

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

BIBLIOTECA DO INPA

**Substituição de Farinha de Peixe por Proteína de
Origem Vegetal com Adição de Protease Exógena na
Digestibilidade de Ração para Juvenis de Pirarucu
(*Arapaima gigas*).**

Flávio Augusto Leão da Fonseca

Dissertação 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 Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

MANAUS-AM

2004

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

**Substituição de Farinha de Peixe por Proteína de
Origem Vegetal com Adição de Protease Exógena na
Digestibilidade de Ração para Juvenis de Pirarucu
(*Arapaima gigas*).**

Flávio Augusto Leão da Fonseca

Orientador: Dr. Manoel Pereira Filho

Co-Orientador: Dr. Rodrigo Roubach

Dissertação 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 Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Financiamento:

PPI 2-3700. Manejo Alimentar e Nutrição do Pirarucu *Arapaima gigas*.

FAPEAM – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

MANAUS-AM

2004

T
597 5043
16%

FONSECA, FLÁVIO AUGUSTO LEÃO DA

Substituição de Farinha de Peixe por Proteína de Origem Vegetal com Adição de Protease Exógena na Digestibilidade de Ração para Juvenis de Pirarucu (*Arapaima gigas*)./ Flávio Augusto Leão da Fonseca.- Manaus: INPA/UFAM, 2004. 47p.: il

Dissertação (mestrado) – INPA/ UFAM, Manaus, 2004.

Orientador: Pereira Filho, Manoel

Área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Palavras-chave: Piscicultura 2. Pirarucu 3. Digestibilidade 4. Farinha de Peixe 5. Proteína Vegetal 6. Protease exógena

CDD 19ªed. 597.50413

SINOPSE

Avaliou-se a digestibilidade de oito rações experimentais para pirarucu com níveis crescentes de substituição de farinha de peixe por proteína de origem vegetal com e sem a adição de protease exógena. Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) foram analisados separadamente para os grupos com e sem protease e da interação entre os níveis de substituição e protease. Os valores dos CDA encontrados foram abaixo do esperado para os tratamentos sem enzima e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os CDA desses tratamentos. A substituição de 60% da farinha de peixe apresentou valores de digestibilidade aceitáveis enquanto a adição de protease exógena aumentou a digestibilidade aparente no tratamento com 30% de substituição.

Palavras-chave: 1. Piscicultura 2. *Arapaima gigas* 3. Nutrição 4. Peixes carnívoros 5. Protease exógena 6. Proteína Vegetal

“Fazer da interrupção um caminho novo, da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro, pois de tudo ficaram três coisas: a certeza de que ele estava apenas começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar”. Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Manoel Pereira Filho por sua orientação ao longo do mestrado, pela paciência e compreensão nos momentos mais estressantes dessa dissertação e pelo apoio e ensinamentos, fundamentais nesta jornada.

Ao Dr. Rodrigo Roubach, pela orientação, apoio, e ensinamentos valiosos.

Ao Dr. Jorge A. M. da Silva e MSc. Eduardo A. Ono pelas valiosas sugestões, idéias, conversas, apoio e amizade na elaboração e realização desta dissertação.

A Sra. Maria Inês de Oliveira Pereira pela atenção, paciência e inestimável dedicação nas análises bromatológicas.

Ao Dr. Carlos Edwar pela atenção e pelos esclarecimentos nas dúvidas na análise estatística.

A Sra. Suzana Kawashima pela ajuda na execução dos experimentos e pelo carinho maternal com que me acolheu desde minha chegada na CPAQ.

A D. Maria de Fátima (Fatinha) pelo carinho e pelas saborosas refeições que diminuiram consideravelmente minhas saudades de casa.

Ao casal Storti-Filho, Atilio e Eliana, pela amizade, apoio e atenção que sempre tiveram comigo dentro e fora da CPAQ.

Ao casal Makiyama, Marquinhos e Regina, pela amizade, apoio, paciência, e pelas noitadas e incontáveis idas ao aeroporto de Manaus.

Ao amigo Dr. Levy Gomes pela amizade, preocupação e conselhos desde que cheguei a Manaus e que me fazem atento a tantas coisas que me passam despercebido.

Aos ex e atuais bolsistas e estagiários da CPAQ que auxiliaram na execução deste trabalho, em especial a Michelle Façanha, Guido Cavalin e o mestrando Lian Brandão.

A todos os funcionários da CPAQ pela ajuda prestada na execução dos experimentos.

Ao amigo Bruno Adan Sagratzki Cavero pela amizade e por toda ajuda prestada após o término da bolsa.

Ao amigo Daniel Rabelo Ituassú pela constante amizade, companheirismo, apoio automobilístico e pela inestimável ajuda na formatação desta dissertação.

Ao amigo e companheiro de mestrado André Moreira Bordinhon, pela amizade, apoio e ajuda na execução deste trabalho em especial na coleta e análise dos dados.

A amiga Kedma Yamamoto pela amizade, por acreditar em mim e pelo inestimável apoio que foram fundamentais para que concluísse este trabalho e por sempre estar ao meu lado quando precisei.

A amiga Leila Souza pela amizade, carinho e atenção durante o tempo que moramos juntos e pelas incontáveis conversas e refeições que partilhamos.

Aos moradores do Consulado Maranhense por tudo que compartilhamos e por fazerem dele um local para se querer voltar após dias e noites no INPA.

A minha irmã, Lícia pela preocupação, carinho e amizade que teve comigo desde que deixei nossa casa.

Aos meus pais, Dona Auxi e Seu João Fonseca, por todo amor e dedicação e por todo esforço e empenho que tomaram possível mais esta etapa de minha vida.

A Alltech do Brasil S.A. pela doação da enzima utilizada neste trabalho.

Ao CNPq e a FAPEAM pela bolsa concedida e financiamento do projeto.

RESUMO

O pirarucu, *Arapaima gigas*, é uma espécie de hábito alimentar carnívoro e elevado valor comercial. A farinha de peixe é a principal fonte de proteína usada nas rações comerciais para peixes carnívoros. Seu alto custo tem levado à utilização de fontes alternativas de proteína como as de origem vegetal, porém a presença de fatores anti-nutricionais limitam sua porcentagem de inclusão nas rações para carnívoros, por diminuírem a digestibilidade da proteína. A adição de enzimas nas dietas, como a protease, pode melhorar a digestibilidade e o valor nutritivo dos ingredientes. Neste trabalho estudou-se o efeito da inclusão de protease exógena em dietas nas quais se substituiu a farinha de peixe por proteína de origem vegetal sobre a digestibilidade da fração protéica. O experimento foi conduzido em um delineamento fatorial de duas entradas: quatro níveis de substituição protéica (15%, 30%, 45% e 60%) e dois níveis de protease exógena (0,0% e 0,1%) perfazendo oito tratamentos. Para a coleta das fezes utilizou-se o método de coleta por decantação em coluna d'água. A substituição de pelo menos 60% de farinha de peixe por fontes protéicas de origem vegetal (farelo de soja + protenose) não resultou em diferenças significativas nos coeficientes de digestibilidade aparentes analisados enquanto que a adição de protease não proporcionou diferenças significativas na digestibilidade das rações entre os tratamentos de 30% e 60% de substituição. A adição de enzima em dieta de 30% de substituição de farinha de peixe por fontes protéicas de origem vegetal aumentou os percentuais dos coeficientes de digestibilidade total, de proteína e de energia em relação à dieta sem adição de protease em pelo menos um nível de substituição.

ABSTRACT

Pirarucu, *Arapaima gigas*, is a carnivore fish species and has a high commercial value. Fish meal is the main protein source used in commercial feeds for carnivore fish. Its high cost have led to the use of alternative vegetal sources, even though, anti-nutritional factors limits its percentages inclusion in carnivore feeds due to a lower protein digestibility. Enzymes addition, as protease, on the diets can improve digestibility and ingredient nutritional value. This work studied juvenile pirarucu digestibility after exogenous protease inclusion in diets with vegetable protein in substitution of fish meal. The experiments were conducted at the fish culture station from Coordenação de Pesquisas em Aquicultura - INPA using a two way factorial design: four levels of protein substitution and two enzymatic (presence and absence) compromising eight treatments (experimental feeds). Feaces collection method used was a settling water column. The replacement of 60% of fishmeal for plant sources (soybean meal + corn gluten meal) did not generate significant differences in the apparent digestibility coefficients (ADC) analyzed, while the addition of protease did not provide significant differences in the digestibility of the experimental feed between the 30% and 60% replacement treatments. The enzyme addition in diet with 30% fishmeal for plant sources replacement increased the percentages of the total, protein and energy ADC in relation to the same diet without protease.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2. OBJETIVOS.....	4
1.2.1. Geral.....	4
1.2.2. Específicos.....	4
2.1. Animais.....	5
2.2. Delineamento Experimental.....	5
2.3. Rações.....	6
2.3.1. Formulação.....	6
2.3.2. Processamento.....	8
2.4. Manejo dos Peixes.....	9
2.4.1. Coleta de Fezes.....	9
2.4.2. Coletor.....	10
2.5. Análise das Fezes.....	12
2.7. Composição Centesimal.....	12
2.7.1 Umidade.....	13
2.7.2. Proteína bruta (PB).....	13
2.7.3. Extrato etéreo (EE).....	13
2.7.4. Extrato não-nitrogenado (ENN).....	13
2.7.5. Cinza.....	13
2.7.6. Fibra bruta (FB).....	14
2.7.7. Energia bruta.....	14
2.7.8. Óxido de Cromo (Cr ₂ O ₃).....	14
2.8. Análise Estatística.....	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
3.1. Parâmetros Físico-Químicos da Água.....	15
3.2. Coleta de Fezes.....	16
3.3. Determinação da Digestibilidade Aparente.....	19
3.3.1. Substituição Protéica sem Adição de Enzima.....	21
3.3.2. Substituição Protéica Com Adição de Enzima.....	23
3.3.3. Substituição Protéica Sem e Com a Adição de Enzima.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Vista geral das caixas cônicas usadas como coletor de fezes por decantação em coluna d'água utilizado para os estudos de digestibilidade em juvenis de pirarucu	11
Figura 2. Adaptação da saída de água para coleta das fezes decantadas na parte terminal das caixas cônicas (coletor de fezes) para juvenis de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>).....	11
Tabela 1. Interação entre os níveis de substituição de farinha de peixe por proteína de origem vegetal (farelo de soja + farelo de glúten de milho) com e sem protease exógena em dietas experimentais para juvenis de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>).....	6
Tabela 2. Formulação das dietas experimentais com níveis crescentes de substituição de farinha de peixe por proteína de origem vegetal (farelo de soja + farelo de glúten de milho) com (c) e sem (s) protease exógena, fornecidas para juvenis de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>).....	7
Tabela 3. Composição centesimal aproximada das rações contendo níveis crescentes de substituição de farinha de peixe por proteína de origem vegetal (farelo de soja + farelo de glúten de milho) com (c) e sem (s) protease exógena fornecidas para juvenis de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>).....	8
Tabela 4. Parâmetros de qualidade da água, durante o período de realização do experimento de digestibilidade em juvenis de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>) .	15
Tabela 5. Composição centesimal aproximada em matéria seca das amostras de fezes dos juvenis de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>) por tratamento testado.....	17
Tabela 6. Coeficientes de digestibilidade aparente total (CDA Total), da proteína bruta e da energia bruta, estimados a partir das fezes de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>) nos tratamentos de substituição protéica sem adição de protease.....	22
Tabela 7. Coeficientes de digestibilidade aparente (%) total, da proteína bruta e da energia bruta estimada a partir das fezes de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>) dos tratamentos com adição de protease.....	24
Tabela 8. Coeficientes de digestibilidade aparente (%) total, de proteína bruta e de energia bruta estimados a partir das fezes de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>) dos tratamentos fatoriais sem e com adição de protease.	25

1. INTRODUÇÃO

O pirarucu, *Arapaima gigas*, espécie natural da bacia amazônica, é caracterizado por ser um peixe rústico, apresentar respiração aérea obrigatória (Fontenele, 1955), hábito alimentar carnívoro (Imbiriba, 2001), podendo alcançar até 3 metros de comprimento e 200 kg de peso (Souza & Val, 1991). A ausência de espinhas intramusculares, o rendimento médio de carne de 57% (Imbiriba *et al.*, 1994) e a excelente palatabilidade de sua carne fizeram deste peixe uma espécie de elevado valor comercial (Saint-Paul, 1986). Trabalhos recentes demonstraram que juvenis de pirarucu com peso final de aproximadamente trinta e sete gramas, apresentam uma fácil aceitação de ração comercial, quando treinados ainda jovem (Crescêncio, 2001), enquanto Caveró (2003), trabalhando com a mesma espécie com peso médio de cento e quinze gramas ao final do experimento, não observou canibalismo quando os animais foram confinados em altas densidades. Gandra (2002) observou que juvenis de pirarucu com peso médio final de cento e cinquenta gramas, requerem pouco esforço no manejo alimentar, sendo recomendada uma frequência de arraçamento de duas vezes ao dia. 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. Entretanto, a falta de tecnologia para a produção em massa de juvenis, por meio do manejo de reprodutores, o preço de venda desses juvenis e a recomendação de níveis de proteína bruta superiores a 42% na ração de juvenis (Ituassú, 2002), são os maiores empecilhos para o desenvolvimento da criação desta espécie em escala comercial.

A alimentação representa uma parte importante nos custos dos cultivos aquícolas, contribuindo com percentuais que variam de 40 a 60% dos custos operacionais nesta

atividade (Cheng *et al.*, 2003). Esse percentual, entretanto, pode ser maior, dependendo da região, do sistema aplicado ou da espécie cultivada.

Peixes carnívoros possuem uma alta exigência de proteína na dieta, geralmente atribuída ao seu hábito alimentar e ao uso preferencial desse nutriente como fonte de energia na dieta (Halver, 1980). Segundo Cheng *et al.* (2003) a proteína bruta (PB) é o componente mais caro das rações de peixes. Hardy (1999) afirma que a farinha de peixe tem sido tradicionalmente usada como a maior fonte de proteína na ração de peixes, participando com 30 a 50% da composição na maioria das rações comerciais para peixes carnívoros.

O suprimento limitado e o alto custo da farinha de peixe têm forçado os pesquisadores a considerar fontes alternativas de proteína (Akiyama, 1988). Dentre as fontes vegetais, o farelo de soja apresenta-se como uma boa opção devido a sua qualidade nutricional, baixo custo e disponibilidade (Boonyaratpalin & Tumpibal, 1998; Regost *et al.*, 1999).

Trabalhos realizados objetivando a substituição da farinha de peixe por fontes de origem vegetal, alertam sobre a presença de fatores anti-nutricionais (Hardy, 1996; Robaina *et al.*, 1997; Burel *et al.*, 2000). Estes fatores são, em geral, inibidores de protease, que limitam a porcentagem de inclusão da proteína vegetal na formulação de rações para espécies carnívoras, por diminuírem a digestibilidade desta proteína (Fowler, 1980; Boonyaratpalin & Tumpibal, 1998).

A digestibilidade de um ingrediente da ração depende principalmente de sua composição química aliada à capacidade digestiva da espécie que é alimentada (McGoogan & Reigh, 1996). Assim, quanto mais digestível for um nutriente, maior será a sua disponibilidade para absorção e menor a quantidade excretada pelo peixe.

A determinação da digestibilidade dos nutrientes de cada componente da dieta é um pré-requisito necessário para a formulação de dietas biológica e economicamente otimizadas (Shipton & Britz, 2001). Os métodos de coleta de fezes para a determinação da digestibilidade aparente podem variar de acordo com a espécie estudada ou com o objetivo proposto. Silva (1997) utilizou com sucesso incubadoras para ovos de peixes, adaptadas à coleta de fezes, para determinar a digestibilidade de frutos e sementes amazônicos em tambaqui, *Colossoma macropomum*.

A digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta pode ser melhorada com o uso de aditivos enzimáticos, que auxiliam o processo digestivo. O uso de enzimas como aditivo alimentar na nutrição animal está bem estabelecido (Kirk *et al*, 2002). Entretanto, na piscicultura, tem sido relativamente lenta a adoção de enzimas alimentares, pela insistência em manter a farinha de peixe como maior fonte de proteína, especialmente para espécies carnívoras (Officer, 2000).

A maioria dos experimentos com enzimas é baseada na adição destas às dietas. Oliva-Teles *et al.* (1998) trabalhando com fitase na dieta de juvenis de “seabass”, *Dicentrarchus labrax*, obtiveram um aumento na digestibilidade do fósforo, o que acarretaria, segundo os autores, uma diminuição na necessidade de suplementação de fósforo na dieta bem como uma diminuição da descarga de fósforo nos efluentes. Ng *et al.* (2002) afirmam que o uso de enzimas suplementares aumenta o valor nutritivo do farelo de torta de dendê para tilápia, *Oreochromis sp.* Carter *et al.* (1994) conseguiram melhorar o crescimento e a conversão alimentar de salmão do Atlântico, *Salmo salar*, usando enzimas suplementares que continham protease, em rações com farelo de soja. Segundo Sheppy (2001), a adição de protease na ração pode ajudar a neutralizar os efeitos negativos dos

fatores anti-nutricionais, relacionados à proteína de origem vegetal, além de otimizar a quebra das moléculas de proteína existentes.

Neste trabalho estudou-se a influência da inclusão de níveis crescentes de proteína vegetal e da suplementação enzimática com um complexo de proteases na digestibilidade aparente da dieta para juvenis de pirarucu, ampliando assim os conhecimentos para a criação do pirarucu em cativeiro e uma possível diminuição dos custos de produção.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Geral

Avaliação da inclusão de protease exógena sobre a digestibilidade das dietas com níveis crescentes de substituição de farinha de peixe por proteína de origem vegetal para juvenis de pirarucu.

1.2.2. Específicos

- Avaliar a digestibilidade aparente das dietas com substituição de farinha de peixe por proteína de origem vegetal em juvenis de pirarucu.
- Avaliar o efeito da inclusão de protease exógena sobre a digestibilidade aparente da proteína nas rações experimentais para juvenis de pirarucu.
- Avaliar o efeito da adição de protease exógena sobre a digestibilidade aparente da proteína em rações com substituição crescente de farinha de peixe por proteína de origem vegetal, fornecidas à juvenis de pirarucu.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura (CPAQ) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas.

2.1. Animais

Neste experimento foram utilizados juvenis de pirarucu, com peso médio de $2.624,90 \pm 501,13\text{g}$ treinados para aceitação de ração seca, pertencentes ao plantel de animais da CPAQ.

2.2. Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em um esquema fatorial 4×2 , perfazendo 8 tratamentos (Tabela 1). O primeiro fator testado foi à substituição parcial da farinha de peixe por níveis crescentes (15%, 30 %, 45% e 60 %) de proteína vegetal (farelo de soja e farelo de glúten de milho) e o segundo fator testado foi a inclusão ou não de protease (0,1%, a recomendação do fabricante).

Dezesseis grupos de seis pirarucus foram utilizados neste experimento. Cada grupo foi alojado em tanques-rede de pequeno volume (1m^3) mantidos em tanques de alvenaria com fundo de argila, com troca diária de água e monitoramento semanal dos parâmetros físico-químicos da água. Cada grupo (tanque-rede) foi utilizado para a coleta de dois tratamentos diferentes perfazendo num total de 32 unidades experimentais (u.e.), onde cada u.e. foi considerada como a quantidade de fezes coletadas necessária para uma determinação da digestibilidade aparente de cada uma das rações testadas.

Em cada etapa cada tanque-rede foi alimentado com rações diferentes para que as réplicas de cada tratamento tivessem suas amostras coletadas em tanques-rede diferentes.

Tabela 1. Interação entre os níveis de substituição de farinha de peixe por proteína de origem vegetal (farelo de soja + farelo de glúten de milho) com e sem protease exógena em dietas experimentais para juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*).

Protease	Níveis de Substituição Protéica			
	(15%)	(30%)	(45%)	(60%)
Sem	(T1)	(T2)	(T3)	(T4)
Com	(T5)	(T6)	(T7)	(T8)

2.3. Rações

2.3.1. Formulação

As fontes protéicas de origem vegetal escolhidas para compor as rações e substituir a farinha de peixe foram o farelo de soja e o farelo de glúten de milho, os quais estão disponíveis no comércio de Manaus/AM (Tabela 2), assim como os demais ingredientes utilizados na elaboração das rações deste experimento.

O farelo de soja, apesar de possuir um bom balanceamento de aminoácidos essenciais (AA), é pobre em aminoácidos sulfurados (AS), principalmente metionina (NRC, 1993). Por isso, foi utilizado o farelo de glúten de milho para compensar essa carência (NRC, 1993).

O óxido de cromo (Cr_2O_3) foi incorporado como marcador inerte a uma concentração de 0,5 % (Ng & Wilson, 1997), presente na formulação apenas nos dias de coleta de fezes.

Foram formuladas oito rações isoprotéicas (~ 44% proteína bruta na matéria seca) e isocalóricas (EB/PB = ~ 11,7 kcal/g) correspondente à interação entre os quatro níveis de substituição e a presença ou ausência de protease (Tabela 3).

Tabela 2. Formulação das dietas experimentais com níveis crescentes de substituição de farinha de peixe por proteína de origem vegetal (farelo de soja + farelo de glúten de milho) com (c) e sem (s) protease exógena, fornecidas para juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*).

Ingredientes	Níveis (%) dos ingredientes por tratamento							
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈
Farinha de Peixe	42,0	31,0	21,0	10,5	42,0	31,0	21,0	10,5
Farelo de Soja	16,0	25,0	30,0	35,0	15,9	24,9	29,9	35,0
Farelo de Glúten de Milho	7,0	11,0	17,0	22,5	7,0	11,0	17,0	22,5
Farinha de Trigo	29,0	24,5	22,0	19,5	29,0	24,5	22,0	19,5
Óleo de Soja	5,0	7,5	9,0	11,5	5,0	7,5	9,0	11,5
Premix *	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Protease**	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1

* Composição do premix vitamínico e mineral por kg: fósforo 0,5%; cobre 2,66mg; ferro 16,66mg; iodo 0,25mg; manganês 25mg; zinco 16,6mg; vit. A 3,33UI; vit. E 2UI; vit. C 1,000 ppm, vit. D3 800UI; vit B10,46mg; vit. B12 3,33mg; vit B2 1,66mg; vit K 0,52mg.

**Experimental Protease Protocolo n° 02- D - 394 / Batch n° 02 - LS - 174 Alltech do Brasil

Tabela 3. Composição centesimal aproximada das rações contendo níveis crescentes de substituição de farinha de peixe por proteína de origem vegetal (farelo de soja + farelo de glúten de milho) com (c) e sem (s) protease exógena fornecidas para juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*).

Composição centesimal (%)	Rações Testadas (%)							
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈
Umidade	11,7	9,3	8,2	7,2	11,0	10,3	11,9	9,8
Proteína bruta	43,6	43,3	43,9	44,4	44,2	44,2	44,3	45,6
Extrato etéreo	14,2	14,9	14,2	15,2	13,3	14,4	14,2	12,9
Fibra bruta	1,9	1,1	1,5	2,1	1,3	1,8	1,5	1,7
Extratos não nitrogenados	30,0	32,4	32,8	32,5	31,3	32,3	32,7	33,4
Cinzas	10,3	8,3	7,6	5,8	9,9	7,3	7,3	6,4
Energia Bruta* (Kcal/100g)	503,3	518,0	516,5	527,5	503,5	518,0	518,3	516,2
EB : PB	11,54	11,96	11,76	11,88	11,39	11,72	11,70	11,32

* Energia bruta estimada com base nos valores calculados de energia para proteína (5,64 kcal/g), extrato etéreo (9,44 kcal/g) e carboidratos (4,11 kcal/g) (NRC, 1993).

2.3.2. Processamento

Os ingredientes utilizados na composição das rações foram pesados em balança METTLER modelo P-1200 com a capacidade de 1,2kg e 0,01g de precisão. Após a pesagem os ingredientes foram misturados, umedecidos, e em seguida processados em moedor de carne marca C.A.F. modelo 22-S, com matriz de 6 mm, para a formação de peletes. Para secagem dos peletes utilizou-se uma estufa com circulação de ar marca Marconi, modelo MA 035 a temperatura constante de 30 °C. As rações experimentais foram guardadas em sacos plásticos de 2kg e armazenadas em freezer de onde eram removidas à medida da necessidade.

2.4. Manejo dos Peixes

Foi realizada biometria utilizando-se uma balança da marca FILIZOLA, modelo CS-15 com capacidade de 15 kg e 5g de precisão e ictiômetro com precisão de 0,1 cm. Em seguida os pirarucus foram distribuídos nos tanques-rede e estes identificados, após sorteio, pelos tratamentos a que foram submetidos.

Houve um período de aclimação de dez dias ao ambiente e manejo alimentar do experimento. Neste período os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (08:30 e 16:30h) até a saciedade aparente com ração peletizada. No dia das coletas de fezes, os peixes foram alimentados, pela manhã, com rações contendo o marcador inerte óxido de cromo (Cr_2O_3).

No dia anterior à coleta das fezes os peixes não foram alimentados para que não houvesse mistura entre as rações de manutenção e de coleta. Após a coleta das fezes, os peixes foram recolocados em seus respectivos tanques-rede. Esse procedimento foi repetido até que a quantidade de fezes necessária para a análise bromatológica tivesse sido coletada.

2.4.1. Coleta de Fezes

O método de coleta das fezes utilizado neste experimento foi por decantação em coluna d'água, sem aeração ou renovação de água.

No dia da coleta do material fecal os peixes foram transportados do tanque-rede para os coletores de fezes, aproximadamente quinze minutos após a primeira alimentação (08:30h), quando verificada a saciedade aparente.

Em cada coletor foram alojados seis pirarucus durante 24 h. Durante esse período as fezes decantadas na parte terminal dos coletores foram retiradas, homogeneizadas, formando uma amostra para cada tanque-rede, e congeladas imediatamente para posterior liofilização e análises bromatológicas.

Em algumas coletas a quantidade de material coletado não foi suficiente para as análises, assim os peixes continuaram sendo alimentados, com o mesmo tratamento, no horário programado e outras coletas foram realizadas até a obtenção da quantidade de material fecal necessário para a realização das análises de digestibilidade. O número de vezes que cada tanque-rede foi utilizado foi variável em função da quantidade de fezes obtidas em cada coleta.

Os coletores foram lavados com jatos d'água para retirada de resíduos ou quaisquer tipos de contaminação, estando preparados para receber os peixes do próximo tratamento.

2.4.2. Coletor

Para a coleta de fezes utilizaram-se dois cones de fibra de vidro com volume aproximado de 600 l (Fig. 1). Na saída d'água, localizada na porção inferior dos cones foi instalada uma mangueira transparente com volume de 50 ml, intercalada por dois registros hidráulicos (Fig.2). Internamente foi instalada uma tela circular, no fundo dos cones (coletor) para separar as áreas destinadas à permanência dos peixes e à decantação das fezes para evitar uma maior lixiviação do material.

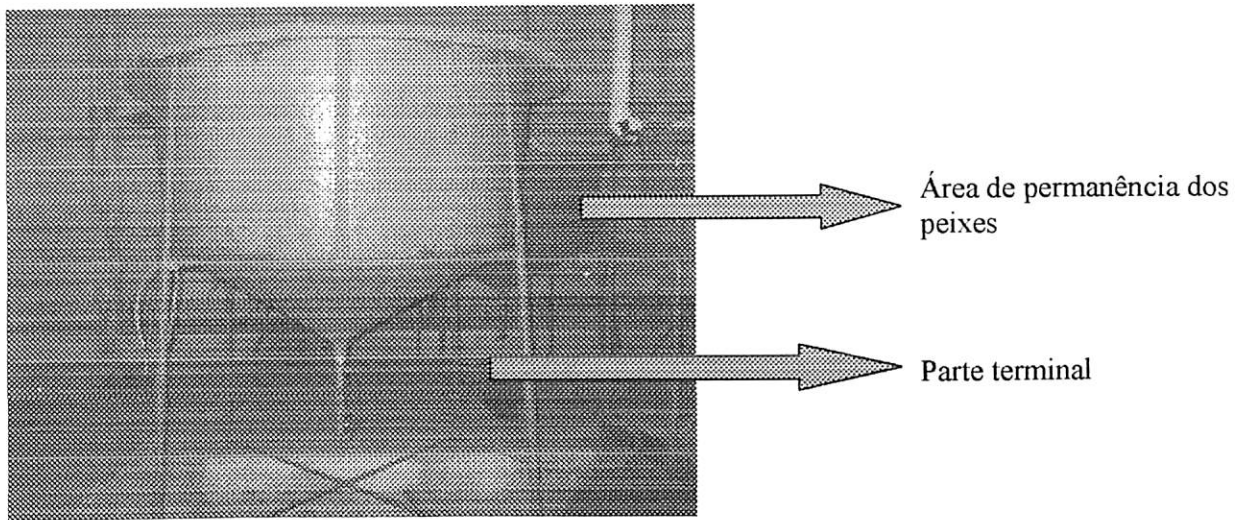


Figura 1. Vista geral das caixas cônicas usadas como coletor de fezes por decantação em coluna d'água utilizado para os estudos de digestibilidade em juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*.

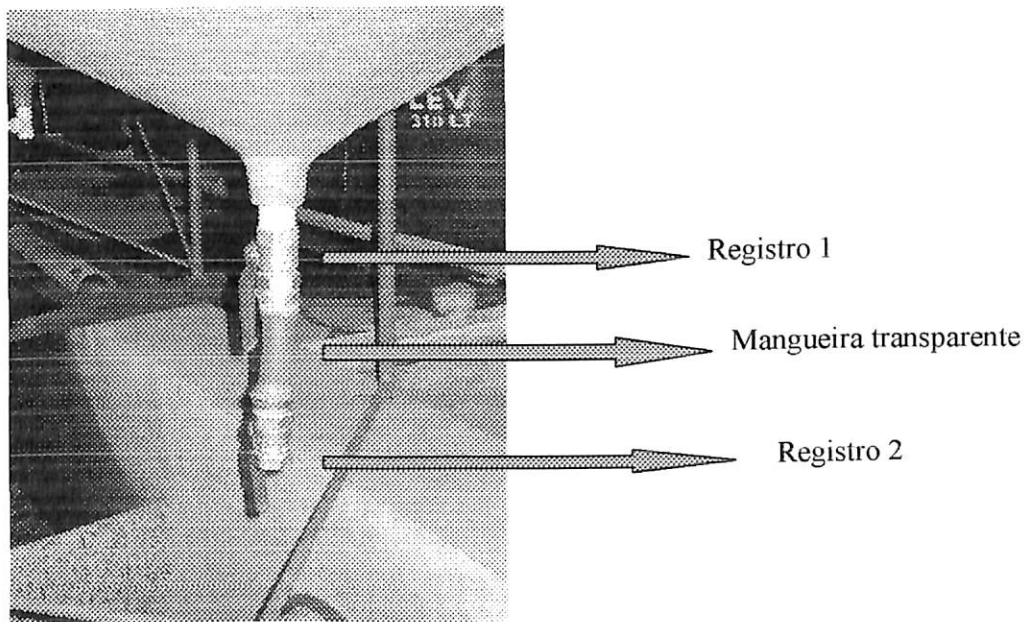


Figura 2. Adaptação da saída de água para coleta das fezes decantadas na parte terminal das caixas cônicas (coletor de fezes) para juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas*.

2.5. Análise das Fezes

Imediatamente após a coleta das fezes em cada unidade experimental as amostras foram homogeneizadas e colocadas em placas de Petri para congelamento. Após o congelamento as fezes foram liofilizadas, e as escamas, bem como qualquer outro material estranho às amostras que possam ter ocorrido foram retiradas, sendo as fezes moídas em seguida para a realização das análises bromatológicas e determinação do óxido de cromo.

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da proteína das rações foram calculados através da equação (Jobling, 2001):

$$A = 100 - 100 [(X_A / X_B) \times (Y_B / Y_A)]$$

Onde:

A = digestibilidade

X_A = concentração de marcador na ração

X_B = concentração de marcador nas fezes

Y_A = concentração de nutriente na ração

Y_B = concentração de nutriente nas fezes

2.7. Composição Centesimal

As análises da composição centesimal dos ingredientes, rações e fezes foram realizadas segundo a metodologia descrita pela A.O.A.C. (1997). As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição de Peixes/ CPAQ / INPA.

2.7.1 Umidade

A umidade foi determinada considerando-se a perda de peso durante a pré-secagem, mais o peso perdido quando as alíquotas do material foram submetidas à temperatura de 105° C até peso constante.

2.7.2. Proteína bruta (PB)

Foi calculada nas amostras através da determinação do nitrogênio total, pelo método de micro-Kjeldahl. As concentrações de proteína bruta das amostras foram obtidas multiplicando-se os valores de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,25.

2.7.3. Extrato etéreo (EE)

Os teores de extrato etéreo (fração lipídica) foram determinados por extração contínua com o solvente éter de petróleo num extrator intermitente em aparelho Soxhlet.

2.7.4. Extrato não-nitrogenado (ENN)

Os valores do extrato não-nitrogenado (carboidratos) foram obtidos pelo cálculo da diferença entre a totalidade do peso seco de cada amostra menos os valores percentuais de PB, EE, FB e cinzas.

2.7.5. Cinza

As concentrações de cinza total foram determinadas em amostras incineradas em mufla a 550°C durante 3 horas.

2.7.6. Fibra bruta (FB)

Foi determinado o resíduo por digestão ácido-básica de acordo com o método de Weende (Estação Experimental de Agricultura de Weende/ Alemanha).

2.7.7. Energia bruta

A Energia bruta foi estimada com base nos valores de energia para proteína= 5,64 kcal/g, extrato etéreo= 9,44 kcal/g e carboidratos= 4,11 kcal/g (NRC 1993).

2.7.8. Óxido de Cromo (Cr₂O₃)

A análise para determinação da concentração de óxido de cromo nas amostras de fezes foi realizada por método colorimétrico conforme metodologia descrita por Furukawa e Tsukahara (1966).

2.8. Análise Estatística

Os valores percentuais dos coeficientes de digestibilidade foram ajustados pela transformação arco-seno para a realização das análises estatísticas. A homogeneidade das variâncias das médias dos tratamentos foi analisada usando o teste de Cochran (Zar, 1996), sendo que dentro de cada grupo testado as variâncias mostraram-se homogêneas.

Os valores dos coeficientes de digestibilidade aparente total (CDA Total), proteína bruta (CDA PB) e energia bruta (CDA EB) foram analisados para cada um dos fatores testados e para a interação entre esses fatores formando assim três grupos de análise. Os grupos foram analisados por ANOVA, sendo que os grupos 1 (15%^s, 30%^s, e 45%^s sem enzima) e 2 (30%^c, 45%^c, e 60%^c com enzima) por análise de variância de uma entrada

(one-way ANOVA) e o grupo 3, formado pela interação substituição protéica X enzima (30%^s, 45%^s, x T6^c, T7^c) por análise de variância de duas entradas (two-way ANOVA) com e 5% do nível de significância. Os valores percentuais dos coeficientes de digestibilidade foram ajustados pela transformação arco-seno. Para a separação das médias foi empregado o teste de Tukey (P<0,05) (Zar, 1996).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Parâmetros Físico-Químicos da Água

Na Tabela 4 estão descritas as médias e variações dos parâmetros físico-químicos da água no viveiro (e coletores para a temperatura). Os parâmetros físico-químicos monitorados não apresentaram variações que pudessem interferir no desempenho dos peixes durante o experimento.

Tabela 4. Parâmetros de qualidade da água, durante o período de realização do experimento de digestibilidade em juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*).

Parâmetros ambientais monitorados	Média ± desvio padrão	Variação
Temperatura (Viveiro) (°C)	29,62 ±1,08	28,10 -32,20
Temperatura (Coletores) (°C)	28,90 ±0,54	28,10 -30,30
Oxigênio dissolvido (OD) (mg/L)	6,64 ±2,16	2,59 -10,00
Condutividade (µS.cm ⁻²)	40,51 ±21,06	17,60 -92,10
pH	6,43 ±1,37	4,30 -8,85
Transparência (cm)	31,50 ±3,38	27,00 -37,00

Os parâmetros físico-químicos da água ficaram dentro da faixa considerada adequada para criação de peixes. Neste experimento não houve necessidade de um acompanhamento para o parâmetro de amônia total devido à tolerância de juvenis desta espécie a concentrações elevadas de amônia total na água (Cavero *et al.* 2004) e pelo manejo alimentar empregado com reduzida carga orgânica na água.

A temperatura é o principal fator abiótico que age sobre a taxa de metabolismo dos peixes e conseqüentemente no consumo de alimento e processo digestivo (Smith, 1989). Kim *et al.* (1998) encontraram variações significativas na digestibilidade aparente dos ingredientes testados em carpa comum (*Cyprinus carpio*) em duas temperaturas distintas.

De acordo com o experimento realizado na Amazônia Central por Rabelo & Araújo-Lima (2002) a variação de 2,5 °C não influenciou a taxa de evacuação gástrica do tucunaré (*Cichla monoculus*), uma espécie carnívora tropical, dado este que pode ser utilizado como indicativo para outras espécies carnívoras amazônicas.

A taxa de evacuação gástrica é um dos fatores mais importantes na variação da digestibilidade por permitir ou não um maior contato do material ingerido com as enzimas digestivas necessárias a sua degradação metabólica. A temperatura pode influenciar na taxa de evacuação gástrica em peixes, alterando assim a digestibilidade de um determinado ingrediente ou ração. Nos coletores, a temperatura da água apresentou variação de 2,2 °C. Isso sugere não ter havido influência da temperatura nos coeficientes determinados neste experimento.

3.2. Coleta de Fezes

A metodologia de coleta de fezes empregada neste estudo apresenta algumas facilidades, pois não foi necessária a troca de água ou aeração durante o processo de coleta

de fezes do pirarucu. Foi somente necessário repetir a coleta de fezes em algumas repetições dos tratamentos testados. A tela utilizada no cone do coletor para impedir que os movimentos dos pirarucus fragmentassem as fezes mostrou-se eficiente.

Durante a retirada dos pirarucus após a coleta, foi observado um acúmulo de muco na água do coletor. Isso pode explicar os elevados índices de proteína bruta encontrados nas fezes de quatro dos tratamentos analisados (T2, T4, T5 e T7) como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Composição centesimal aproximada em matéria seca das amostras de fezes dos juvenis de pirarucu (*Arapaima gigas*) por tratamento testado.

Composição centesimal (%)	Tratamentos							
	15s	30s	45s	60s	15c	30c	45c	60c
Proteína bruta	21,8	31,4	21,3	38,8	39,0	20,0	40,8	24,2
Extrato etéreo	3,1	8,2	5,1	7,4	6,3	4,7	9,0	5,2
Extratos não-nitrogenados	35,4	24,7	41,7	32,5	24,8	37,1	28,8	31,9
Cinzas	30,2	28,4	21,1	15,1	25,7	27,5	16,8	27,6
Fibra bruta	9,6	7,3	10,9	6,2	4,1	10,7	4,6	11,0
Energia Bruta (Kcal/100g)	297,4	355,8	339,0	422,1	381,7	309,7	433,2	317,3

S= sem enzima C= com enzima

A dificuldade da coleta de fezes ocorrida neste trabalho não é incomum, sendo citada por Laining *et al.* (2003) que utilizaram um delineamento experimental semelhante para avaliar a digestibilidade aparente de ingredientes na garoupa corcunda (*Cromileptes altivelis*).

Com exceção de Bordinhon (2004) ainda não se encontram publicados trabalhos que abordem aspectos metodológicos do estudo de nutrição do pirarucu no que se refere à digestibilidade ou coleta de fezes desta espécie. Tais pesquisas são necessárias para gerar

uma maior acuidade dos resultados e com isso uma maior credibilidade das informações neles embasadas.

Estimativas sobre os coeficientes de digestibilidade também podem variar dependendo da metodologia utilizada na coleta das amostras de fezes (Vens-Cappell, 1985; Fernández *et al.*, 1998; Hemre *et al.*, 2003). Os métodos de coleta de fezes em organismos aquáticos são variados e podem ser escolhidos segundo as características da espécie estudada, tais como tamanho, comportamento ou valor comercial (Storebakken *et al.* 1998; Percival *et al.*, 2001).

No presente estudo utilizou-se uma técnica de coleta de fezes em coluna d'água por decantação, similar ao modelo adaptado usado por Silva (1997) para coleta de fezes de juvenis e adultos de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Várias técnicas de coleta de fezes têm sido testadas e utilizadas, como decantação em coluna de água do sistema Guelph e suas variações (Cho, 1985; Hajen *et al.* 1993; Allan *et al.*, 1999; Lee, 2002), extrusão e dissecação do trato intestinal (Spyridakis *et al.*, 1989; Storebakken *et al.* 1998; Hemre *et al.*, 2003). Todos esses métodos possuem facilidades e entraves inerentes à sua aplicação.

O método de coleta por decantação em coluna d'água frequentemente está limitado ao porte do peixe e à lixiviação dos nutrientes e marcadores na água. A extrusão e a dissecação são problemáticas para peixes pequenos, pela pequena quantidade de fezes coletadas, sendo que para peixes grandes o manejo é dificultado pelo porte avantajado dos animais experimentais. Percival *et al.* (2001) utilizaram o método de dissecação para a coleta de fezes na determinação da digestibilidade aparente de salmão do atlântico (*Salmo salar*) acima de cinco quilogramas e Bordinhon (2004) comparou a coleta de fezes em coluna d'água e por dissecação em juvenis de pirarucu, não encontrando diferenças

significativas a ponto de levar a resultados discrepantes entre os resultados. Para animais de grande porte a dissecação pode ser uma opção desde que possa ocorrer o descarte dos animais experimentais, uma vez que a aplicação desta técnica está associada ao sacrifício dos peixes amostrados, tornando-a muito onerosa. *Arapaima gigas* é uma espécie que apresenta baixa disponibilidade de juvenis no mercado, devido as suas características ecológicas (k estrategista), morfológicas (apenas uma gônada é funcional) e comerciais (elevado valor de venda) (Imbiriba, 2001). A extrusão de um peixe forte e agressivo, como o pirarucu, quando manipulado, somente pode ser possível com o uso de anestésicos. E por ser um peixe de respiração aérea obrigatória, As tentativas de anestesia desta espécie na Coordenação de Aqüicultura do INPA mostraram-se pouco eficientes, ocorrendo casos de mortalidade.

A coleta de fezes em coluna d'água apresenta-se como o método de baixo custo mais viável até o momento para o pirarucu. Entres as vantagens está a elevada tolerância da espécie ao manejo intensivo para a coleta, a facilidade de coleta das fezes quando comparada à extrusão ou dissecação, à adaptação dos peixes ao ambiente do coletor, à facilidade de limpeza do coletor, e procedimentos como troca de água e aeradores mostraram-se desnecessários. O transporte entre os viveiros de alimentação e os coletores aparentemente não afetou a excreção de fezes nos peixes amostrados. Entretanto, este método apresentou algumas desvantagens. Após sucessivas coletas, o tempo de aclimação considerando o retorno de apetite tornou-se superior às 24 horas iniciais.

3.3. Determinação da Digestibilidade Aparente

Os tratamentos T4 (60 % PV) e T5 (15 % PV + protease) não foram analisados por apresentarem discrepâncias nos resultados das leituras do óxido de cromo no

espectrofotômetro. Tais discrepâncias, como as concentrações de cromo inferiores ao adicionado às rações, afetaram algumas réplicas. Para manutenção da ortogonalidade do delineamento experimental foi retirada uma réplica de cada tratamento. Os tratamentos que não apresentaram problemas em suas repetições tiveram a exclusão de uma repetição por sorteio.

Em função da perda desses tratamentos o arranjo fatorial original de 4 níveis de substituição de farinha de peixe por proteína de origem vegetal foi substituído por três delineamentos distintos de acordo com a organização dos demais 6 tratamentos restantes em três grupos: O primeiro grupo foi constituído dos tratamentos sem a adição de protease exógena (T1, T2 e T3), o segundo grupo foi composto dos tratamentos com a adição de protease exógena (T6, T7 e T8) e o terceiro grupo foi constituído para formar um delineamento fatorial 2 x 2 com os níveis de substituição protéica sem e com a adição de protease exógena (T2, T3 X T7, T8).

A determinação da digestibilidade aparente se baseia na diferença entre os percentuais dos nutrientes encontrados nas rações e nas fezes. Para a determinação destes percentuais o método mais utilizado é o uso de marcador externo em dietas (Smith & Lovell, 1973; De Silva e Perera, 1984; Hillestad *et al.* 1999) onde o óxido de cromo (Cr_3O_2) é frequentemente usado (Gaylord & Gatlin III, 1996; Ng & Wilson, 1997; Lee, 2002).

No método indireto, os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) são calculados pela determinação do percentual de óxido de cromo recuperado nas fezes dos peixes. Erros na determinação desse percentual podem invalidar os resultados obtidos para quaisquer dos CDA calculados.

3.3.1. Substituição Protéica sem Adição de Enzima

A aqüicultura mundial tem apresentado uma taxa crescente de produção (FAO, 2002) e os organismos mais representativos deste crescimento, peixes e camarões, têm a farinha de peixe como principal fonte de proteína nas rações comerciais. Trabalhos como os de Naylor *et al.* (1999) e Tidwell & Allan, (2001) têm alertado para o impacto do aumento da demanda por farinha de peixe para o meio ambiente e, portanto, na necessidade de reduzir a utilização de farinha de peixe como ingrediente nas rações de organismos aquáticos. Hardy (1996) e Watanabe (2002) também levantaram a mesma necessidade e sugerem o uso de fontes alternativas de proteína. Watanabe (2002) postula a possibilidade do uso de dietas sem farinha de peixe, baseado em estudos de digestibilidade de fontes vegetais de proteína.

Todavia ainda são necessários muitos estudos específicos sobre a espécie cultivada e suas fases de desenvolvimento para chegar a rações com baixos teores ou mesmo sem o uso de farinha de peixe. Entretanto vários trabalhos como os de Regost *et al.* (1999), Opstvedt *et al.* (2003) e Kaushik *et al.* (2004) têm testado o aumento gradativo de proteína de origem vegetal em substituição parcial ou total a farinha de peixe nas dietas de peixes com elevada exigência protéica, como por exemplo, o salmão do Atlântico (*Salmo salar*), “turbot” (*Psetta máxima*) e o robalo europeu, (*Dicentrarchus labrax*) estudados por esses autores.

Os coeficientes de digestibilidade aparente total, proteína bruta e energia dos tratamentos sem a adição de protease estão descritos na Tabela 6. Não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos para nenhum dos CDAs analisados. O CDA total nos três tratamentos apresentou valores muito baixos e entre estes, os valores maiores foram observados para os CDA de proteína e energia. Os baixos valores

encontrados para CDA total podem ser explicados pelos níveis elevados de carboidratos na ração. Esses níveis justificam-se pelo uso de ingredientes de origem vegetal. Tanto o uso desse tipo de ingredientes como a baixa digestibilidade de carboidratos foram observados por Bordinhon (2004) para juvenis de pirarucu em condições semelhantes a este experimento. Cavero (2004) concluiu que juvenis de pirarucu possuem uma atividade endógena de amilase reduzida e que a suplementação de amilase exógena não resulta em melhorias no desempenho zootécnico destes animais.

Tabela 6. Coeficientes de digestibilidade aparente total (CDA Total), da proteína bruta e da energia bruta, estimados a partir das fezes de pirarucu (*Arapaima gigas*) nos tratamentos de substituição protéica sem adição de protease.

CDA (%)	Substituição Protéica		
	T1 (15 %)	T2 (30 %)	T3 (45 %)
Total	38,42 ±6,83	34,83 ±8,99	38,46 ±27,43
Proteína	66,78 ±10,00	50,14 ±7,90	67,08 ±20,49
Energia	63,17 ±10,16	55,25 ±6,14	59,12 ±20,78

Os valores de CDA obtidos neste experimento mostraram-se muito inferiores ao encontrado em trabalhos similares de substituição protéica. Robaina *et al.* (1995) em um experimento de substituição protéica de farinha de peixe por farelo de soja para a dourada, *Sparus aurata*, obtiveram CDA de proteína e energia de 87,64 e 97,51%, respectivamente, utilizando dieta com 30 % de farelo de soja. Carter & Hauler (2000) em dietas extrusadas para salmão do atlântico (*Salmo salar*) obtiveram para as rações com 33% de substituição de farinha de peixe por soja, um CDA total de 83,05% e de 95,86% para o CDA de proteína.

Durante a troca das unidades experimentais, foi observado um acúmulo de muco no fundo nos coletores e como consequência, nas amostras de fezes coletadas. Sendo que por ser o muco uma substância protéica, isso poderia explicar os baixos níveis de CDA Proteína encontrados neste experimento. Como a determinação da proteína está baseada num fator de conversão sobre o nitrogênio total da amostra, determinado pelo método de micro-Kjeldahl (Patrick & Schaible, 1980), sem uma discriminação da origem do nitrogênio, fazendo com que assim esses níveis de proteína encontrados pela análise bromatológica podendo também ser proveniente do muco do peixe, ao invés da fração não digerida das rações, levando a uma subestimação dos valores de digestibilidade aparente para esses três tratamentos.

3.3.2. Substituição Protéica Com Adição de Enzima

As enzimas têm desempenhado atualmente um papel significativo no aumento da utilização de fontes protéicas vegetais para as espécies aquáticas cultivadas (Officer, 2000). A principal razão para o uso de enzimas é a melhoria do valor nutritivo dos ingredientes, ao melhorar a digestibilidade dos nutrientes aumentando capacidade digestiva nos peixes, como a protease, que pode ajudar a neutralizar os efeitos negativos dos fatores anti-nutricionais das proteínas de origem vegetal segmentando as enormes cadeias protéicas em fragmentos absorvíveis (Sheppy, 2001).

O complexo enzimático de proteases utilizado neste estudo foi adicionado aos ingredientes ainda secos, durante o preparo da ração e antes do processo de peletização, que de acordo com Thorpe & Beal (2001) é o método mais comum de adição de enzimas na ração. Segundo estes autores, a aplicação de enzimas exógenas em dietas secas pressupõe que a enzima será ativada no trato digestivo do animal.

Os coeficientes de digestibilidade aparente total, da proteína bruta e da energia dos tratamentos com a adição de protease estão descritos na Tabela 7. Nela pode ser observado que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos T6 e T8 (30% e 60 % de substituição, respectivamente) para os CDAs estimados. Entretanto, o tratamento intermediário T7 (com 45 % de substituição) diferiu ($p < 0,05$) dos demais tratamentos para os CDA total, de proteína e de energia apresentando uma menor digestibilidade aparente. Apesar do tratamento T7 apresentar uma variação dos valores de CDA bem maior que os outros dois tratamentos analisados, o que pode levar a uma interpretação errada desse resultado, os valores obtidos nos tratamentos com níveis inferior e superior de substituição sugere que não houve diferença entre a digestibilidade aparente para os 3 níveis crescentes de substituição de farinha de peixe por fontes protéicas vegetais com adição de protease.

Tabela 7. Coeficientes de digestibilidade aparente (%) total, da proteína bruta e da energia bruta estimada a partir das fezes de pirarucu (*Arapaima gigas*) dos tratamentos com adição de protease.

CDA (%)	Substituição Protéica		
	T6 (30 %)	T7 (45 %)	T8 (60 %)
Total	72,46 ±7,27 ^a	44,81 ±16,30 ^b	87,83 ±4,30 ^a
Proteína	84,69 ±7,29 ^a	44,15 ±13,64 ^b	82,16 ±9,71 ^a
Energia	83,75 ±4,07 ^a	54,41 ±10,54 ^b	80,67 ±8,49 ^a

Letras iguais, na mesma linha, indicam que os valores de CDA não possuem diferença significativa ($p > 0,05$)

Os resultados encontrados para os coeficientes de digestibilidade total (72,46%) e de energia (83,75%) foram similares aos encontrados por Carter & Hauler (2000), (CDA T

83,05%) e (CDA E 89,73%) em dietas extrusadas para salmão do atlântico (*Salmo salar*) com níveis semelhantes de substituição do percentual de farinha de peixe por soja.

O excelente desempenho demonstrado pelas dietas com adição de protease reflete os resultados obtidos por Carter *et al.* (1994) que, estudando a suplementação enzimática de dietas com e sem a presença de farelo de soja na ração em salmão do atlântico (*Salmo salar*) observaram uma melhora no crescimento e eficiência da conversão alimentar quando comparada à ração com a mesma proporção de farelo de soja.

3.3.3. Substituição Protéica Sem e Com a Adição de Enzima

Das seis rações testes elaboradas, foram realizadas comparações de desempenho da adição de enzima sobre a substituição protéica em apenas quatro rações.

Houve interação entre os fatores testados neste experimento como indicam os valores apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Coeficientes de digestibilidade aparente (%) total, de proteína bruta e de energia bruta estimados a partir das fezes de pirarucu (*Arapaima gigas*) dos tratamentos fatoriais sem e com adição de protease.

CDA (%)	30% Substituição Protéica		45% Substituição Protéica	
	Sem protease (T2)	Com protease (T6)	Sem protease (T3)	Com protease (T7)
Total	34,83±8,99 ^a	72,46±7,27 ^a	38,46±27,43 ^a	44,81±16,30 ^a
Proteína	50,14±7,90 ^b	84,69±7,29 ^a	67,08±20,49 ^{a,b}	44,15±13,64 ^b
Energia	55,25±6,14 ^b	83,75±4,07 ^a	59,12±20,78 ^{a,b}	54,41±10,54 ^b

Letras iguais, na mesma linha, indicam que os valores de CDA não possuem diferença significativa ($p>0,05$).

Não houve diferença entre as digestibilidade aparentes de T6 e T3. As rações com 45% de substituição (T3 e T7) apresentaram variações maiores que as rações com 30% de substituição (T2 e T6) em todos os CDAs. Com isso a adição de enzima aparentemente não aumentou a digestibilidade aparente, em nenhum dos CDAs analisados, do tratamento com um nível acima de substituição (45%). Para os CDAs de proteína e energia, a enzima propiciou uma digestibilidade significativamente maior ($p < 0,05$) na ração com 30% de substituição com protease (T6). A ração T6 apresentou os maiores valores para todos os CDAs analisados, inclusive para o CDA total mesmo este não sendo diferente estatisticamente ($p > 0,05$) entre as demais rações.

Os valores dos percentuais de digestibilidade total apresentaram comportamento semelhante ao obtido por Carter & Hauler (2000) onde o CDA Total não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos com e sem a adição de enzima. Neste trabalho, rações para juvenis de pirarucu com nível de substituição protéica de 30% de proteína vegetal associada à adição de protease apresentaram melhor aproveitamento com o aumento dos coeficientes de digestibilidade de proteína e energia.

5. CONCLUSÕES

A substituição de pelo menos 60% de farinha de peixe por fontes protéicas vegetais (farelo de soja + protenose) não gerou diferenças significativas nos coeficientes de digestibilidade aparente analisados, propiciando níveis aceitáveis de digestibilidade aparente na ração.

A adição de protease nas rações de substituição de farinha de peixe por fontes protéicas vegetais (farelo de soja + protenose) não proporcionou diferenças significativas na digestibilidade de juvenis de pirarucu entre os tratamentos de 30% e 60% de substituição.

A adição de enzima em dieta de 30% de substituição de farinha de peixe por fontes protéicas vegetais (farelo de soja + protenose) aumentou os percentuais dos coeficientes de digestibilidade total, de proteína e de energia em relação à dieta sem adição de protease em pelo menos um nível de substituição.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. 1997. *Official Methods of Analysis*. 17th. ed. Gaithersburg, USA: Association of Official Analytical Chemists Int.
- 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>. Acesso em 08 de dezembro de 2002.
- Allan, G.L.; Rowland, S.J.; Parkinson, S.; Stone, D.A.J.; Jantrarotai, W. 1999. Nutrient digestibility for juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus*: development of methods. *Aquaculture*, 170: 131-145.
- Austreng, E.; Storebakken, T.; Thomassen, M.S.; Refstie, S.; Thomassen, Y. 2000. Evaluation of selected trivalent metal oxides as inert markers used to estimate apparent digestibility in salmonids. *Aquaculture*, 188: 65-78.
- 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.
- Bordinhon, A. M. Suplementação de amilase e solubilidade de amido na digestibilidade da ração para pirarucu, *Arapaima gigas*. Manaus: INPA/UFAM, 2004. 42p.
- 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 utilisation 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.
- Carter, C.G., Hauler, R.C., 2000. Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 185: 299-311.
- Cavero, B.A.S. 2004. Uso de enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier, 1982). *Tese de doutorado* – INPA/ UFAM – Manaus-AM. 75p.
- Cavero, B.A.S.; Pereira-Filho, M.; Bordinhon, A.M.; Fonseca, F.A.L.; Ituassú, D.R.; Roubach, R.; Ono, E.A. 2004. Tolerância de juvenis de pirarucu ao aumento da concentração de amônia em ambiente confinado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39 (5): 513-516.
- 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.
- 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.
- Cho, C.Y. 1985. Measurement of feed ingredient digestibility in: *Finfish nutrition in asia: Methodological approaches to research and development*. Ottawa, Canada. 154p.
- Crescêncio, R. 2001. *Treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, Arapaima gigas CUVIER, 1829, utilizando atrativos alimentares*. Dissertação de Mestrado, INPA/UA, Manaus, AM. 35p.

- Dabrowski, K.; Dabrowski, H. 1981. Digestion of protein by rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) and absorption of aminoacids within the alimentary tract. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 69A:69-99.
- De Silva, S.S.; Perera, M.K. 1984. Digestibility in *Sarotherodon niloticus* fry: effect of dietary protein level and salinity with further observations on variability in daily digestibility. *Aquaculture*, 38: 293-306.
- FAO. 2002. *The state of world fisheries and aquaculture*. Food And Agriculture Organization of the United Nations Rome, Italy, 159 p.
- Fernandez, F.; Miquel, A.G.; Guinea, J.; Martinez, R. 1998. Digestion and digestibility in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the effect of diet composition and ration size. *Aquaculture*, 166: 67-84.
- Fontenele, O. 1955. Contribuição para o conhecimento da biologia do pirarucu, "*Arapaima gigas*" CUVIER, em cativo *Actinopterygii, Osteoglossidae*. DNOCS, Publicação 166, Série I-C, Fortaleza, Ceará. 20p.
- 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
- Furukawa, A.; Tsukahara, H. 1966. On the acid digestion for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*, 6:502-506.
- Gandra, A.L. 2002. *Estudo da freqüência alimentar do pirarucu, Arapaima gigas CURVIER, 1829*. Dissertação de Mestrado, INPA/UA, Manaus, AM. 36 p.
- Gaylord, T.G.; Gatlin III, D.M. 1996. Determination of digestibility coefficients of various feedstuffs for red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 139: 303-314.

- Hajen, W.E.; Beames, R.M.; Higgs, D.A.; Dosanjh, B.S. 1993. Digestibility of various feedstuffs by post-juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in sea water. 1. Validation of technique. *Aquaculture*, 112: 321-332.
- Halver, J.E. 1980. Proteins and Amino Acids. in: *Fish Feed Technology*. FAO. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/x5738e/x5738e04.htm>. Acesso em 12 de fevereiro de 2003.
- Hardy, R.W. 1999. Aquaculture's rapid growth requirements for alternate protein sources. *Feed Management*, 50: 25-28.
- Hardy, R.W. 1996. Alternate protein sources for salmon and trout diets. *Animal Feed Science and Technology*, 59 (1-3):71-80.
- Hemre, G.-I.; Karlsen, O.; Mangor-Jensen, A.; Rosenlund, G. 2003. Digestibility of dry matter, protein, starch and lipid by cod, *Gadus morhua*: comparison of sampling methods. *Aquaculture*, 225: 225-232.
- Hillestad, M.; Asgard, T.; Berge, G.M. 1999. Determination of digestibility of commercial salmon feeds. *Aquaculture*, 179: 81-94.
- Imbiriba, E.P.; Lourenço, J.B.; Dutra, S. 1994. Rendimento de carne de pirarucu, *Arapaima gigas* Cuvier. EMBRAPA-CPATU. Belém/BR. *Boletim de Pesquisa*, 150. 21p.
- Imbiriba, E.P. 2001. Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. *Acta Amazônica*, 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. 38p.
- Jobling, M. 2001. Feed composition and analysis. In: Houlihan, D.; Boujard, T.; Jobling, M. (Eds.). *Food intake in fish*. Blackwell Science Ltd. Oxford, UK. p. 1-24.

- Kabir, N.M.J.; Wee, K.L.; Maguire, G. 1998. Estimation of apparent digestibility coefficients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using different markers: 1. Validation of microtracer F-Ni as a marker. *Aquaculture*, 167: 259-272.
- Kaushik, S.J.; Coves, D.; Dutto, G.; Blanc, D. 2004. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 230: 391-404.
- Kim, J.D.; Kaushik, S.J.; Breque, J. 1998. Nitrogen and phosphorus utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with or without fish meal. *Aquatic Living Resources*, 11: 261-264.
- Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fuglsang, C. C. 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 345-351.
- Laining, A.; Rachmansyah; Ahmad, T.; Williams, K. 2003. Apparent digestibility of selected feed ingredients for humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. *Aquaculture*, 218: 529-538.
- Lee, S.-M. 2002. Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture*, 207: 79-95.
- McGoogan, B.B.; Reigh, C.R. 1996. Apparent digestibility of selected ingredients in red drum *Sciaenops ocellatus* diets. *Aquaculture*, 141: 233-244.
- Naylor, R.L.; Goldberg, R.J.; Primavera, J.H.; Kautsky, N.; Beveridge, M.C.M.; Clay, J.; Folke, C.; Lubchenco, J.; Mooney, H.; Troell, M. 2000. Effect of aquaculture on worldfish supplies. *Nature* 405:1017-1024.
- Ng, W.K.; Wilson R.P. 1997. Chromic oxide inclusion in the diet does not affect glucose utilization or chromium retention by channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Nutrition*. 127: 2357-2362.

- Ng, W.K.; Lim H.A.; Lim S.L.; Ibrahim, C.O. 2002. Nutritive value of palm kernel meal pretreated with enzyme or fermented with *Trichoderma koningii* (Oudemans) as a dietary ingredient for red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) *Aquaculture Research*, 33: 1119-1207.
- NRC– National Research Council. 1993. *Nutrient Requirements of Fish*. Washington, D.C., 115p.
- 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.
- Oliva-Teles, A.; Pereira, J.P.; Gouveia, A.; Gomes, E. 1998. Utilization of diets supplemented with microbial phytase by seabass *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Aquatic Living Resources*, 11 (4):255-259.
- Opstvedt, J.; Aksnes, A.; Hope, B.; Pike, I.H. 2003. Efficiency of feed utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with increasing substitution of fish meal with vegetable proteins. *Aquaculture*, 221: 365-379.
- Patrick, H; Schaible, P.J. *Poultry: Feeds and nutrition*. 2nd. ed. U.S.A.: Avi Publish Co. Inc., 1980.
- Percival, S.B.; Lee, P.S.; Carter, C.G. 2001. Validation of a technique for determining apparent digestibility in large (up to 5 kg) Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seacages. *Aquaculture*, 201: 315-327.
- Rabelo, H.; Araújo-Lima, C.A.R.M. 2002. A dieta e o consumo diário de alimento de *Cichla monoculus* na Amazônia Central. *Acta Amazônica*, 32(4): 707-724.
- Riche, M.; White, M.R.; Brown, P.B. 1995. Barium carbonate as an alternative indicator to chromic oxide for use in digestibility experiments with rainbow trout. *Nutrition Research* 15(9):1323-1331.

- Robaina, L.; Izquierdo, M.S.; Moyano, F.J.; Socorro, J.; Vergara, J.M.; Montero, D.; Fernandez-Palacios, H. 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture*, 130: 219-233.
- 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. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. *Aquaculture*, 54: 205-240.
- 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.
- Shipton, T.A.; Britz, P.J. 2001. An assessment of the use of chromic oxide as a marker in protein digestibility studies with *Haliotis midae* L. *Aquaculture*, 2001 69-83.
- Silva, J.A.M. 1997. Nutrientes, energia e digestibilidade aparente de frutos e sementes consumidos pelo tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1818) nas florestas inundáveis da amazônia central. Tese de Doutorado, INPA/UA, Manaus, AM. 142 p.
- Smith, B.W.; Lovell, R.T. 1973. Determination of apparent protein digestibility in feeds for channel catfish. *Transactions of American Fisheries Society* 102: 831-835.
- Smith, R.R. 1989. Nutritional energetics. In Halver, J. E. (Ed). *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego. p. 2-31.
- Souza, R.H. S.; Val, A.L. 1991. O gigante das águas doces. *Ciência Hoje*, 11: (64) 129-133.

- Spyridakis, P.; Metailler, R.; Gabaudan, J.; Riaza, A. 1989. Studies on nutrient digestibility in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): 1. Methodological aspects concerning faeces collection. *Aquaculture*, 77: 61-70.
- Storebakken, T.; Kvien, I.S.; Shearer, K.D.; Grisdale-Helland, B.; Helland, S.J.; Berge, G.M. 1998. The apparent digestibility of diets containing fish meal, soybean meal or bacterial meal fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*): evaluation of different faecal collection methods. *Aquaculture*, 169: 195-210.
- Thorpe, J.; Beal, J.D. 2001. Vegetable protein meals and the effects of enzymes. In: Bedford, M.R.; Partridge, G.G. (Ed). *Enzymes in farm animal nutrition*. CAB International, UK. p. 125-143.
- Tidwell, J.H.; Allan, G.A. 2001. Fish as food: aquaculture's contribution. *European Molecular Biology Organization reports* 2(11): 958-963.
- Vandenberg, G.W.; De La Noue, J. 2001. Apparent digestibility comparison in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) assessed using three methods of faeces collection and three digestibility markers. *Aquaculture Nutrition* 7: 237-245.
- Vens-Cappell, B. 1985. Methodological studies on digestion in trout. 1. Reliability of digestion coefficients in relation to methods for faeces collection. *Aquacultural Engineering* 4:33-49.
- Watanabe, T. 2002. Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Science* 68: 242-252.
- Watanabe, W.O.; Losordo, T.M.; Fitzsimmons, K.; Hanley, F. 2002. Tilapia Production Systems in the Americas: Technological Advances, Trends, and Challenges. *Reviews in Fisheries Science* 10: 465-498.
- Zar, J. H. 1996. *Biostatistical analysis*. 3^o ed. Prentice-Hall, Englewood Clifes, NJ. 662p.