peixes carnívoros possuem alta exigência de proteína na dieta, geralmente atribuída ao seu hábito alimentar e ao uso preferencial desse nutriente como fonte de energia dietética (Halver, 1980).

A proteína bruta é o componente mais caro das rações de peixes (Cheng *et al.*, 2003) e a farinha de peixe é tradicionalmente usada como a maior fonte de proteína na ração de espécies carnívoras, participando com 30 a 50% da composição (Hardy, 1999).

O suprimento limitado e o alto custo deste ingrediente têm forçado os pesquisadores a considerar fontes alternativas de proteína (Akiyama, 1988) como o farelo de soja que se apresenta como uma boa opção devido a sua qualidade nutricional, baixo custo e boa disponibilidade no mercado (Boonyaratpalin & Tunpibal, 1998; Regost *et al.*, 1999).



Alguns trabalhos realizados substituindo a farinha de peixe por fontes protéicas de origem vegetal, alertam sobre a presença de fatores antinutricionais (Robaina *et al.*, 1997; Burel *et al.*, 2000), que em geral são inibidores de proteases, limitando a porcentagem de inclusão da proteína vegetal na formulação de rações para espécies carnívoras (Fowler, 1980; Boonyaratpalin & Tunpibal, 1998).

Esta situação pode ser melhorada utilizando proteases exógenas nas rações de peixes carnívoros. Ng *et al.* (2002) observaram que a adição de enzimas exógenas na ração aumenta o valor nutritivo do farelo de palmeira para tilápia, *Oreochromis* sp. e melhora o desempenho zootécnico do salmão do Atlântico, *Salmo salar*, quando alimentado com rações contendo farelo de soja (Carter *et al.*, 1994). Segundo Sheppy (2001), a adição de protease na ração pode ajudar a neutralizar os efeitos negativos dos fatores antinutricionais, relacionados à proteína de origem vegetal, além de otimizar a quebra das moléculas de proteína existentes.

A digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta pode ser melhorada com o uso de aditivos enzimáticos, que auxiliam o processo digestivo. Entretanto, na piscicultura, a adoção e o uso da tecnologia de enzimas exógenas tem sido relativamente lenta (Officer, 2000).

Os resultados encontrados neste trabalho para a inclusão de protease exógena na ração para alimentação de juvenis de pirarucu, apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento controle ($p < 0,05$) (Tabela 2) com relação aos parâmetros de crescimento, mostrando que a digestão de proteína contida na ração foi potencializada, influenciando positivamente no desempenho dos peixes.

Tabela 2. Médias do peso inicial, do peso final, do ganho de peso, da taxa de crescimento específico, da conversão alimentar aparente e da sobrevivência de juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*) mantidos em condições experimentais e alimentados com suplementação de protease exógena durante 37 dias ⁽¹⁾.

Variáveis observadas	% de inclusão de protease na ração			
	0,0	0,1	0,2	0,4
Peso Inicial	6,0 ± 0,4 a	6,0 ± 0,5 a	6,3 ± 0,7 a	6,2 ± 0,3 a
Peso Final	16,7 ± 2,1 b	25,9 ± 4,5 a	22,6 ± 2,5 a	26,0 ± 5,6 a
Ganho de Peso	10,7 ± 2,0 b	20,0 ± 4,7 a	16,3 ± 2,3 a	19,9 ± 5,7 a
Taxa de Crescimento específico	2,7 ± 0,3 a	3,8 ± 0,5 a	3,3 ± 0,3 ab	3,7 ± 0,6 a
Conversão Alimentar Aparente	1,8 ± 0,3 a	0,8 ± 0,06 b	0,8 ± 0,06 b	0,8 ± 0,06 b
Sobrevivência	82,5 ± 9,5 a	63,3 ± 15,3 a	80,0 ± 17,3 a	66,7 ± 1,5 a

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores das variáveis são apresentados como média ± desvio padrão.

A atividade enzimática da protease exógena, utilizada neste trabalho, mostrou padrões adequados para seu uso na alimentação do pirarucu, apresentando atividade em pH, temperatura e tempo (Figura 1), compatíveis com a atividade proteolítica das enzimas do trato digestório dos peixes.

O perfil ácido da protease exógena (Figura 1) mostrou que possui um efeito complementar no processo digestivo na porção gástrica. Neste caso, a atuação da enzima exógena está diretamente ligada a permanência do alimento no estômago, atuando nos momentos finais quando a acidez é maior, por causa da maior concentração de suco gástrico.

O pirarucu, como os outros peixes, é um animal pecilotérmico (Schmidt-Nielsen, 1996), sendo assim a temperatura do ambiente influencia diretamente na atividade enzimática que ocorre no lúmen do trato digestivo. A atividade endógena para a protease ácida foi de $20,46 \pm 2,45$ UI/mg de proteína e para a protease alcalina de $74,21 \pm 4,52$ UI/mg de proteína, estes resultados mostram que embora exista a suplementação enzimática a secreção de enzimas endógenas ocorre normalmente. A temperatura média da água durante o experimento variou entre 26 e 27 °C (Tabela 1), indicando que este parâmetro não influenciou negativamente na atividade das proteases exógenas e dos tratos digestivos no momento da digestão (Figura 1).

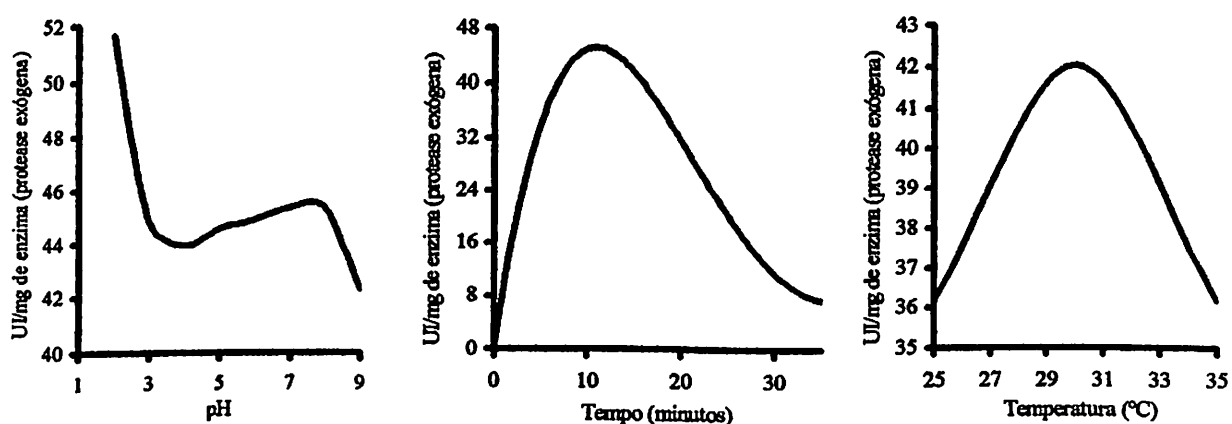


Figura 1. Atividade enzimática da protease ácida exógena em razão do tempo, temperatura e pH, utilizando caseína 1% como substrato, 100µL de protease (0,05 g/mL de água destilada).

Conclusão

A enzima digestiva exógena protease quando adicionada à ração, influencia no desempenho zootécnico de juvenis de pirarucu.

Agradecimentos



Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq e à Agencia Española de Cooperación Internacional/AECI - Projeto Pirarucu, pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

- Akiyama, D. 1988. Soybean meal utilization in fish feeds. American Soybean Association. Presented at the Korean Feed Association Conference, Seoul, Korea. Disponível em <http://www.asasea.com/technical/aquacult.html>
- Ayres, M.; Ayres, M. J. Ayres, D. L.; Santos, A. S. *Bio stat 2.0: Aplicações estatísticas nas áreas biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá/CNPq, 2000. 272p
- Bard, J.; Imbiriba, E. P. 1986. Piscicultura do pirarucu *Arapaima gigas*. EMBRAPA-CPATU. Belém/BR. Circular Técnica, 52. 17p.
- Boonyaratpalin, M.S.; P. Tunpibal, T. 1998. Replacement of fish meal with various types of soybean products in diets for the Asian seabass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 161 1-4:67-78.
- Brauner, C. J.; Val, A. L. 1996. The interaction between O₂ and CO₂ exchange in the obligate air breather, *Arapaima gigas*, and the facultative air breather, *Lipossarcus pardalis*. In: Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F.; Randall, D. J. Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 1996. cap. 9, p. 101-110.
- Burel, C.; Boujard, T.; Corraze, G.; Kaushik, S. J.; Boeuf, G.; S.; Mol, K. Van Der Geyten, A.; Kuhn, E. R. 1998. Incorporation of high levels of extruded lupin in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): nutritional value and effect on thyroid status. *Aquaculture*, 163, 325-345.

- Burel, C.; Boujard, T.; Kaushik, S. J.; Boeuf, G.; Van Der Geyten, S.; Mol, K. A.; Kuhn, E. R.; Quinsac, A.; Krouti, M.; Ribailier, D. 2000. Potential of plant-protein sources as fish meal substitutes in diets for turbot *Psetta maxima*: growth, nutrient utilization and thyroid status. *Aquaculture*, 188 3-4:363-382.
- Carter, C. G.; Houlihan, D. F.; Buchanan, B.; Mitchell, A. I. 1994. Growth and feed utilization efficiencies of seawater Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed a diet containing supplementary enzymes. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25 : 37-46.
- Cavero, B. A. S.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Ituassú, D. R.; Gandra, A. L.; Crescêncio, R. 2003. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu, em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 1, p. 103-107.
- Cheng, Z.J.; Hardy, R. W.; Usry, J. L. 2003. Effects of lysine supplementation in plant protein-based diets on the performance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and apparent digestibility coefficients of nutrients. *Aquaculture*, 215 1-4:255-265.
- Chow, K.W. & Halver, J.E. 1980. Chapter 5:Carbohydrates. *Fish feed formulation and production* - FAO. p.United Nations Development Programme Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO.Rome, 1980. Acessado em 22/01/2003. Endereço eletrônico: <<http://www.fao.gov/decrep>>.
- Crescêncio, R. 2001.*Treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, Arapaima gigas CUVIER, 1829, utilizando atrativos alimentares*. Dissertação de Mestrado,INPA/UA, Manaus, AM. 35p.
- Fowler, L. 1980 Substitution of soybean and cottonseed products for fish meal in diets fed to chinook and coho salmon. *The Progressive Fish-Culturist*, 42(2):87-90

- Gandra, A. L. 2002. *Estudo da frequência alimentar do pirarucu, Arapaima gigas CURVIER, 1829*. Dissertação de Mestrado, INPA/UA, Manaus, AM. 36 p.
- Halver, J. E. 1980. Proteins and Amino Acids. *in: Fish Feed Technology*. FAO. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/x5738e/x5738e04.htm>
- Hardy, R. W. 1999. Aquaculture's rapid growth requirements for alternate protein sources. *Feed Management*. 50, 25-28.
- Hidalgo, M. C.; Urea, E. & Sanz, A 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, (170) 267-283.
- Imbiriba, E.P. 2001. Potencial da criação de pirarucu *Arapaima gigas* em cativeiro. *Acta Amazonica*, (31) 2:299-316.
- Ituassú, D.R. 2002. Exigência protéica de juvenis de Pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829). *Dissertação de mestrado* – INPA/UA. Manaus – AM. 28 p.
- McGoogan, B.B. & Reigh, C.R. 1996. Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Aquaculture*, (141) 233-244.
- Mendes, P. P. *Estatística aplicada à aquicultura*. Recife: Bagaço. 1999. 265p.
- Ng, W.K., *et al.* 2002. Nutritive value of palme kernel meal pretreated with enzyme or fermented with *Trichoderma koningii* as an dietary ingredient for red hybrid tilapia *Oreochromis sp.* *Aquaculture Research*, (33) 1199-1207.
- Officer, D.I. 2000. Feed enzymes. In: D'Mello, J.P.F. (Ed). *Farm animal metabolism and nutrition*. The Scottish Agricultural College, Edinburgh, UK. p.405-426.
- Peres, H. & Oliva-Teles, A. 2002. Utilization of raw and gelatinized starch by european sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Aquaculture*, (205) 287-299.
- Regost, C.; Arzel, J.; Kaushik, S. J. 1999. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot *Psetta maxima*. *Aquaculture*, 180 (1-2):99-117.

- 
- Robaina, L.; Moyano, F. J.; Izquierdo, M. S.; Socorro, J.; Vergara, J. M.; Montero, D. 1997. Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream *Sparus aurata*: Nutritional and histological implications. *Aquaculture*, 157 (3-4):347-359.
- Saint-Paul, U. 1986. Potencial for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. *Aquaculture*, 54: 205-240.
- Schmidt-Nielsen, K., 1996. *Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente*. Cambridge University Press. Ed. Livraria Santos. Santos, SP. X + 600p
- Sheppy, C. 2001. The current feed enzyme market and likely trends. In: Bedford. M.; Partridge, G. (Eds). *Enzymes in farm animal nutrition*. Finnfeeds International, Marlborough, Wiltshire, UK. P. 1-10.
- Souza, R. H. de S.; Val, A. L. 1991. O gigante das águas doces. *Ciência Hoje*, 11: (64) 129-133.
- 

CAPÍTULO III


Efeito da inclusão de lipase exógena no desempenho zootécnico de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829)

Resumo - O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da adição da enzima digestiva exógena lipase na ração sobre o desempenho de juvenis de pirarucu. O trabalho foi realizado com três níveis de inclusão da enzima, além do controle: 0, 0,1; 0,2 e 0,4%, seguindo um delineamento inteiramente casualizado. O efeito dos tratamentos com inclusão de lipase exógena na ração apresentou diferença significativa no desempenho dos peixes ($p < 0,05$) com relação ao tratamento controle. A enzima digestiva exógena lipase, quando adicionada à ração, influencia no desempenho zootécnico de juvenis de pirarucu.

The effect of exogenous lipase inclusion on growth performance of pirarucu, *Arapaima gigas*, juveniles.


Abstract - The objective of this work was to verify the effect of the addition of exogenous digestive enzyme lipase in the feed on the performance of pirarucu juveniles. The work was carried with the inclusion of three levels of the enzyme, besides the control: 0,0; 0.1; 0.2 and 0.4%, in a complete randomized design. Treatments effect from the exogenous lipase inclusion in the feed presented significant difference ($p < 0.05$) in fish performance when compared to the control treatment. Exogenous lipase enzyme when added to the feed presented a positive growth performance in pirarucu juvenile.

Introdução



O pirarucu, *Arapaima gigas*, peixe de grande porte, natural da Bacia Amazônica, pertence à família Osteoglossidae (Nelson, 1994), é provavelmente a espécie mais promissora para o desenvolvimento da criação de peixes em regime intensivo na Região Amazônica. Esta espécie caracteriza-se por um hábito alimentar carnívoro motivo pelo qual sua exigência por proteína é elevada (Ituassú, 2002). Possui respiração aérea obrigatória (Brauner & Val, 1996), não apresenta canibalismo (Bard & Imbiriba, 1986) e é resistente ao manuseio. Essas condições facilitam seu confinamento em altas densidades (Cavero *et al.*, 2003).

O pirarucu em sistemas extensivos, pode chegar até 10 kg no primeiro ano de vida (Bard & Imbiriba, 1986). Experiências em sistema intensivo mostram índices de desempenho zootécnico bastante atrativos como conversão alimentar abaixo de 1,0 (Cavero *et al.*, 2003).



Lipídios são amplamente utilizados, como fonte de energia, na alimentação de peixes carnívoros (Martino *et al.*, 2002; Hebb *et al.*, 2003; Chayapechara *et al.*, 2003), devido ao seu valor altamente energético. Seu rendimento calórico é maior com relação a proteínas e carboidratos (Hepher, 1988). Ainda, a disponibilidade de energia não-protéica nos peixes pode produzir o efeito poupador deste nutriente como foi observado para a garoupa, *Epinephelus malabaricus* por Shiau & Lan (1996).

O pirarucu aceita rações formuladas quando treinado (Crescêncio, 2001) o que facilita a adoção de novas tecnologias e o teste de novos insumos através da alimentação. Provavelmente, com a ajuda da inclusão de enzimas digestivas exógenas esses resultados podem melhorar ainda mais. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da adição de lipase exógena na ração sobre o desempenho de juvenis de pirarucu.

Material e métodos

O trabalho foi realizado na Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) no período de 13 de janeiro a 18 de fevereiro de 2003.

Foi testada a adição de lipase exógena em três concentrações (0,1; 0,2 e 0,4%) com testemunha. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (incluindo o controle) e 4 repetições, totalizando 16 unidades experimentais.

A enzima exógena (lipase) utilizada neste trabalho foi obtida a partir do fungo *Aspergillus niger*. (Alltech do Brasil).

Foram realizados ensaios enzimáticos “*in vitro*” para os tratamentos digestivos de trinta e seis juvenis de pirarucu e para as enzimas digestivas exógenas. A atividade enzimática da lipase exógena e endógena foi medida segundo Gawlicka *et al.* (2000). O homogeneizado foi incubado em tampão bicarbonato de amônio 24 mM, pH 7,8, contendo 0,4 mM de substrato (p-nitrophenyl myristate, Sigma N2502) diluído em 0,5% de Triton X-100. O tempo de incubação foi de 30 minutos e a leitura da absorbância das amostras em 405 nm.

Para determinar a atividade da lipase exógena, a mesma foi diluída em água destilada na proporção de 1g de lipase:20ml de água. Da mistura foram utilizados 100µL para incubação.

A ração utilizada no experimento foi comercial específica para peixes carnívoros, com 45% de proteína bruta e 3.000 kcal de energia bruta/kg de ração, extrusada e triturada (Quadro 1).

Quadro 1. Composição centesimal da ração comercial para peixes carnívoros com 45% de proteína e 3000 kcal de energia bruta/kg, extrusada (Purina TC45, Agribands, Paulínia, SP, Brasil)*.

Umidade (%)	Dados a 100% de matéria seca				
	PB	EE	CH ₂ O	Cinzas	FB
8,9*	46,5*	10,5*	30,6*	10,0*	2,4*
13,0**	45,0**	14,5**	20,5**	14,0**	6,0**

* Análise bromatológica realizada no laboratório de Nutrição de Peixes da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura/CPAQ do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA.

** Valores fornecidos pelo fabricante da ração.

Legenda:

PB = Proteína bruta; EE = Extrato etéreo (gordura); CH₂O = Carboidrato; FB = Fibra

bruta

Os peixes foram inicialmente pesados e medidos e distribuídos homogeneamente em cada uma das unidades experimentais. Em cada unidade experimental foram estocados 10 juvenis de pirarucu, com $6,6 \pm 0,5$ g e $10,0 \pm 0,1$ cm de comprimento total, os quais foram alimentados até a saciedade aparente 5 vezes ao dia (08:00; 11:00; 14:00; 17:00 e 19:00h) durante um período de 37 dias.

As unidades experimentais foram formadas por tanques de plástico de 310 L (volume útil de 250 L) com vazão aproximada de 5 L/h.

A qualidade da água foi monitorada uma vez ao dia (17:00h) avaliando os seguintes parâmetros físico-químicos: amônia (mg/L), nitrito (mg/L), pH, temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg/L) e condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$).

Ao final do experimento os peixes foram pesados e medidos para verificar o efeito dos tratamentos sobre o desempenho dos mesmos. A partir dos resultados obtidos foram calculados os seguintes índices de desempenho zootécnico: Ganho de peso (GP) = peso final – peso inicial; Consumo médio de ração no final do experimento (CMFi) = Σ Consumo médio diário (por tanque experimental); Conversão alimentar aparente (CAA) = $\text{CMFi} / (\text{Peso médio final} - \text{Peso médio inicial})$; Taxa de crescimento específico (TCE) = $100 * (\text{Ln Peso médio Final} - \text{Ln Peso médio inicial}) / \text{tempo (dias)}$ e

sobrevivência (S) = 100*(n° de peixes no final do experimento/n° de peixes no início do experimento).

Para garantir a homogeneidade dos peixes ao início do experimento, estes foram pesados (g) e a seguir os dados foram analisados através de teste “F” a 5% de probabilidade (Ayres *et al.*,2000). Os dados da biometria final dos tratamentos foram submetidos á análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Mendes, 1999).

Resultados e discussão

As concentrações de amônia total (NH₃+NH₄) e nitrito (NO₂⁻), e as medidas de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade na água nos tanques experimentais, não apresentaram variações que pudessem indicar a influência destes parâmetros ambientais sobre o desempenho dos juvenis de pirarucu (Tabela 1). Estas variações estão de acordo com as sugeridas para a criação da espécie (Cavero *et al.*, 2003).

Tabela 1. Valores médios ± desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água, durante o período experimental de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* alimentados com ração+lipase.

Parâmetro observado	Controle	Lipase 0,1%	Lipase 0,2%	Lipase 0,4%
pH	5,0 ± 0,2 a	4,9 ± 0,1 a	5,1 ± 0,2 a	5,1 ± 0,3 a
Temperatura (°C)	26,7 ± 0,4 a	26,8 ± 0,1 a	26,8 ± 0,4 a	26,7 ± 0,3 a
Condutividade elétrica (µS/cm ²)	34,7 ± 6,3 a	40,5 ± 8,4 a	32,8 ± 1,1 a	44,8 ± 10,7 a
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,3 ± 0,3 a	4,9 ± 0,3 a	5,1 ± 0,1 a	5,2 ± 0,2 a
Amônia total (NH ₃ + NH ₄)	0,3 ± 0,05 a	0,3 ± 0,1 a	0,3 ± 0,08 a	0,3 ± 0,2 a
Nitrito (mg/L)	4.10 ⁻³ ± 10 ⁻³ a	4.10 ⁻³ ± 4.10 ⁻³ a	3. 10 ⁻³ ± 10 ⁻³ a	5. 10 ⁻³ ± 3.10 ⁻³ a

Diversos trabalhos foram realizados testando níveis de energia a partir de variações dos componentes lipídicos da ração, visando melhor aproveitamento da proteína. Shiau & Lan (1996) não encontraram mudança na taxa de crescimento da garoupa, *Epinephelus malabaricus*, ao diminuir o conteúdo de proteína na dieta e

aumentar com lipídeos o nível energético. Isto sugere que a proteína pode ter o seu uso otimizado quando os requerimentos calóricos são alcançados. Espinós *et al.* (2003) sugerem que as exigências protéicas dos peixes podem diminuir quando o aproveitamento de lipídios é maximizado.

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que a inclusão de lipase exógena na ração melhorou o desempenho zootécnico dos peixes. Este fato pode estar associado ao melhor aproveitamento dos lipídios presentes na dieta, devido à digestão pela lipase exógena. A atividade da lipase endógena foi de $21,15 \pm 2,04$ UI/mg de proteína, demonstrando que pode existir efeito agregado da atividade enzimática. Ainda, estes resultados mostram que embora exista a suplementação enzimática a secreção de enzimas endógenas ocorre normalmente.

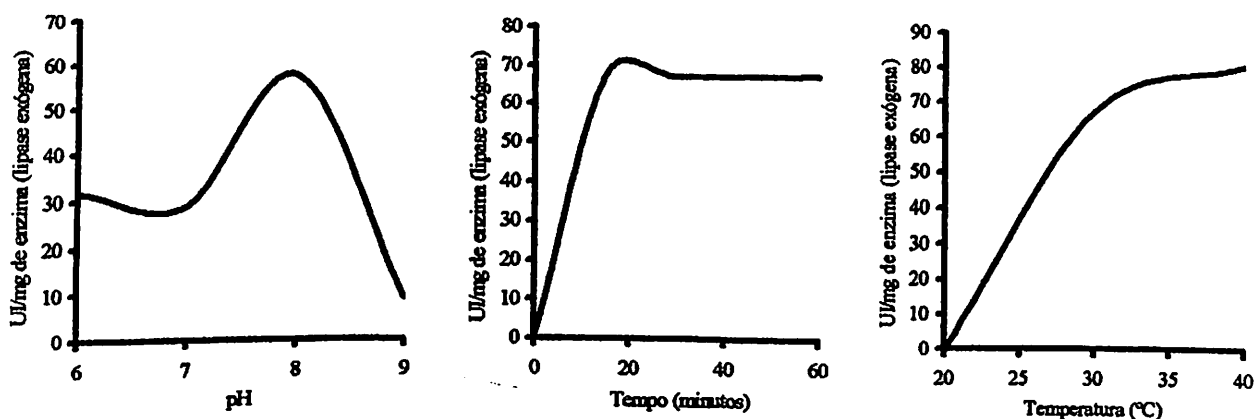


Figura 1. Atividade enzimática da lipase exógena em razão do tempo, temperatura e pH, utilizando como substrato p-nitrophenyl myristate, 100 μ L de amilase (0,05 g/mL de água destilada).

Os peixes são animais pecilotérmicos e regulam a sua temperatura pela temperatura da água (Schmidt-Nielsen, 1996), indicando que esse parâmetro ambiental pode influenciar na atividade enzimática digestiva dos peixes. A temperatura da água das unidades experimentais manteve-se em torno de 26,7 °C, não afetando na atividade das lipases exógena (Figura 1) e endógena.

A inclusão de lipase exógena nas rações potencializa a digestão dos lipídios, disponibilizando energia de natureza não-protéica e causando o efeito poupador da proteína para fins energéticos (Hepher, 1988). Esta tendência foi constatada neste trabalho, observando-se que a inclusão de lipase exógena na ração, na alimentação de juvenis de pirarucu, melhorou o desempenho zootécnico (Tabela 2).

Tabela 2. Médias do peso inicial, do peso final, do ganho de peso, da taxa de crescimento específico, da conversão alimentar aparente e da sobrevivência de juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*) mantidos em condições experimentais e alimentados com suplementação de lipase exógena durante 37 dias ⁽¹⁾.

Variáveis observadas	% de lipase de lipase exógena na ração			
	0,0	0,1	0,2	0,4
Peso Inicial	6,0 ± 0,4 a	6,4 ± 0,8 a	6,3 ± 1,0 a	6,6 ± 0,9 a
Peso Final	16,7 ± 2,1 b	26,6 ± 3,4 a	24,3 ± 5,3 a	26,5 ± 2,4a
Ganho de Peso	10,7 ± 2,0 b	20,4 ± 3,9 a	16,6 ± 5,1 a	19,8 ± 2,7 a
Taxa de Crescimento específico	2,7 ± 0,3 a	3,7 ± 0,5 a	3,4 ± 0,9 a	3,6 ± 0,4 a
Conversão Alimentar Aparente	1,8 ± 0,3 a	0,8 ± 0,3 b	0,9 ± 0,1 b	0,8 ± 0,1 b
Sobrevivência	82,5 ± 9,5 a	85,0 ± 12,9 a	62,5 ± 22,1 a	77,5 ± 9,5 a

(1) Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores das variáveis são apresentados como média ± desvio padrão.

Martino *et al* (2002) testaram diferentes níveis de inclusão de lipídios (0%, 4%, 8% e 12% na ração) na alimentação do surubim, *Pseudoplatystoma coruscans*. Nesse trabalho os autores verificaram que o desempenho zootécnico do peixe melhora com o incremento de lipídio na dieta. Indivíduos desta espécie também são capazes de metabolizar diversos tipos de lipídios de origem vegetal (óleos de milho, de soja e de semente de linhaça) e animal (banha de porco), sem prejudicar o desempenho (Martino *et al.*, 2002 a).

Incrementos proporcionais de proteína e de energia na dieta do “red drum” *Sciaenops ocellatus*, melhoraram o crescimento e eficiência alimentar desta espécie (McGoogan & Gatlin, 2000).

Conclusão

A adição de lipase exógena na ração influencia no desempenho de juvenis de pirarucu.


Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq e à Agencia Española de Cooperación Internacional/AECI - Projeto Pirarucu, pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

- Ayres, M.; Ayres, M. J.; Ayres, D. L. & Santos, A. S. 2000. *Bio Esta 2.0: Aplicações estatísticas nas áreas biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, XII, 272p.
- Bard, J.; Imbiriba, E. P. 1986. Piscicultura do pirarucu *Arapaima gigas*. EMBRAPA-CPATU. Belém/BR. Circular Técnica, 52. 17p.
- Brauner, C. J.; Val, A. L. 1996. The interaction between O₂ and CO₂ exchange in the obligate air breather, *Arapaima gigas*, and the facultative air breather, *Lipossarcus pardalis*. In: Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F.; Randall, D. J. Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 1996. cap. 9, p. 101-110.
- Cavero, B. A. S.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Ituassú, D. R.; Gandra, A. L.; Crescêncio, R. 2003. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu, em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 1, p. 103-107.
- Chayapechara, S.; Casten, M. T.; Ardí, R. W.; Dong, F. M. 2003. Fish performance, fillet characteristics, and health assesment index of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing adequate and high concentrations of lipid and vitamin E. *Aquaculture*, 219, 715-738.
- Crescêncio, R. 2001. *Treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, Arapaima gigas CUVIER, 1829, utilizando atrativos alimentares*. Dissertação de Mestrado, INPA/UA, Manaus, AM. 35p.
- Espinós, F. J.; Tomas, A.; Perez, L. M.; Balasch, S.; Jover, M. 2003. Growth of dentex fingerlings (*Dentex dentex*) fed diets containing dofferent levels of protein and lipid. *Aquaculture*, (218) 479-490.

- Gandra, A. L. 2002. *Estudo da frequência alimentar do pirarucu, Arapaima gigas CURVIER, 1829*. Dissertação de Mestrado, INPA/UA, Manaus, AM. 36 p.
- Gawlicka, A., Parent, B., Horn, H.M., Ross, N., Opstad, I., Torrissen, J. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. *Aquaculture*. (184) 303-314p.
- Hebb, C. D.; Castell, J. D.; Anderson, D. M.; Batt, J. 2003. Growth and feed conversion of juvenile winter flounder (*Pleuronectes americanus*) in relation to different protein-to-lipid levels in isocaloric diets. *Aquaculture*, 221, 439-449.
- Hepher, B. 1988. *Nutrition of pond fishes*. Cambridge University Press. New York, NY, USA. X + 388p.
- Imbiriba, E.P. 2001. Potencial da criação de pirarucu *Arapaima gigas* em cativeiro. *Acta Amazonica*, (31) 2:299-316.
- Ituassú, D.R. 2002. Exigência protéica de juvenis de Pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829). *Dissertação de mestrado* – INPA/UA. Manaus – AM. 28 p.
- Martino, R. C.; Cyrino, J. E. P.; Portz, L.; Trugo, L. C. 2002. Effect of dietary lipid level on nutritional performance of the surubim, *Pseudoplatystoma coruscans*. 2002. *Aquaculture*, 209, 209-218.
- Martino, R. C.; Cyrino, J. E. P.; Portz, L.; Trugo, L. C. 2002 a. Performance and fatty acids composition of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) fed diets with animal and plant lipids. *Aquaculture*, 209, 233-246.
- McGoogan, B.B. & Gatlin, D. M. 2000. Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenus ocellatus*. II Effects of energy level and nutrient density at various feeding rates. *Aquaculture*, 182, 271-285.
- Mendes, P. P. *Estatística aplicada à aquicultura*. Recife: Bagaço. 1999. 265p.



Nelson, J. S., 1994. *Fishes of the World*. 3^a ed. Ed. John Wiley & Sons. Inc. New York, N.Y. 600p.

Schmidt-Nielsen, K., 1996. *Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente*. Cambridge University Press. Ed. Livraria Santos. Santos, SP. X + 600p

Shiau, S.Y. & Lan, C.W. 1996. Optimum dietary protein level and protein to energy ratio for growth in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, (145) 256-266.

CAPÍTULO IV

Efeito da inclusão de amilase exógena no desempenho zootécnico de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829)

Resumo - O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da adição da enzima digestiva exógena amilase na ração sobre o desempenho de juvenis de pirarucu. O trabalho foi realizado com três níveis de inclusão da enzima, além do controle: 0, 0,1; 0,2 e 0,4%, seguindo um delineamento inteiramente casualizado. O efeito dos tratamentos com inclusão de amilase exógena na ração não apresentou diferença significativa no desempenho dos peixes ($p>0,05$) com relação ao tratamento controle. A enzima digestiva exógena amilase, quando adicionada à ração, não influencia no desempenho zootécnico de juvenis de pirarucu.

The effect of exogenous amylase inclusion on growth performance of pirarucu, *Arapaima gigas*, juveniles.

Abstract - The objective of this work was to verify the effect of the addition of exogenous digestive enzyme amylase in the feed on the performance of pirarucu juveniles. The work was carried with the inclusion of three levels of the enzyme, besides the control: 0,0; 0.1; 0.2 and 0.4%, in a complete randomized design. Treatments effect from the exogenous amylase inclusion in the feed did not present significant difference ($p>0.05$) in the fish performance when compared to the control treatment. The exogenous digestive enzyme amylase, when added to the feed, does not have a positive effect in the growth performance of pirarucu juvenile.

Introdução

A inclusão de enzimas exógenas na dieta de animais domésticos tem o objetivo de aumentar a digestibilidade dos ingredientes utilizados, entretanto não tem função nutricional. Sua efetividade tem sido demonstrada principalmente para cereais menos digeríveis em relação a alimentos de melhor digestibilidade (Bedford, 2000). Guenter (2002) afirmam que as principais metas da suplementação enzimática são a de destruir os fatores antinutricionais dos grãos, aumentar a digestibilidade total da ração e potencializar a ação das enzimas endógenas.

A inclusão de enzimas exógenas nas dietas animais reduz a síntese de enzimas exógenas, e com isso ocorre o aumento de aminoácidos disponíveis no organismo para a síntese protéica. Segundo Zanella *et al* (1999), em situações normais, cerca de 25% das necessidades diárias de nitrogênio podem ser destinadas à síntese de enzimas endógenas.

Com a finalidade de substituir a proteína animal, alguns ingredientes de origem vegetal como o farelo de soja, são amplamente utilizados na composição das dietas (Refstie *et al.*, 2001; Booth *et al.*, 2001), incorporando altos níveis de amido e tornando obrigatório o monitoramento da capacidade do fígado desses peixes de metabolizar e/ou armazenar carboidratos (Legate *et al.*, 2001).

Ao contrário dos peixes herbívoros e onívoros, que não apresentam problema para digerir o amido por secretarem amilase em todas as porções do intestino e no pâncreas, nos peixes carnívoros, a utilização de amido (absorvidos sob forma de monossacarídeos) como fonte de carboidratos é baixa devido à baixa secreção de amilase (Hepher, 1988; Baldisserotto, 2002).

A pré-gelatinização do amido através de um processo de cozimento aumenta a sua digestibilidade e seu aproveitamento por peixes carnívoros (Hepher, 1988; Kubitzka,

1998), mas ao mesmo tempo pode desnaturar as proteínas presentes no ingrediente, importantes para o crescimento do peixe.

O pirarucu, por se tratar de um peixe carnívoro, não foge a essa situação. Sendo assim o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da adição da enzima digestiva exógena amilase na ração sobre o desempenho de juvenis de pirarucu.

Material e métodos

O trabalho foi realizado na Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) no período de 13 de janeiro a 18 de fevereiro de 2003.

Foi testada a adição de amilase exógena em três concentrações (0,1; 0,2 e 0,4%) com testemunha. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (incluindo o controle) e 4 repetições, totalizando 16 unidades experimentais.

A enzima exógena (amilase) utilizada neste trabalho foi obtida a partir do fungo *Aspergillus oryzae*. A enzima foi doada pela indústria Alltech do Brasil.

Foram realizados ensaios enzimáticos “*in vitro*” para os tratamentos digestivos de trinta e seis juvenis de pirarucu e para as enzimas digestivas exógenas. A atividade amilohidrolítica foi estimada segundo o método proposto por Bernfeld (1955) modificado. A reação foi incubada em 1,0 mL de tampão citrato de sódio/fosfato de sódio mono-básico 0,2M pH 8,0 e 1 mL de solução de amido a 0,5% em tampão adicionando 100µL de homogeneizado celular. A mistura da reação foi incubada por 30 minutos a 30°C. Decorrido o tempo de reação, foi adicionado 250µL de sulfato de zinco a 5% e seguidamente 250µL de hidróxido de bário 0,3N. Sendo a mistura da reação

centrifugada a 12.000 g por 3 minutos. No sobrenadante foi estimada a concentração de glicose pelo método de Park-Johnson (1949).

Para determinar a atividade da amilase exógena, a mesma foi diluída em água destilada na proporção de 1g de amilase:20ml de água. Da mistura foram utilizados 100µL para incubação.

A ração utilizada no experimento foi comercial específica para peixes carnívoros, com 45% de proteína bruta e 3.000 kcal de energia bruta/kg de ração, extrusada e triturada (Quadro 1).

Quadro 1. Composição centesimal da ração comercial para peixes carnívoros com 45% de proteína e 3000 kcal de energia bruta/kg, extrusada (Purina TC45, Agribands, Paulínia, SP, Brasil)*.

Umidade (%)	Dados a 100% de matéria seca				
	PB	EE	CH ₂ O	Cinzas	FB
8,9*	46,5*	10,5*	30,6*	10,0*	2,4*
13,0**	45,0**	14,5**	20,5**	14,0**	6,0**

* Análise bromatológica realizada no laboratório de Nutrição de Peixes da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura/CPAQ do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA.

** Valores fornecidos pelo fabricante da ração.

Legenda:

PB = Proteína bruta; EE = Extrato etéreo (gordura); CH₂O = Carboidrato; FB = Fibra bruta.

Os peixes foram pesados e medidos inicialmente e distribuídos homogeneamente em cada uma das unidades experimentais. Em cada unidade experimental foram estocados 10 juvenis de pirarucu com $6,6 \pm 0,5$ g e $10,0 \pm 0,1$ cm de comprimento total, os quais foram alimentados até a saciedade aparente 5 vezes ao dia (08:00; 11:00; 14:00; 17:00 e 19:00h) durante um período de 37 dias.

As unidades experimentais foram formadas por tanques de plástico de 310 L (volume útil de 250 L) com vazão aproximada de 5 L/h.

A qualidade da água foi monitorada diariamente, uma vez ao dia (17:00h) avaliando os seguintes parâmetros físico-químicos: amônia (mg/L), nitrito (mg/L), pH, temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg/L) e condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$) da água.

Ao final do experimento os peixes foram pesados e medidos para verificar o efeito dos tratamentos sobre o desempenho dos peixes. A partir dos resultados obtidos foram calculados os seguintes índices de desempenho zootécnico: Ganho de peso (GP) = peso final – peso inicial; Consumo médio de ração no final do experimento (CMFi) = Σ Consumo médio diário (por tanque experimental); Conversão alimentar aparente (CAA) = CMFi / (Peso médio final – Peso médio inicial); Taxa de crescimento específico (TCE) = $100 * (\ln \text{Peso médio Final} - \ln \text{Peso médio inicial}) / \text{tempo (dias)}$ e sobrevivência (S) = $100 * (\text{n}^\circ \text{ de peixes no final do experimento} / \text{n}^\circ \text{ de peixes no início do experimento})$.

Para garantir a homogeneidade dos peixes ao início do experimento, estes foram pesados (g) e a seguir os dados foram analisados através de teste “F” a 5% de probabilidade (Ayres *et al.*, 2000). Os dados da biometria final dos tratamentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Mendes, 1999).

Resultados e discussão

As concentrações de amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4$) e nitrito (NO_2^-) e as medidas de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade na água nos tanques experimentais, não apresentaram variações que pudessem indicar a influência destes parâmetros ambientais sobre o desempenho dos juvenis de pirarucu (Tabela 1) e estão de acordo com as sugeridas para a criação da espécie (Cavero *et al.*, 2003). Ainda, esses resultados mostram que não interferiram na atividade enzimática das enzimas exógenas (Figura 1).

Tabela 1. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água, durante o período experimental de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* alimentados com ração+amilase ⁽¹⁾.

Parâmetro observado	Controle	Amilase 0,1%	Amilase 0,2%	Amilase 0,4%
pH	5,0 \pm 0,1 a	4,9 \pm 0,1 a	4,9 \pm 0,2 a	4,8 \pm 0,1 a
Temperatura (°C)	26,7 \pm 0,4 a	27,0 \pm 0,3 a	26,8 \pm 0,3 a	26,9 \pm 0,3 a
Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$)	34,7 \pm 5,7 a	44,7 \pm 18,4 a	45,9 \pm 15,5 a	31,9 \pm 4,2 a
Oxigênio dissolvido (mg/L)	5,3 \pm 0,2 a	5,0 \pm 0,3 a	4,9 \pm 0,6 a	5,0 \pm 0,2 a
Amônia total (NH ₃ + NH ₄)	0,2 \pm 0,06 a	0,3 \pm 0,1 a	0,4 \pm 0,1 a	0,3 \pm 0,05 a
Nitrito (mg/L)	4.10 ⁻³ \pm 10 ⁻³ a	4.10 ⁻³ \pm 2.10 ⁻³ a	5.10 ⁻³ \pm 3.10 ⁻³ a	4.10 ⁻³ \pm 2.10 ⁻³ a

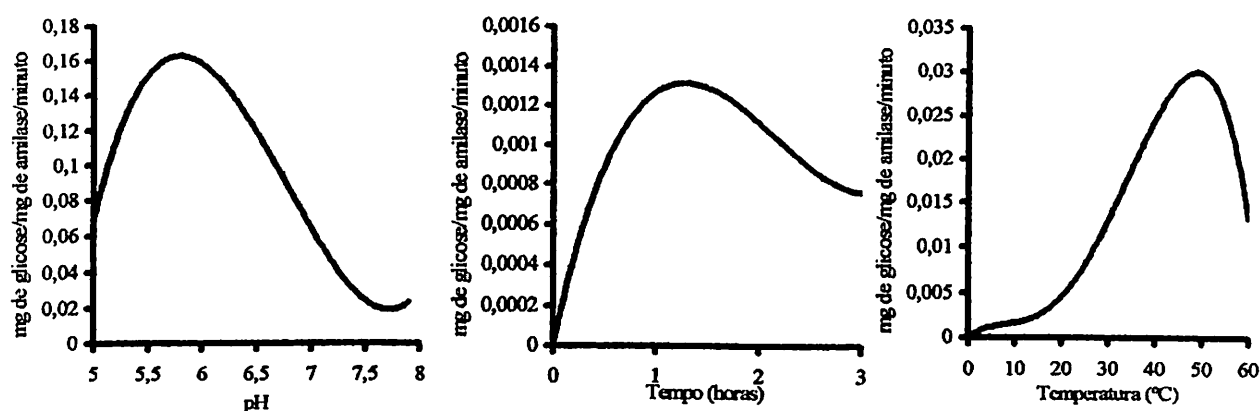


Figura 1. Atividade enzimática da amilase exógena em razão do tempo, temperatura e pH, utilizando amido 2% como substrato, 200 μL de amilase (0,05 g/mL de água destilada).

Dentre as várias razões relativas à inclusão de enzimas na dieta de animais domésticos, uma delas é aumentar a digestibilidade dos alimentos. Sua efetividade tem sido demonstrada principalmente para cereais menos digeríveis em relação a alimentos de melhor digestibilidade (Bedford, 2000).

A utilização de enzimas exógenas nas dietas de suínos e aves reduz a síntese de enzimas endógenas, disponibilizando mais aminoácidos para a síntese protéica (Yin *et al.*, 2001). Em situações normais, cerca de 25% das necessidades diárias de proteína são destinadas para síntese de enzimas endógenas em aves. As rações, à base de milho, suplementadas com amilase reduziram a síntese desta enzima em 23,4% em frangos de

corde (Zanella *et al.*, 1999). Contudo estudos em peixes ainda não evidenciaram essa relação.

A utilização de amido pelos animais como fonte de carboidratos depende diretamente da sua capacidade de sintetizar amilase, enzima responsável pela digestão do amido, uma vez que os carboidratos são absorvidos sob forma de monossacarídeos (Baldisserotto, 2002).

Chow & Halver (1980) verificaram que a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, espécie carnívora, pode utilizar acima de 60% da glicose, sacarose ou lactose fornecida na dieta, desde que a proporção de amido fornecido no alimento não ultrapasse 20%, quando a digestão deste nutriente decresce progressivamente. Podoskina *et al.* (1997) concluíram que a utilização de amido pela truta arco-íris é limitada apenas pela sua baixa digestibilidade. Peres & Oliva-Teles (2002) observaram no “sea bass”, *Dicentrarchus labrax*, peixe carnívoro, que o desempenho dos animais foi reduzida a partir de níveis superiores a 25% de amido solubilizado.

Chakrabarti *et al.* (1995) questionam a dependência da atividade da amilase em relação à dieta fornecida atribuindo a habilidade de digestão de nutrientes ao hábito alimentar da espécie.

Segundo Hidalgo *et al.* (1999), a atividade da amilase é baixa em espécies carnívoras como a enguia, *Anguilla anguilla*, truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, e “seabream”, *Spaurus aurata*. Os resultados desse estudo postulam que a atividade desta enzima depende diretamente da dieta natural do peixe e a habilidade deste de metabolizar carboidratos.

Apesar da glicose não aparentar ser a principal fonte de energia para peixes carnívoros em relação a proteínas e gorduras, esta prevalece como a forma de carboidratos mais metabolizada nas células. Sua molécula proporciona a liberação de

energia necessária à manutenção das funções básicas do organismo dos peixes (Walton & Cowey, 1982).

A digestibilidade dos carboidratos é diretamente proporcional ao conteúdo de amido solubilizado na dieta, uma vez que nesse estado adsorve moléculas de amilase. Provavelmente, esta seja uma das principais razões da maior digestibilidade de amido solubilizado (Spannhof & Plantikow, 1982).

Para Corrêa *et al.* (1998) a atividade de amilase varia de acordo com a quantidade de amido solúvel na dieta, otimizando a síntese de amilase. Estes autores observaram que no Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, e no Tambacu, *Colossoma macropomum* x *P. mesopotamicus*, os níveis de glicose e glicogênio muscular respondem diretamente aos níveis intestinais de amilase. Entretanto, os resultados encontrados neste trabalho para a inclusão de amilase exógena na ração para alimentação de juvenis de pirarucu, não apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento controle ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Médias do peso inicial, do peso final, do ganho de peso, da taxa de crescimento específico, da conversão alimentar aparente e da sobrevivência de juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*) mantidos em condições experimentais e alimentados com suplementação de amilase exógena durante 37 dias ⁽¹⁾.

Variáveis observadas	% de inclusão de amilase na ração			
	0,0	0,1	0,2	0,4
Peso Inicial	5,9 ± 0,4 a	6,8 ± 0,5 a	6,9 ± 0,4 a	6,5 ± 0,6 a
Peso Final	16,7 ± 2,1 a	21,5 ± 5,0 a	24,8 ± 3,7 a	22,3 ± 2,1 a
Ganho de Peso	10,7 ± 2,0 a	14,7 ± 5,2 a	17,9 ± 4,0 a	15,8 ± 1,9 a
Taxa de Crescimento específico	2,9 ± 0,3 a	3,0 ± 0,7 a	3,3 ± 0,5 a	3,2 ± 0,2 a
Conversão Alimentar Aparente	1,8 ± 0,3 a	1,4 ± 0,5 ab	1,1 ± 0,2 b	1,2 ± 0,1 b
Sobrevivência	82,5 ± 9,6 a	95,0 ± 5,8 a	82,5 ± 9,6 a	77,5 ± 17,0 a

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores das variáveis são apresentados como média ± desvio padrão.

Os resultados mostram que o pirarucu possui baixa atividade enzimática amilolítica ($0,00845 \pm 0,00047$ UI/mg de proteína). Esta tendência pode estar associada ao hábito alimentar carnívoro do pirarucu, uma vez que a secreção de amilase em peixes

carnívoros é baixa (Chakrabarti *et al.*, 1995). McGoogan & Reigh (1996) num estudo com “red drum”, *Sciaenops ocellatus*, peixe carnívoro, concluíram que esta espécie utiliza maior quantidade de energia contida nos lipídeos e proteínas se comparado com os carboidratos.

Dabrowski *et al.* (1992) verificaram que no Artic Charr (*Salvelinus alpinus* L.) o incremento da atividade da amilase é proporcional ao desenvolvimento ontogenético de suas estruturas digestivas. Entretanto, os autores afirmaram que a utilização de dietas específicas pode estimular a resposta pancreática ainda na primeira alimentação. Neste trabalho a atividade enzimática para a amilase endógena em juvenis de pirarucu foi muito baixa ($0,00845 \pm 0,00047$ UI/mg de proteína) confirmando que a atividade enzimática no trato digestivo dos peixes, depende dos seus hábitos alimentares (Sabapathy & Teo, 1993).

Dabrowski *et al.* (1992) verificaram que o decréscimo da atividade da amilase no Artic Charr quando o alimento foi à base de farelo de soja está diretamente correlacionado com fatores inibidores contidos nos substratos vegetais para a atividade da tripsina. Ainda verificaram que a resposta enzimática da amilase e da tripsina é estritamente correlacionada. A inibição da tripsina leva a inibição da amilase. Neste trabalho o desempenho dos peixes não foi influenciado pela suplementação com amilase exógena na ração, entretanto não é possível afirmar que este fato esteja relacionado a fatores antinutricionais contidos no farelo de soja na ração e sim ao aproveitamento de lipídios e proteínas como fonte energética que ocorre usualmente em peixes carnívoros.

Conclusão

A adição de amilase exógena na ração não influencia no desempenho de juvenis de pirarucu.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq e à Agência Española de Cooperación Internacional/AECI - Projeto Pirarucu, pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

- Ayres, M.; Ayres, M. J.; Ayres, D. L. & Santos, A. S. 2000. *Bio Esta 2.0: Aplicações estatísticas nas áreas biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, XII, 272p.
- Bernfeld, P. 1955. Amylases a e b: colorimetric assay methods In: *Methods in Enzymology*. Ed. Colowich, S.P. & Kaplan, N.º., Vol. 1. New York: Academic Press Inc.
- Baldisserotto, B. 2002. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Editora ufms. 92p.
- Bedford, M.R. 2000. Exogenous enzymes in monogastric nutrition - their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology*, (86) 1-2:1-13.
- Booth, M. A.; Allan, G. Frances, J.; Parkinson, S. 2001. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*. IV Effects of dehulling and protein concentration on digestibility of grain legumes. *Aquaculture*, (196) 67-85.
- Cavero, B. A. S.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R; Ituassú, D. R.; Gandra, A. L.; Crescêncio, R. 2003. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu, em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 1, p. 103-107.
- Chakrabarti, M.A.G.; Chaki, K. K.; Sur, R.& Misra, K. K. 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, (112) 167-177.
- Chow, K.W. & Halver, J.E. 1980. Chapter 5:Carbohydrates. *Fish feed formulation and production* - FAO. p.United Nations Development Programme Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO.Rome, 1980. Acessado em 22/01/2003. Endereço eletrônico: <<http://www.fao.gov/decrep>>.

- Corrêa, C.F.; Bidinotto P. M. & Moraes, G. 1998. Comparison of the amilohydrolytic activity in the gut of the neotropical teleost species pacu *Piaractus mesopotamicus* and tambacu hybrid *Colossoma macropomum* tambaqui x *P. mesopotamicus* pacu, submitted to different contents of soluble carbohydrate. *Proceedings of fish feeding ecology and digestion.*, (Gut shop'98.) 87-97.
- Dabrowski, K.; Krumschnabel, G.; Paukku, M.; Labanowski, J. 1992. Cyclic growth and activity of pancreatic enzymes in alevins of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Journal of Fish Biology*, (40) 511-521.
- Guenter, W. 2002. Practical experience with the use of enzymes. <http://www.idrc.ca/books/focus/821/chp6.html>
- Hepher, B. 1988. *Nutrition of pond fishes*. Cambridge University Press. New York, NY, USA. X + 388p.
- Hidalgo, M. C.; Urea, E. & Sanz, A 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, (170) 267-283.
- Kubitza, F., 1998. *Nutrição e Alimentação dos Peixes Cultivados*. Campo Grande. MS.
- Legate, N. J., Bonen, A. & Moon, T. W. 2001. Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla rostrata*), and black bullhead catfish (*Ameiurus melas*). *General and Comparative Endocrinology* 122, 48-59.
- McGoogan, B.B. & Reigh, C.R. 1996. Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Aquaculture*, (141) 233-244.
- Mendes, P. P. *Estatística aplicada à aquicultura*. Recife: Bagaço. 1999. 265p.

- Park, J. T. & Johnson, M. J. 1949. A submicro determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 181: 149-151
- Peres, H. & Oliva-Teles, A. 2002. Utilization of raw and gelatinized starch by european sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Aquaculture*, (205) 287-299.
- Podoskina, T.A.; Podoskin, T. A. & Bekina, E. N. 1997. Efficiency of utilization of some potato starch modifications by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, (152) 235-248.
- Refstie, S.; Storebakken, T.; Baeverfjord, G.; Roem, A. J. 2001. Long-term protein and lipid growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with partial replacement of fish meal by soy protein products at medium or high lipid level. *Aquaculture*, (193) 01-106.
- Sabapathy, U. & Teo, H. 1993. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siiganus canaliculatus*, and the sea bass, *Lates calcarifer*. *Journal of Fish Biology*. 42 (4): 595-602.
- Spannhof, L. & Plantikow, H. 1982. Studies on Carbohydrate digestion in rainbow trout. *Aquaculture*, (30) 95 - 108.
- Walton, M.J. & Cowey, C.B. 1982. Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, (73) 59-79.
- Yin, Y. L.; Baidoo, S. K.; Jin, L. Z.; Liu, Y. G.; Schulse, H. & Siemmins, T. H. 2001. The effect of different carbohydrase and protease supplementation on apparent (ileal and overall) digestibility of nutrients of five hulless barley varieties in young pigs. *Livestock Production Science*, (71) 2-3:109-120.
- Zanella, I; Sokomura, J. A. & Pizauro, K. Z. 1999. Efeito da adição de enzimas exógenas na dieta sobre a atividade enzimática da amilase e tripsina pancreática em

frangos de corte. *Conferência Apinco 99 de ciência e tecnologia avícola*. São Paulo.

45 - 52p.

CAPÍTULO V

Efeito da inclusão de protease e lipase exógenas, e sua interação, na alimentação de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*.

Resumo - O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito isolado das enzimas exógenas (protease e lipase) e sua interação sobre o desempenho de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*. Este experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial de 2x2. O efeito dos tratamentos com inclusão de enzimas exógenas no desempenho dos peixes foi significativo com relação ao tratamento controle ($p < 0,05$), entretanto a interação dos tratamentos não apresentou nenhuma vantagem sobre os tratamentos com inclusão de lipase e protease isoladamente. As enzimas digestivas exógenas (lipase e protease), quando adicionadas à ração, possuem efeito positivo no desempenho zootécnico de juvenis de pirarucu.

Effect of exogenous inclusion of protease and lipase, and its interaction, in the feeding of pirarucu juvenile.

Abstract – This work objective was to verify the isolated effect of exogenous enzymes (protease and lipase) and their interaction on growth performance of pirarucu, *Arapaima gigas*, juveniles. This experiment was lead in a complete randomized design in factorial design of 2x2. Treatments effect of exogenous enzyme inclusion in the fish growth performance was significant ($p < 0.05$) when compared to the control treatment, however treatments interaction did not present any advantage when using the treatments separately with lipase or protease. The exogenous digestive enzymes (lipase and protease), when added to the feed presented a positive growth performance in pirarucu juvenile.

Introdução

Complexos enzimáticos exógenos são largamente utilizados na alimentação animal, principalmente na suíno e na avicultura (Nery *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2000). Entretanto, na piscicultura existe ainda uma grande resistência na adoção desta tecnologia. As enzimas exógenas potencializam a digestão de nutrientes (Cardenete *et al.*, 1993), permitindo a incorporação de ingredientes antes sub-aproveitados.

Atualmente, ensaios “*in vitro*” são realizados com a finalidade de verificar o potencial digestivo das enzimas dos animais sobre os ingredientes utilizados na elaboração das rações (Moyano & Savoie, 2001). Outra tendência atual se refere à inclusão de enzimas exógenas na dieta de animais domésticos e tem o objetivo de aumentar a digestibilidade dos ingredientes utilizados. Sua efetividade tem sido demonstrada principalmente para cereais menos digeríveis em relação a alimentos de melhor digestibilidade (Bedford, 2000).

Experiências realizadas por Barroso *et al* (2002) na alimentação do robalo, *Centropomus parallelus*, substituindo a farinha de peixe por farelo de soja em 20% resultaram em ganho de peso superior a ração basal contendo 65% de farinha de peixe. Entretanto, o farelo de soja possui alguns fatores antinutricionais (Moyano Lopez *et al.*, 1999), abrindo precedentes para a reavaliação do potencial nutricional dos ingredientes utilizados na alimentação animal.

O desenvolvimento de rações balanceadas que atendam às exigências nutricionais dos peixes carnívoros (Kubitza, 1995), dentre eles o pirarucu, e que estejam adaptadas aos órgãos digestivos dessas espécies (Kolkovski, 2001) são requisitos muito importantes para o sucesso da criação intensiva desses peixes (Mendoza, 1996).

As restrições para a criação intensiva do pirarucu estavam relacionadas principalmente ao seu habito alimentar, fato que dificultaria a aceitação de alimento

artificial. Esse entrave foi superado uma vez que o pirarucu aceita rações balanceadas (Honczaryk & Maeda, 1998) quando treinado (Cavero *et al.*, 2003) e o uso de atrativos alimentares (Crescêncio, 2001) contribuem para o sucesso desse processo de adaptação. Esta nova situação facilita a adoção de novas tecnologias e o teste de novos insumos por meio da alimentação.

A aplicação de enzimas digestivas exógenas pode permitir a reavaliação do uso de fontes alimentares alternativas, que já foram testadas porém não apresentaram resultados satisfatórios, no desempenho e na sobrevivência de peixes carnívoros.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de lipase e protease exógena e sua interação na ração sobre o desempenho de juvenis de pirarucu.

Materiais e métodos

O trabalho foi realizado na Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) no período de 27 de fevereiro a 26 de março de 2003.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial 2x2 com testemunha no qual foi estudado o efeito da adição das enzimas digestivas (protease e lipase) cada uma delas com dois níveis, ausência e presença (adição de 0,1% na ração). Cada tratamento teve cinco repetições, totalizando 20 unidades experimentais, formadas por tanques de plástico de 310 L (volume útil de 250 L) com vazão aproximada de 5 L/h.

Em cada unidade experimental foram estocados 10 juvenis de pirarucu com peso médio inicial de $23,5 \pm 1,4$ g e $15,2 \pm 1,0$ cm de comprimento total. Para verificar a homogeneidade das amostras os dados da biometria inicial foram analisados pelo teste "F" a 5% de significância (Mendes, 1999).

Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente 5 vezes ao dia (08:00; 11:00; 14:00; 17:00 e 19:00h) durante um período de 28 dias. A ração utilizada no experimento foi comercial específica para peixes carnívoros, com 45% de proteína bruta e 3.000 kcal de energia bruta/kg de ração, extrusada e triturada (Quadro 1).

Quadro 1. Composição centesimal da ração comercial para peixes carnívoros com 45% de proteína e 3000 kcal de energia bruta/kg, extrusada (Purina TC45, Agribbrands, Paulínia, SP, Brasil)*.

Umidade (%)	Dados a 100% de matéria seca				
	PB	EE	CH ₂ O	Cinzas	FB
8,9*	46,5*	10,5*	30,6*	10,0*	2,4*
13,0**	45,0**	14,5**	20,5**	14,0**	6,0**

* Análise bromatológica realizada no laboratório de Nutrição de Peixes da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura/CPAQ do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA.

** Valores fornecidos pelo fabricante da ração.

Legenda:

PB = Proteína bruta; EE = Extrato etéreo (gordura); CH₂O = Carboidrato; FB = Fibra bruta

A ração foi triturada para facilitar a inclusão das enzimas exógenas. A inclusão foi realizada nas seguintes proporções: Controle (tratamento 1), 0,1% de lipase (Tratamento 2), 0,1% de protease (tratamento 3) e 0,1% de lipase + 0,1% de protease (tratamento 4).

A qualidade da água foi monitorada, uma vez ao dia (17:00h) avaliando os seguintes parâmetros físico-químicos: amônia (mg/L), nitrito (mg/L), pH, temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg/L) e condutividade (µS/cm).

Ao final do experimento os peixes foram pesados e medidos para verificar o efeito dos tratamentos sobre o desempenho dos mesmos. A partir dos resultados obtidos foram calculados os seguintes índices de desempenho zootécnico: Ganho de peso (GP) = peso final – peso inicial; Consumo médio de ração no final do experimento (CMFi) = Σ Consumo médio diário (por tanque experimental); Conversão alimentar aparente (CAA) = CMFi / (Peso médio final – Peso médio inicial); Taxa de crescimento específico (TCE) = $100 * (\ln \text{Peso médio Final} - \ln \text{Peso médio inicial}) / \text{tempo (dias)}$ e

sobrevivência (S) = 100*(nº de peixes no final do experimento/nº de peixes no início do experimento).

Os dados da biometria final dos tratamentos foram submetidos á análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Mendes, 1999).

Resultados e discussão

As concentrações de amônia total (NH₃+NH₄) e nitrito (NO₂⁻), e as medidas de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade na água dos tanques experimentais, não apresentaram variações que pudessem indicar a influência destes parâmetros ambientais sobre o desempenho dos juvenis de pirarucu (Tabela 1) e estão de acordo com as sugeridas por Cavero *et al.* (2003) para a criação da espécie.

Tabela 1. Valores médios ± desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água, durante o período experimental na criação de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* mantidos em condições experimentais e alimentados com suplementação de lipase e protease exógena durante 28 dias⁽¹⁾. L+P = Lipase + Protease.

Parâmetro observado	Controle	Lipase (0,1%)	(Protease 0,1%)	L+P
pH	5,2 ± 0,2 a	5,1 ± 0,1 ^a	5,1 ± 0,1 a	5,2 ± 0,1 a
Temperatura (°C)	26,6 ± 0,1 a	26,8 ± 0,1 a	26,7 ± 0,1 a	26,6 ± 0,1 a
Condutividade elétrica (µS/cm ²)	78,9 ± 21,8 a	86,4 ± 22,6 a	82,5 ± 23,9 a	74,7 ± 25,7 a
Oxigênio dissolvido (mg/L)	3,4 ± 0,7 a	3,7 ± 0,3 a	3,6 ± 0,1 a	3,1 ± 0,4 a
Amônia total (NH ₃ + NH ₄)	0,17 ± 0,06 a	0,18 ± 0,08 a	0,17 ± 0,07 a	0,23 ± 0,06 a
Nitrito (mg/L)	2.10 ⁻³ ± 9.10 ⁻⁵ a	3.10 ⁻³ ± 1.10 ⁻⁵ a	3.10 ⁻³ ± 2.10 ⁻⁵ a	4.10 ⁻³ ± 2.10 ⁻⁵ a

Os valores encontrados para o oxigênio dissolvido na água dos tanques foram relativamente baixos, se comparados à influência que este parâmetro pode oferecer a peixes de respiração branquial obrigatória (Vinatea, 1997). No caso do pirarucu esta influência é minimizada devido a sua respiração aérea obrigatória, que lhe permite tolerar águas com baixa disponibilidade de oxigênio (Brauner & Val, 1996).

Os resultados encontrados nesta fase do experimento, para os parâmetros de desempenho, mostram a mesma tendência que os experimentos da primeira fase

(Capítulo III e IV). Portanto, as interações da inclusão de lipase e protease exógenas não apresentaram efeito superior no desempenho de juvenis de pirarucu quando comparadas com a inclusão dessas enzimas isoladamente (Tabela 2).

Tabela 2. Médias do peso inicial, do peso final, do ganho de peso, da taxa de crescimento específico, da conversão alimentar aparente e da sobrevivência de juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*) mantidos em condições experimentais e alimentados com suplementação de lipase e protease exógena durante 28 dias ⁽¹⁾. L+P = Lipase + Protease.

Variáveis observadas	% de inclusão de protease na ração			
	Controle	Lipase (0,1%)	Protease (0,1%)	L+P
Peso Inicial	22,8 ± 1,4 a	24,1 ± 1,5 a	23,1 ± 1,7 a	24,4 ± 1,0 a
Peso Final	34,3 ± 4,6 b	44,7 ± 7,2 a	43,8 ± 6,3 a	44,3 ± 3,5 a
Ganho de Peso	11,5 ± 3,8 b	20,7 ± 4,9 a	19,6 ± 4,9 a	19,9 ± 4,4 a
Taxa de Crescimento específico	1,4 ± 0,3 b	2,2 ± 0,3 a	2,1 ± 0,3 a	2,1 ± 0,3 a
Conversão Alimentar Aparente	2,8 ± 0,5 a	1,9 ± 0,4 a	2,0 ± 0,5 a	2,0 ± 0,4 a
Sobrevivência	70,0 ± 17,3 a	76,6 ± 15,3 a	76,6 ± 5,7 a	70,0 ± 10,0 a

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os valores das variáveis são apresentados como média ± desvio padrão.

Giri *et al.* (2000) verificaram que a adição de vísceras de frango e de peixes na dieta de *Clarias batrachus* pode ser uma alternativa para a substituição de farinha de peixe, uma vez que possuem boa digestibilidade e estimulam a atividade enzimática de amilase e protease endógena. Entretanto, a secagem da ração, no referido trabalho, foi realizada a 55°C e pode não ter inativado as enzimas presentes nas vísceras de frango e de peixe, funcionando como um complexo enzimático digestivo, aumentando a digestibilidade da ração.

Yin *et al.* (2001) testaram o efeito de um complexo enzimático formado por carboidrases e proteases na alimentação de suínos e verificaram que melhora a digestibilidade da matéria seca, energia bruta e proteína bruta. Entretanto a atividade proteolítica é diminuída quando são realizadas combinações com carboidratos não-amiláceos, como as variedades de cevada sem casca *Silki*, *Phoenix* e *Falcon* que possuem baixa digestibilidade.

Neste trabalho foi verificado que a interação das enzimas digestivas exógenas protease e lipase melhoram o desempenho de juvenis de pirarucu, mas não apresentam vantagem com relação a sua atuação isolada.

Conclusão

As enzimas digestivas exógenas lipase e protease, e sua interação, quando adicionadas à ração, influenciam no desempenho zootécnico de juvenis de pirarucu.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq e à Agencia Española de Cooperación Internacional/AECI - Projeto Pirarucu, pelo suporte financeiro.

Referências bibliográficas

- Barroso, M. V.; Castro, J. C.; Aoki, P. C. M. & Helmer, J. L. Valor nutritivo de alguns ingredientes para o robalo (*Centropomus parallelus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, n. 6, p. 2157-2164.
- Bedford, M.R. 2000. Exogenous enzymes in monogastric nutrition - their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology*, (86) 1-2:1-13.
- Brauner, C. J.; Val, A. L. 1996. The interaction between O₂ and CO₂ exchange in the obligate air breather, *Arapaima gigas*, and the facultative air breather, *Lipossarcus pardalis*. In: Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F.; Randall, D. J. Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 1996. cap. 9, p. 101-110.
- Cardenete, G.; Morales, S. E.; Moyano, F. J.; Sanz, A. & Higuera, M., 1993. Adición de enzimas exogenas como médio de mejora de la utilización digestiva de las materias primas en dietas para trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*). Abstracts: From discovery to commercialization – *World Aquaculture* 93. 19: 211.
- Cavero, B. A. S.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Ituassú, D. R.; Gandra, A. L.; Crescêncio, R. 2003. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu, em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 1, p. 103-107.
- Crescêncio, R. *Treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, Arapaima gigas (Cuvier, 1829), utilizando atrativos alimentares*. 2001. 35f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, AM, 2001.

- Freitas, E. R., Fuentes, M. de F. F. & Espíndola, G. B. 2000. Efeito da suplementação enzimática em rações à base de milho/farelo de soja sobre o desempenho de poedeiras comerciais. *Rev. Bras. Zootec.* vol.29, no.4, p.1103-1109.
- Giri, S. S.; Sahoo, S. K.; Sahu, A. K.; Mukhopadhyay, P. K. 2000. Nutrient digestibility and intestinal enzyme activity of *Clarias batrachus* (Linn.) juveniles fed on dried fish and chicken viscera incorporated diets. *Bioresource Technology*, (71) 97-101.
- Honzaryck, A. & Maeda, L. S., 1998. Crescimento do pirarucu *Arapaima gigas*, utilizando dieta a base de ensilado biológico de pescado. In: *Anais do I Congresso Sul-Americano de Aqüicultura*. Recife, PE. Brasil. pag. 93-100.
- Mendes, P. P. *Estatística aplicada à aqüicultura*. Recife: Bagaço. 1999. 265p.
- Mendoza, R. A. 1996. Utilización de métodos inmunológicos en el estudio de la nutrición de los organismos acuáticos, In: Mendoza, Cruz-Suárez y Ricque (Eds.) simposium Internacional de Nutrición Acuicola, 2, 1994, Monterrey. Memórias.. Monterrey: 1996, p. 129-156.
- Moyano, F. J. & Savoie, L. 2001. Comparison of in vitro systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 128: 359-368.
- Moyano-López, F. J.; Martínez-Díaz, I.; Díaz-López, M. & Alarcón-López, F. J. 1999. Inhibition of digestive proteases by vegetable meals in three fish species; seabram (*Spaurus aurata*), tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 122: 327-332.
- Nery, V. L. H.; Lima, J. A. F.; Melo, R. C. A. & Fialho, E. T. 2000. Adição de enzimas exógenas para leitões dos 10 aos 30 Kg de peso. *Revista Brasileira de Zootecnia*, (29) 3:794-802.

Vinatea, L. A. 1997. *Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões*. Florianópolis: UFSC, 166p.

Yin, Y. L.; Baidoo, S. K.; Jin, L. Z.; Liu, Y. G.; Schulse, H. & Siemmins, T. H. 2001.

The effect of different carbohydrase and protease supplementation on apparent (ileal and overall) digestibility of nutrients of five hulless barley varieties in young pigs.

Livestock Production Science. (71) 2-3:109-120.

Considerações Finais

Provavelmente com a ajuda de enzimas exógenas incluídas nas rações de peixes carnívoros (principalmente lipases e proteases) seja possível a diminuição das exigências por proteína e energia que este tipo de animais demandam, uma vez que as proteínas e as gorduras de origem vegetal podem ter a sua digestão otimizada melhorando o desempenho zootécnico e contribuindo com a diminuição de excretas nitrogenadas, minimizando a influência desses nutrientes sobre a qualidade da água dos criatórios.

Recomendações

De acordo com os resultados deste trabalho recomenda-se o treinamento alimentar com alimento vivo como dieta inicial e a adição de lipase ou protease exógena, a 0,1% na ração, para a criação intensiva de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*.