



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Efeitos da suplementação enzimática na dieta de juvenis de pampo
Trachinotus marginatus (Cuvier, 1832)

CLEBER DOS SANTOS SIMIÃO

FURG
Rio Grande, RS
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE - FURG

Programa de Pós Graduação em Aquicultura

Dissertação de Mestrado

Efeitos da suplementação enzimática na dieta de juvenis de pampo

***Trachinotus marginatus* (Cuvier, 1832)**

CLEBER DOS SANTOS SIMIÃO

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
mestre em Aquicultura no Programa de
Pós Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal do Rio Grande**

Orientador: Marcelo Borges Tesser

Rio Grande, RS

Fevereiro de 2017

Ata de aprovação

Ficha catalográfica

S589e Simião, Cleber dos Santos.
Efeitos da suplementação enzimática na dieta de juvenis de pampo
Trachinotus marginatus (Cuvier, 1832) / Cleber dos Santos Simião. –
2017.
45 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS,
2016.

Orientador: Dr. Marcelo Borges Tesser.

1. Carboidratos 2. Enzimas 3. Nutrição de peixes 4. Pampo
Trachinotus marginatus I. Tesser, Marcelo Borges II. Título.

CDU 639.3

Catálogo na Fonte: Bibliotecário Me. João Paulo Borges da Silveira CRB 10/2130

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	VI
AGRADECIMENTOS	VII
RESUMO GERAL	VIII
GENERAL ABSTRACT.....	IX
INTRODUÇÃO GERAL	10
Pampo prateado <i>Trachinotus marginatus</i> (Cuvier, 1832)	10
Alimentação de organismos aquáticos.....	12
O uso de proteína vegetal na dieta de peixes.....	12
Fatores antinutricionais presentes nos vegetais.....	13
Polissacarídeos não amiláceos	14
Uso de enzimas exógenas na nutrição de organismos aquáticos	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
OBJETIVOS	22
Objetivo geral	22
Objetivos específicos	22
CAPÍTULO I	23
Efeitos da suplementação de complexo enzimático sobre o crescimento e alterações digestivas de juvenis de pampo <i>Trachinotus marginatus</i> (Cuvier, 1832).....	23
Abstract.....	24
1. Introdução.....	25
2. Material e métodos	27
3. Resultados	32
4. Discussão	37
5. Referências bibliográficas.....	39
ANEXO I.....	45
ANEXO II.....	46

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha família que amo tanto, minha esposa Leila Mara que tanto me apoia e conforta, a meus filhos Felipe Emanuel e Cleber Filho que enchem meus dias com tanta ternura e a meus pais Ademir e Maria da Penha que com seu apoio tanto me ajudam.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela minha vida e por ter me dado capacidade, sabedoria e a oportunidade de fazer esse mestrado.

A minha família, pelo apoio incondicional, paciência e perseverança nesse projeto.

A CAPES pela bolsa de mestrado, que me possibilitou dedicar-me exclusivamente ao programa, sendo de vital importância para o alcance dos resultados desse trabalho.

Ao CNPq pelo apoio ao financiamento desta pesquisa.

Ao programa de Pós-graduação em Aquicultura, em nome de todos os professores e pesquisadores da Estação Marinha de Aquicultura, pela oportunidade dada e enorme aprendizagem adquirida nesse tempo de trabalho.

A meu orientador Marcelo Tesser, pelo ensinamento, dedicação e tempo a mim dado nesse tempo de estudo. Ao professor José Monserrat e Romano, pelo auxílio a minha pesquisa e ensinamento.

Aos colegas e amigos da EMA, que em tantos momentos estiveram comigo, me ajudando e compartilhando dos meus dias.

RESUMO GERAL

É crescente o uso de ingredientes vegetais em substituição à farinha de peixe, no entanto sua digestão e absorção são dificultadas pela presença de fatores antinutricionais, como as fibras estruturais que compõem a parede celular vegetal e o ácido fítico. A inclusão de enzimas exógenas nas dietas é uma alternativa para se quebrar as cadeias de ligações carbônicas dos ingredientes vegetais, deixando-os disponíveis para a digestão e absorção, obtendo melhor uso dos nutrientes vegetais. Assim, o objetivo do presente trabalho foi de avaliar os efeitos da inclusão de um complexo enzimático de carboidrases, proteases e fitase sobre a digestão e absorção de nutrientes, desempenho de crescimento e possíveis alterações morfológicas do fígado e do intestino de juvenis de pampo prateado, *Trachinotus marginatus*. O experimento baseou-se na oferta de seis dietas com níveis crescentes do complexo enzimático Rovabio® Max AP (0, 25, 50, 100, 250 e 500 mg kg⁻¹). Foram estocados 270 juvenis de pampo (1,0 ± 0.1 g) em 18 tanques de 40 L. A alimentação foi ofertada quatro vezes ao dia, até saciedade aparente, durante 80 dias. Os resultados do experimento mostraram que os peixes dos tratamentos com 100, 250 e 500 mg de enzimas obtiveram maior desempenho de crescimento entre os tratamentos. Foi observado, nos cortes histológicos do fígado, maior deposição lipídica nos peixes dos tratamentos T250 e T500. Não foi observada alteração morfológica intestinal entre os peixes dos diferentes tratamentos. O perfil bioquímico do fígado não apresentou diferença significativa para a concentração de glicogênio entre os tratamentos, enquanto que o nível de triglicerídeo foi significativamente maior nos tratamentos T250 e T500. O presente estudo demonstra que a suplementação de 100 mg de enzimas é o nível enzimático mais indicado para dietas de juvenis de pampo prateado, proporcionando melhora no desempenho de crescimento e pouca alteração na morfologia do fígado.

Palavras chave: Carboidratos, enzimas exógenas, nutrição de pampo.

GENERAL ABSTRACT

The use of vegetable ingredients in substitution of fish meal is increasing, however its digestion and absorption are hampered by the presence of antinutritional factors, such as the structural fibers that make up the plant cell wall and phytic acid. The inclusion of exogenous enzymes in the diets is an alternative to break the chains of carbonic bonds of the plant ingredients that are complexed, leaving them available for digestion and absorption in simple forms, having a better use of plant nutrients. The objective of the present work was to evaluate the effects of the inclusion of an enzymatic complex of carbohydrases, proteases and phytase on the digestion and absorption of nutrients, growth performance and possible morphological alterations of the liver and intestine of juveniles of the Plata pompanos, *Trachinotus marginatus*. The present experiment was based on the supply of six diets with increasing levels of the enzymatic complex Rovabio® Max AP (0, 25, 50, 100, 250 and 500 mg kg⁻¹). 270 juvenile pompanos (1,0 ± 0.1 gram) were stored in 18 tanks of the 40 L. Feeding was given four times a day, until apparent satiety, for 80 days. The results of the experiment showed that fish from the treatments with 100, 250 and 500 mg of enzymes obtained a higher growth performance between the treatments. In the histological sections of the liver, it was observed a higher lipid deposition in the fish of the treatments T250 and T500. No intestinal morphological alterations were observed between treatments. The biochemical profile of the liver did not present a significant difference for the glycogen concentration between the treatments, whereas the triglyceride level was significantly higher in the treatments T250 and T500. The present study demonstrate that the supplementation of 100 mg of enzyme prove to be the most appropriate enzymatic level for diets of juveniles of Plata pompanos, providing improvement in growth performance and little change in liver morphology.

Keywords: Carbohydrates, exogenous enzymes, pompanos nutrition.

INTRODUÇÃO GERAL

A atividade de pesca e aquicultura juntas produziram 167,2 milhões de toneladas de pescado em 2014, sendo um aumento de 4,3 milhões de toneladas em relação ao ano de 2013. A contribuição da aquicultura chegou a 44,1% do valor total de pescado produzido no mundo, representando um aumento de 4,1% em quatro anos em relação à produção da atividade pesqueira. A aquicultura vem se tornando cada vez mais responsável pelo aumento do fornecimento de pescado para o consumo humano, saindo de 7% em 1974 para 34% em 2004, chegando aos 44% atuais (FAO, 2016).

A aquicultura brasileira produziu em 2014 um total de 562,5 mil toneladas de pescado (IBGE, 2014), ficando no 14º lugar no ranking dos países produtores (FAO, 2016). Sendo a participação da aquicultura marinha de apenas 87,2 mil toneladas desse total. A aquicultura marinha brasileira se restringe basicamente a atividade de carcinicultura e malacocultura, com uma produção total de 65,1 e 22,1 mil toneladas em 2014, respectivamente (IBGE, 2014). O que demonstra que a piscicultura marinha no Brasil é atualmente inexpressiva.

As condições ambientais brasileiras favorece a implementação da atividade da aquicultura marinha, pela sua grande extensão litorânea (7.367 Km) (IBGE, 2017), condições climáticas e hidrográficas variada, o que possibilita ter uma fauna com muitas espécies aquáticas (Machado et al, 2008). No entanto, a atividade da piscicultura marinha no Brasil ainda vive em fase inicial, apresentando ter pouca experiência no setor, no qual se destaca apenas a atividade com o bijupirá *Rachycentron canadum*, que tem apresentado resultados satisfatórios na criação (Cavalli et al, 2011). É importante destacar, que assim como o bijupirá, outras espécies da ictiofauna demonstram potencial para piscicultura marinha, como a garoupa verdadeira (*Epinephelus marginatus*), o robalo flecha (*Centropomus undecimalis*), o linguado (*Paralichthys orbignyanus*), e o pampo (*Trachinotus marginatus*) entre outras (Baldisserotto & Gomes, 2013).

Pampo prateado *Trachinotus marginatus* (Cuvier, 1832)

O pampo prateado *Trachinotus marginatus*, é um peixe carnívoro endêmico do Oceano Atlântico Sul Ocidental, e habita as águas costeiras e estuarinas (Fisher et al.,

2004). Na fase juvenil, é encontrado na zona de arrebentação das praias do litoral do Rio Grande do Sul, com maior quantidade nos meses de dezembro a fevereiro (Lima & Vieira, 2009). Nesta fase se alimenta principalmente de crustáceos (Monteiro-Neto & Cunha 1990), passando a consumir invertebrados de pequeno porte (moluscos e poliquetas) e juvenis de outros peixes, a medida que crescem (Monteiro-Neto & Cunha 1990; Fisher et al., 2004)

Quando adulto podem ser encontrados em águas mais profundas, em uma distribuição que vai desde o Rio de Janeiro (Brasil) ao Uruguai (Menezes & Figueiredo, 1980). A primeira maturação sexual do pampo é estimada em 187,2 mm para os machos e 254,9 para as fêmeas, seu período reprodutivo é entre a primavera e verão, com desova total (Lemos et al., 2011).

Os peixes do gênero *Trachinotus* são peixes com potencial para uso na aquicultura, apresentando características biológicas de tolerância a condições ambientais extremas e rápido crescimento (Jory et al., 1985). O pampo prateado (*Trachinotus marginatus*) tem boa tolerância a uma ampla faixa de salinidade, com uma amplitude de variação de 7‰ a 58 ‰ (Sampaio et al. 2003). Apresenta alta tolerância a amônia tóxica e nitrito, suportando concentrações de até 1,87 mg/L e 116,68 mg/L, respectivamente (Costa et al., 2008), e um ponto isosmótico de 13‰, com melhor crescimento em salinidade de 3 a 12‰ (Abou Anni, 2016).

Através de estudos nutricionais, se verificou que o pampo apresenta melhor desempenho com o nível proteico de 43% (Silva et al., 2015). Onde que até 75% da farinha de peixe presente na dieta pode ser substituída por concentrado proteico de soja, sem que aja prejuízo para o desempenho de crescimento (Silva, 2014). Sua exigência de aminoácidos essenciais na dieta é respectivamente de: 4,01 para Arginina; 1,29 para Histidina; 1,78 para Isoleucina; 4,27 para Leucina; 4,80 para Lisina; 2,33 para Metionina + Cisteína; 3,99 para Fenilalanina + Tirosina; 2,42 para Treonina; 0,63 para Triptofano; e de 2,08 para Valina (Tesser et al., 2014). A oferta de alimento diária pode ser dividida e dada em até oito vezes ao dia (Cunha et al., 2009).

Alimentação de organismos aquáticos

Embora se tenha diminuído os níveis de inclusão da farinha e óleo de peixe nas dietas aquícolas, o seu uso continua aumentando (Tacon & Metian, 2008), devido ao crescimento contínuo da atividade (FAO, 2016). Dessa forma, a alimentação dos organismos aquáticos poderá ser um obstáculo para o contínuo crescimento global da atividade, tornando-a insustentável (EP, 2004). Na busca por fontes alternativas de proteína, os ingredientes vegetais têm sido amplamente estudados e empregados na aquicultura nas últimas décadas (Bostocket al., 2010), de modo que, atualmente, algumas dietas são compostas principalmente pelo farelo de soja (Choct, 2015).

Uma questão relevante ao uso de ingredientes vegetais na dieta de peixes, é que assim como o farelo de soja, que contém quase tanto carboidratos como proteínas, todos os vegetais têm em sua composição grandes concentrações de carboidratos (Choct et al., 2010). Quando presente na ração os carboidratos aumentam a retenção de proteínas e lipídeos, diminuição da utilização da proteína como energia, possibilidade de formular dietas eficientes com menor custo; e auxilia a consolidação, estabilidade e fluutuabilidade dos pellets de ração (Kamalam et al, 2016). No entanto, embora seja possível formular dietas que atendam as exigências nutricionais dos organismos aquáticos com os ingredientes vegetais (Gatlin et al., 2007), esses apresentam uma série de fatores antinutricionais que limitam seu uso (Francis et al., 2001; Drew et al., 2007).

O uso de proteína vegetal na dieta de peixes

Diversas fontes de proteína vegetal com potencial na aquicultura têm sido estudadas (Drew et al., 2007; Couto et al., 2016; Gisbert et al., 2016; Torrecillas et al., 2017; Wang et al., 2017). Ingredientes vegetais como o farelo de soja, junto com a cevada, sementes de algodão e canola, já são amplamente utilizados na alimentação de organismos aquáticos (Gatlin et al., 2007).

A adição de proteína vegetal, na dieta de organismos aquáticos, possibilitou a diminuição do uso de farinha de peixe principalmente nas rações de peixes herbívoros e onívoros, (Bostocket al., 2010; Tacon & Metian, 2008). Essas espécies apresentam maior capacidade fisiológica de digerirem carboidratos em relação aos carnívoros, os

quais possuem o trato digestório curto devido ao tipo de alimento que consomem (Gonçalves et al., 2012). Além disso, uma ração composta somente por ingredientes vegetais apresenta baixa palatabilidade para os carnívoros, por isso o uso dessas fontes proteicas é limitado (Tacon & Metian, 2008; Kasumyan & Doving, 2003).

Embora já se tenha demonstrado a capacidade de ingredientes vegetais em substituir parte da farinha de peixes, seu uso é limitado por fatores biológicos, ambientais e nutricionais dos ingredientes (Kamalam et al., 2016). Um dos mais importantes fatores nos vegetais são os antinutricionais, tais como os inibidores de proteases, os carboidratos não digestíveis, as saponinas, as lectinas, o fitato e as possíveis proteínas alergênicas que interferem a digestão e absorção de nutrientes (Krogdahl et al., 2010).

Fatores antinutricionais presentes nos vegetais

Diversas substâncias, que são endógenas dos vegetais, quando presentes na dieta podem produzir efeitos negativos à sanidade e balanço nutricional (Drew et al., 2007). Os efeitos mais comuns da presença de fatores antinutricionais, na dieta de organismos aquáticos, são os distúrbios do processo digestivo e crescimento, diminuição da eficiência alimentar, hipertrofia pancreática, hipoglicemia, disfunção do fígado e imune supressão (NRC, 2011).

O farelo de soja, que está presente na dieta da maioria dos organismos aquáticos (Choct, 2015), tem em sua composição inibidores de proteases, ácido fítico, lectinas, saponinas e alérgenos (Francis et al., 2001). A presença destes fatores antinutricionais pode ser eliminada ou ter sua atividade biológica reduzida através de processos físicos, químicos ou biológicos (Denstadli et al., 2007; Fuh & Chiang, 2001; Krogdahl et al., 2010). Substâncias inibidoras de enzimas, por exemplo, podem ser desnaturadas por tratamento de calor, extração a álcool ou fermentação (NRC, 2011), melhorando a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta (Gatlin et al., 2007). O calor, além de diminuir efeitos dos inibidores de protease, também inclui a diminuição da presença do fitato, lectinas e antivitaminicos (Francis et al., 2001).

Polissacarídeos não amiláceos

Os polissacarídeos não amiláceos (PNAs) estão presentes nas plantas, como componentes estruturais da parede celular (Caprita et al., 2010). São formados pela composição de um, dois ou mais monossacarídeos diferentes, ligados entre si em ligações beta glicosídicas, formando longas cadeias, lineares ou ramificadas (Choct, 2015). Os principais componentes que formam os PNAs são a celulose que é insolúvel em água, e hemicelulose (polímeros não celulósicos) e pectinas que são solúveis em água (Choct et al., 2010). Os peixes não possuem enzimas endógenas para digerirem a celulose, o que a torna sem valor nutricional. A hemicelulose e as pectinas podem aumentar a viscosidade da dieta, podendo causar lentidão no esvaziamento gástrico, alterações na morfologia e fisiologia do trato digestivo e alteração na absorção de nutrientes (Sinha et al., 2011).

Uso de enzimas exógenas na nutrição de organismos aquáticos

Nas dietas de organismos aquáticos atualmente são utilizadas rações com componentes de pouca digestibilidade ou que podem causar efeitos danosos ao organismo, como fatores antinutricionais (NRC, 2011). Uma solução para isso é o uso de aditivos enzimáticos, cuja função é hidrolisar estes compostos com a finalidade de maximizar o aproveitamento dos nutrientes presentes nas dietas oferecidas (Bedford, 2000).

Estudos testando o uso de carboidrases em dietas a base de proteína vegetal, com altos níveis de PNAs, tem mostrado que a adição destas enzimas, melhora a digestibilidade e utilização dos nutrientes (Castillo & Gatlin, 2015). Dentre as enzimas que compõe as carboidrases, a xilanase (endo-1,4- β -xilanase) e glucanase (endo-1,3(4)- β -glucanase) são as mais estudadas (Adeola & Cowieson, 2011).

O ácido fítico presente nos vegetais não é uma boa fonte de fósforo para animais não ruminantes, particularmente para animais jovens que aparentemente tem uma menor habilidade para utilizar este nutriente (Bedford, 2000). A suplementação de fitase na dieta possibilita ocorrer a desfosforilação completa do fitato em inositol e seis fósforos livres (Adeola & Cowieson, 2011). Diversos trabalhos tem mostrado, que o uso da fitase na dieta de peixes, melhora na digestibilidade de nutrientes, performance de

crescimento e eficiência alimentar (Danwitz et al., 2016; Hien et al., 2015; Lewandowski et al., 2017 ; Vandenberg et al., 2011;Zhu et al., 2014).

O uso de múltiplas enzimas (carboidrases, fitase e proteases), que atuam sobre diferentes efeitos antinutricionais, objetiva em ter maximização dos benefícios proporcionados pela suplementação enzimática (Adeola, 2011). Na dieta de peixes, o uso combinado de enzimas tem demonstrado melhoras na redução da presença dos PNAs, que induzem o aumento da viscosidade na dieta (Castillo & Gatlin, 2015), melhora no crescimento e utilização da dieta (Zamini et al., 2014), melhora na digestibilidade aparente de nutrientes (Dalsgaard et al., 2012) e melhora no ganho de peso (Ghomi et al., 2012).

O complexo enzimático Rovabio® Max AP é uma combinação de enzimas polissacaridases não amiláceas, pectinases, fitase, proteases e α -galactosidade. As enzimas polissacaridases não amiláceas são compostas por xilanases (endo-1,4 p-xilanase, a-arabinofuranosidase, β -xilosidase, feruloil esterase, endo-1,5 a-arabinase), β -glucanases (endo- 1,4-glucanase [celulase], celobio-hidrolase, β -glucosidase), enzimas pectinases (pectinase, poligalacturonase, pectinesterase, rhamnogalacturonase) e enzimas mananases (endo-1,4 p-mananase). A Fitase presente é a 6-fitase. As enzimas proteases presentes são as aspartato protease e metaloprotease.

Este complexo enzimática foi utilizado por Ramos et al. (2017), em dietas para *Mugil liza*. Seu trabalho demonstrou que mesmo com a suplementação de níveis baixos de enzimas (50 mg/Kg), é possível reduzir os danos intestinais causados pela dieta à base de farelo de soja. Esse resultado foi obtido pela possível melhora na digestibilidade da dieta. Melhora no desempenho de crescimento e diminuição de custos na fase de crescimento e terminação de suínos, utilizando enzimas Rovabio, foram obtidas por Liu et al. (2010). Dessa maneira é possível que as enzimas Rovabio, além de melhora a digestibilidade, pode também proporcionar a melhora no crescimento e ganho de peso de peixes.

Diante disso, a proposta do presente trabalho é avaliar os efeitos no desempenho zootécnico, morfologia do fígado e intestino, parâmetros bioquímicos do fígado e composição de carcaça do pampo prateado *Trachinotus marginatus*, alimentado com a suplementação de diferentes níveis do complexo enzimático Rovabio® Max AP na dieta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU ANNI, I.S., BIANCHINI, A., BARCAROLLI, I.F., VARELA JUNIOR, A.S., ROBALDO, R.B., TESSER, M.B., SAMPAIO, L.A., 2016. Salinity influence on growth, osmoregulation and energy turnover in juvenile pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832. *Aquaculture* 455, 63-72.
- ACEB, 2014. Associação Cultural e Educacional Brasil. Primeiro Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura. Brasil. 136 pp.
- ADEOLA, O., COWIESON, A.J., 2011. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *J. Anim. Sci.* 89, 3189-3218.
- ASSAD, T. L., BURSZTYN, M., 2000. Aquicultura Sustentável. In: *Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília: CNPq. Ministério da Ciência e Tecnologia. 399p.
- BALDISSEROTO, B., GOMES, L.C., 2013. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Editora UFSM, Santa Maria 2ª Ed. revista e ampliada. 608p.
- BEDFORD, M.R., 2000. Exogenous enzymes in monogastric nutrition—their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology* 86, 1-13.
- BOSTOCK J., MCANDREW, B., RICHARDS, R., JAUNCEY, K., TELFER, T., LORENZEN, K., LITTLE, DAVID., ROSS, L., HANDISYDE, N., GATWARD, I., CORNER, R., 2010. Aquaculture: global status and trends – Review. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365, 2897-2912.
- CAPRITA, R., CAPRITA, A., JULEAN, C., 2010. Biochemical aspects of non-starch polysaccharides. *Anim. Sci. Biotec.* 43, 368-374.
- CASTILLO, S., GATLIN, D.M., 2015. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: a review. *Aquaculture* 435, 286-292.
- CAVALLI, R.O., DOMINGUES, E.C., HAMILTON, S., 2011. Desenvolvimento da produção de peixes em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. *Rev. Bras. Zoot.* 40, 155-164.
- CHOCT, M., DERSJANT-LI, Y., MCLEISH, J., PEISKER, M., 2010. A review of digestion, nutritive and anti-nutritive effects in pigs and poultry. *J. Anim. Sci.* 23, 1386-1398.
- CHOCT, M., 2015. Feed non-starch polysaccharides for monogastric animals: classification and function. *Anim. Prod. Sci.* 55, 1360-1366.

- COSTA, L.F., MIRANDA-FILHO, K.C., SEVERO, M.P., SAMPAIO, L.A. 2008. Tolerance of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at different salinity levels. *Aquaculture*. 285, 270-272.
- COUTO, A., BARROSO, C., GUERREIRO, I., POUSÃO-FERREIRA, P., MATOS, E., PERES, H., OLIVAS-TELES, A., ENES, P., 2016. Carob seed germ meal in diets for meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles: Growth, digestive enzymes, intermediary metabolism, liver and gut histology. *Aquaculture* 451, 396-404.
- CUNHA, V.L., RODRIGUES, R.V., OKAMOTO, M.H., SAMPAIO, L.A. 2009. Consumo de oxigênio pós-prandial de juvenis do pampo *Trachinotus marginatus*. *Ciência Rural*. 39, 1257-1259.
- DALSGAARD, J., VERLHAC, V., HJERMITSLEV, N.H., EKMANN, K.S., FISCHER, M., KLAUSEN, M., PEDERSEN, P.B., 2012. Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. *Animal Feed Science and Technology* 171, 181-191.
- DANWITZ, A.V., BUSSEL, C.G.J., KLATT, S.F., SCHULZ, C., 2016. Dietary phytase supplementation in rapeseed protein based diets influences growth performance, digestibility and nutrient utilization in turbot (*Psetta maxima* L.). *Aquaculture* 450, 405-411.
- DENSTADLI, V., STOREBAKKEN, T., SVIHUS, B., SKREDE, A., 2007. A comparison of online phytase pre-treatment of vegetable feed ingredients and phytase coating in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in cold water. *Aquaculture* 269, 414-426.
- DREW, M.D., BORGESON, T.L., THIESSEN, D.L., 2007. A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 138, 118-136.
- EP, 2004. European Parliament. The Fish Meal and Fish Oil Industry its Role in the Common Fisheries Policy. Luxembourg. 174 pp.
- FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 200 pp.
- FISHER, L. G., PEREIRA, L.E.D., VIEIRA, J.P. 2004. Peixes estuarinos e costeiros. 2Ed. Rio Grande, 130p.

- FRANCIS, G., MAKKAR, H.P.S., BECHER, K., 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197-227.
- FUH, W.S., CHIANG, B.H., 2001. Dephytinisation of rice bran and manufacturing a new food ingredient. *J. Sci. Food Agric.* 81, 1419–1425.
- GATLIN III, D.M., BARROWS, F.T., BROWN, P., DABROWSKI, K., GAYLORD, G., HARDY, R., HERMAN, E., HU, G., KROGDAHL, A., NELSON, R., OVERTURF, K., RUST, M., SEALY, W., SKONBERG, D., SOUZA, E.J., STONE, D., WILSON, R., WURTELE, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquacult. Res.* 38, 551–579.
- GHOMI, M.R., SHAHRIARI, R., LANGROUDI, H.F., NIKOO, M., ELERT, E.V., 2012. Effects of exogenous dietary enzyme on growth, body composition, and fatty acid profiles of cultured great sturgeon *Huso huso* fingerlings. *Aquacult. Int.* 20, 249-254.
- GISBERT, E., MONZANZADEH, M.T., KOTZAMANIS, Y., ESTÉVEZ, A., 2016. Weaning wild flathead grey mullet (*Mugil cephalus*) fry with diets with different levels of fish meal substitution. *Aquaculture* 462, 92-100.
- GONÇALVES, L.U., RODRIGUES, A.P.O, MORO, G.V., CARGNIN-FERREIRA, E., CYRINO, J.E.P., 2012. Morfologia e fisiologia do sistema digestório de peixes, In: Fracalossi, D.M., Cyrino, J.E.P. (Eds.), *Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*. Copiart, Florianópolis, pp. 9–36.
- HIEN, T.T.T., BE, T.T., LEE, C.M., BENGTON, D.A., 2015. Development of formulated diets for snakehead (*Channa striata* and *Channa micropeltes*): Can phytase and taurine supplementation increase use of soybean meal to replace fish meal?. *Aquaculture* 448, 334-340.
- IBGE, 2014. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção da Pecuária Municipal*. Brasil. Vol. 42, 36 pp.
- IBGE, 2017. Extensão e posição do litoral brasileiro. Disponível em: <http://teen.ibge.gov.br/mao-na-roda/posicao-e-extensao.html>. Acessado em: 03 de março de 2017.
- JORY, E.D., IVERSEN E.S., LEWIS, R.H. 1985. Culture of the fishes of the genus *Trachinotus* (Carangidae) in the Western Atlantic: prospects and problems. *J. World Mar. Soc.* 16, 87-94.

- KAMALAM, B.S., MEDALE, F., PANSERAT, S., 2017. Utilization of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture* 467, 3-27.
- KASUMYAN, A.O., DOVING, K.B., 2003. Taste preferences in fishes. *Fish & Fisheries* 4, 289–347.
- KROGDAHL, A., PENN, M., THORSEN, J., REFSTIE, S., BAKKE, A.M., 2010. Important antinutrientes in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquacult. Res.* 41, 333-344.
- LEMOS V.M, VARELA JUNIOR A.S., VELASCO G., VIEIRA J.P. 2011. The reproductive biology of Plata pompano, *Trachinotus marginatus* (Teleostei: Carangidae), in southern Brazil. *Zoologia* 28, 603-609.
- LEWANDOWSKI, V., FEIDEN, A., SIGNOR, A., BITTENCOURT, F., MORO, E.B., PESSINI, J.E., BOSCOLO, W.R., 2017. Digestibility of vegetal energetic ingredients supplemented with phytase for silver catfish (*Rhandia voulezi*). *Aquaculture* 467, 71-75.
- LIMA, M.S.P., VIEIRA, J.P. 2009. Variação espaço-temporal da ictiofauna da zona de arrebentação da praia do Cassino, Rio Grande do Sul, Brasil. *Zoologia* 26, 499-510.
- LIU, C.Y., LIU, Y.G., MORI, A., 2010. Enzima NSP melhora o desempenho e diminui custos de alimentação de suínos nas fases de crescimento e terminação. Disponível em: <http://pt.engormix.com/suinocultura/artigos/enzima-nsp-suinos-t36909.htm>. Acessado em: 03 de março de 2017.
- MACHADO, A.B.M., DRUMMOND, G.M., PAGLIA, A.P., 2008. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. V. II. Brasília, Brasil. p. 908.
- MENEZES, N.A. & FIGUEIREDO, J.L. 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. Teleostei IV. Museu de Zoologia USP, São Paulo. 96 p
- MONTEIRO-NETO, C.& CUNHA, L.P.R.1990. Seasonal and ontogenetic variations in food habits of juvenile *Trachinotus marginatus* Cuvier, 1832 (Teleostei, Carangidae) in the surf zone of Cassino Beach, RS, Brazil. *Atlântica*, 12, 45-54.
- N.R.C., 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academy Press, Washington, DC.
- SAMPAIO, L.A., TESSER, M.B., BURKERT, D., 2003. Tolerância de juvenis do pampo *Trachinotus marginatus* (Teleostei, Carangidae) ao choque agudo de salinidade em laboratório. *Ciência Rural* 33, 757-761.

- SINHA, A.K., KUMAR, V., MAKKAR, H.P.S., BOECK, G., BECHER, K., 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition – A review. *Food Chem.* 127, 1409-1426.
- SILVA, E.M.. Avaliação da necessidade proteica e substituição da farinha de peixe por concentrado proteico de soja em rações para o pampo prateado *Trachinotus marginatus*: Viabilidade da substituição parcial e total da farinha de peixe por concentrado proteico de soja em rações experimentais para juvenis de Pampo prateado (*Trachinotus marginatus*). 2014. 86 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul. 2014.
- SILVA, E.M., MONSERRAT, J.M., SAMPAIO, L.A., TESSER, M.B., 2015. Crescimento e metabolismo do nitrogênio em juvenis de *Trachinotus marginatus* alimentados com diferentes níveis proteicos. *Arq. Bras. Medic. Veter. Zoot.* 67, 131-139.
- TACON, A.G.J., METIAN, M., 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 146-158.
- TESSER, M.B., SILVA, E.M., SAMPAIO, L.A., 2014. Whole-body and muscle amino acid composition of Plata pompano (*Trachinotus marginatus*) and prediction of dietary essential amino acid requirements. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 27, 299-305.
- TORRECILLAS, S., MOMPTEL, D., CABALLERO, M.J., MONTERO, D., MERRIFIELD, D., RODILES, A., ROBAINA, L., ZAMORANO, M.J., KARALAZOS, V., KAUSHIK, S., IZQUIERDO, M., 2017. Effect of fishmeal and fish oil replacement by vegetable meals and oils on gut health of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 468, 386-398.
- VANDENBERG, G.W., SCOTT, S.L., SARKER, P.K., DALLAIRE, V., NOÛE, J., 2011. Encapsulation of microbial phytase: Effects on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Anim. Feed Sci. Tech.* 169, 230-243.
- WANG, Y.R., WANG, L., ZHANG, C.X., SONG, K., 2017. Effects of substituting fishmeal with soybean meal on growth performance and intestinal morphology in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquac. Rep.* 5, 52-57.
- ZAMINI, A., KANANI, H., ESMAEILI, A., RAMEZANI, S., ZORIEZAHRA, S., 2014. Effects of two dietary exogenous multi-enzyme supplementation,

Natuzyme® and beta-mannanase (Hemicell®), on growth and blood parameters of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). *Comp. Clin. Pathol.* 23, 187–192.

ZHU, Y., QIU, X., DING, Q., DUAN, M., WANG, C., 2014. Combined effects of dietary phytase and organic acid on growth and phosphorus utilization of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture* 430, 1-8.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar os efeitos da inclusão de níveis de um complexo enzimático contendo carboidrases, proteases e fitase em dietas a base de ingredientes vegetais no desempenho de juvenis de pampo (*Trachinotus marginatus*).

Objetivos específicos

Avaliar o desempenho zootécnico de juvenis de pampo alimentados com dietas suplementadas com um complexo enzimático;

Analisar alterações no glicogênio, triglicerídeo e colesterol hepático de juvenis de pampo, que poderá ocorrer pela suplementação enzimática na dieta;

Avaliar alterações na morfologia do intestino e fígado dos juvenis de pampo em função dos tratamentos;

Avaliar alterações nos níveis de deposição de cálcio e fósforo total nos ossos do pampo em função dos tratamentos.

CAPÍTULO I

Efeitos da suplementação de complexo enzimático sobre o crescimento e alterações digestivas de juvenis de pampo *Trachinotus marginatus* (Cuvier, 1832)

A ser submetido para Anais da Academia Brasileira de Ciências

Leonardo R. V. Ramos, Luis A. Romano, José M. Monserrat e Marcelo B. Tesser

Efeitos da suplementação de complexo enzimático sobre o crescimento e alterações digestivas em juvenis de pampo *Trachinotus marginatus* (Cuvier, 1832)

C. S. Simião¹, L. R. V. Ramos¹, L. A. Romano^{1,2}, J. M. Monserrat^{1,3}, M. B. Tesser^{1,4}

¹ Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brasil

² Laboratório de Patologia e Imunologia de Organismos Aquáticos, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brasil

³ Laboratório de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brasil

⁴ Laboratório de Nutrição e Alimentação de Organismos Aquáticos, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brasil

Abstract

The inclusion of enzymes in the diets is an alternative to reduce the antinutritional factors of the vegetal ingredients leaving the nutrients available for digestion and absorption with consequent better utilization. The objective of the present work was to evaluate the effects of the inclusion of levels of an enzymatic complex based on carbohydrases, proteases and phytase on the growth performance, hepatic metabolism and intestinal and hepatic morphological alterations of juveniles of the Plata pompano *Trachinotus marginatus*. Five diets were offered with increasing levels of the enzymatic complex Rovabio® Max AP (0, 25, 50, 100, 250 e 500 mg kg⁻¹). The results showed a better growth performance in treatments with 100, 250 and 500 mg of enzymes. There was a greater accumulation of triglycerides in the fish of the treatments with 250 and 500 mg of enzymes. The body composition and glycogen deposition were not altered by enzymatic supplementation. Treatments with 100 mg of enzyme supplementation improve growth performance without causing major changes in liver morphology.

1. Introdução

A farinha de peixe é amplamente utilizada em dietas para organismos aquáticos, tanto pelo seu valor proteico, como também por conter grande parte dos nutrientes necessários aos peixes (Tacon & Metian, 2008, Bostock et al., 2010).

Uma alternativa é a substituição da farinha de peixe por ingredientes de origem vegetal tais como farelo de soja, o qual, atualmente, são amplamente adicionados na composição das dietas para organismos aquáticos (Silva et al., 2007; Dalsgaard et al., 2012). Embora muito promissora a contribuição dos ingredientes de origem vegetal para a diminuição do uso da farinha de peixes, seu uso apresenta limitações quanto a sua utilização como principal fonte proteica pelos peixes (Bedford, 2000; NRC, 2011; Fracalossi et al., 2013).

De maneira geral, peixes herbívoros e onívoros têm maior capacidade para digerir e absorver os nutrientes de ingredientes vegetais, enquanto os peixes carnívoros apresentam limitação quanto a sua capacidade de digestão (Seixas Filho, 2003; Stech et al., 2009). A deficiência dos peixes carnívoros em digerir carboidratos, perda da capacidade da ação enzimática no substrato e diminuição da absorção de proteínas e lipídeos, fazendo com que a maior parte dos nutrientes das rações seja excretada no meio aquático (NRC, 2011; Fracalossi & Cyrino, 2013). Por isso, a adição de enzimas exógenas na ração, que atuam sobre os carboidratos e nutrientes não digeríveis, melhora a digestibilidade, a absorção e o desempenho dos peixes, possibilitando amenizar os compostos metabólitos excretados ao meio (Bedford, 2000; Stech et al., 2009; Adeola et al., 2011; Cavalheiro et al., 2014).

Dalsgaard et al. (2012) utilizando β -glucanase e xilanase e protease, separadamente ou em combinação, na alimentação de juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), observaram que as enzimas β -glucanase e protease melhoraram significativamente a digestibilidade aparente de todos os nutrientes presentes na dieta em que o farelo de soja foi incluído. Além de efeitos positivos na digestibilidade aparente de lipídeos na dieta contendo farelo de girassol (β -glucanase), e na dieta com farelo de canola (xilanase). Em estudo com a inclusão de xilanase na dieta de carpas japonesas (*Cyprinus carpio*) com base proteica vegetal, Jiang et al. (2014) concluíram que a enzima melhorou o crescimento, aumentou a atividade enzimática intestinal e proporcionou a otimização da microflora intestinal.

Outra questão relevante, quanto ao uso de ingredientes vegetais em rações para organismos aquáticos é que, mesmo que os nutrientes estejam em níveis adequados,

esses podem apresentar baixa biodisponibilidade (Adeola & Cowieson, 2011; Benevides et al., 2011; Bedford, 2000; Castillo & Gatlin, 2015; Sinha et al., 2011). Um exemplo é o fósforo, que nos cereais e oleaginosas se encontra na forma de ácido fítico. Esse poderoso quelante deve primeiro ser hidrolisado pela enzima fitase, liberando inositol e fósforo inorgânico, para poder ser utilizado pelo organismo (Tacon, 1989; Mendonça et al., 2012; Singh & Satyanarayana, 2014).

A maioria dos peixes não possuem naturalmente esta enzima e, por isso, o fósforo não é absorvido, sendo liberado no meio ambiente pela excreta. Assim, a adição da fitase exógena na dieta pode auxiliar na quebra do ácido fítico, permitindo a absorção de seus derivados e de outros nutrientes que estiverem ligados a ele (Yoon et al., 1983; Bedford, 2000; Moura et al., 2009; Singh & Satyanarayana, 2014).

Em estudo com a inclusão de enzimas exógenas na dieta de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Adeoye et al. (2016) usando uma concentração de 300 mg/Kg de fitase, protease e carboidrases exógenas, obtiveram um aumento significativo no crescimento dos peixes, quando comparados aqueles alimentados com a dieta sem sua adição. Resultados semelhantes foram apontados por Danwitz et al. (2016) que em estudo com juvenis de turbot (*Psetta maxima*) alimentados com dietas com níveis de atividade de fitase entre 1000 e 2000 FTU/Kg, relataram melhora significativa no crescimento e no consumo de alimento dos peixes. Além disso, a adição de 2000 FTU/Kg, apresentou benefício na taxa de eficiência proteica, conversão alimentar e coeficiente de digestibilidade aparente dos peixes.

O pampo (*Trachinotus marginatus*) é um peixe com potencial para a aquicultura, devido a suas características biológicas de tolerância a condições ambientais extremas e rápido crescimento (Jory et al., 1985), e sua capacidade eurialina (Abou Anni et al., 2016). É uma espécie que tem uma distribuição geográfica que vai do Rio de Janeiro, Brasil, até o Uruguai (Menezes et al., 1980). Apresenta um hábito carnívoro e uma exigência proteica de 43% na dieta (Silva et al., 2015).

Assim, o presente trabalho objetivou avaliar o desempenho zootécnico, deposição de nutrientes na carcaça e possíveis alterações morfológicas no fígado e intestino de juvenis de pampo alimentados com rações contendo ingredientes vegetais e diferentes níveis de um complexo enzimático com carboidrases, proteases e fitase (Rovabio® Max AP), visando melhorar a digestão e absorção de nutrientes, o desempenho dos animais e sua morfologia intestinal.

2. Material e métodos

2.1. Captura e condicionamento dos animais

Foi inicialmente solicitado, junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade –ICMBio (52073-1), uma licença para captura, transporte e manutenção dos peixes a serem utilizados no experimento, assim como obtida autorização para execução do experimento junto ao Comitê de Ética – FURG (P044/2016). Todas as atividades de preparação e execução do experimento foram desenvolvidas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA), situado na Estação Marinha de Aquicultura (EMA) / FURG. A coleta dos juvenis de pampo foi realizada na praia do Cassino, no município de Rio Grande (RS), utilizando uma rede de arrasto de 2,0 m x 1,0 m e de malha de 5,0 mm, sendo prontamente transportados até a unidade laboratorial em caixas preparadas previamente para a coleta e transporte, sobre aeração constante. Uma vez no LANOA, os juvenis de pampo foram acondicionados em tanques de manutenção de 200 L para aclimação e manutenção até o início do experimento. Sendo distribuídos em uma densidade de dois peixes por litro e alimentados até a saciedade aparente, com a mesma ração a ser utilizada como controle durante o experimento (ração sem suplementação de enzimas).

Após uma semana, período de aclimação a unidade laboratorial e ao alimento, um total de 270 peixes foram pesados e distribuídos nas unidades experimentais. Para tanto, os peixes foram anestesiados com benzocaína 50 ppm, pesados e transferidos para tanques retangulares, com capacidade de 50 L, na densidade de 15 peixes por tanque. Os parâmetros de salinidade e temperatura foram mantidos em 30 ppt e 26°C, com um fotoperíodo de 14 horas claro/10 horas escuro. O experimento foi desenvolvido em um sistema de recirculação de água, composto de filtro biológico, filtro de lâmpadas UV (18 w Philips), aeração constante e skimmer. As fezes e os restos de ração foram sifonados periodicamente, sempre antecedendo aos horários de alimentação, e as perdas do volume de água foram repostas sempre que necessário. As dietas oferecidas durante o experimento foram ministradas quatro vezes ao dia (8:00, 11:00, 14:00 e 17:00 horas) até a saciedade aparente.

A temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade e pH foram aferidos diariamente. Para mensurar a salinidade foi utilizado um refratômetro (Atago[®], modelo 103, Tokyo, Japan), a temperatura e oxigênio dissolvido foram observadas com o uso de um oxímetro digital multiparâmetros (YSI 50A, Yellow Springs, OH, USA) e pH com o um

pHmetro digital ($\pm 0,01$, YSI[®]-pH100, Yellow Springs, OH, USA). As análises de amônia e nitrito foram efetuadas diariamente de acordo com a metodologia descrita pela UNESCO (1983).

O presente experimento teve uma duração de 80 dias. Ao fim do período experimental, os peixes a serem utilizados nas análises proximal, bioquímica e histológica foram eutanasiados com cloridrato de benzocaína (500 ppm), e posteriormente foi realizada a coleta de tecidos.

2.2. Preparação das rações

As dietas experimentais foram elaboradas de forma isoprotéica e isoenergéticas, com nível proteico de 41% de proteína bruta e 8% de lipídio de acordo com Silva et al. (2015) (Tabela 1). Foram formuladas cinco dietas suplementadas com 25 mg kg⁻¹ (T25), 50 mg kg⁻¹ (T50), 100 mg kg⁻¹ (T100), 250 mg kg⁻¹ (T250) e 500 mg kg⁻¹ (T500) do complexo enzimático Rovabio[®] Max AP (Castillo & Gatlin, 2015), mais uma dieta basal controle (TC), sem suplementação de enzimas. O complexo enzimático Rovabio[®] Max AP é uma combinação de carboidrases, fitase e proteases, o qual é constituído de 20 enzimas (xilanase (5), β -glucanase (5), pectinases (4), β -mananase (2), 6-phytase, β -galactosidase, aspártico-proteinase, metaloproteinase). As atividades enzimáticas das dietas foram medidas no Centro de Análise, Pesquisa e Técnica Aplicada (Adisseo, Commentry, França).

As rações experimentais foram preparadas, procedendo com a mistura dos ingredientes da menor proporção para a maior, com a adição de óleo ao final do preparo. As enzimas foram diluídas em água destilada, que posteriormente foi adicionada a ração, e depois de realizada a homogeneização completa da mescla se deu a peletização. Em seguida, as dietas foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 50°C por um período de 6 horas. Uma vez seca, as rações foram acondicionadas em freezer a -20°C, para conservação até a realização do experimento.

Tabela 1 – Formulação e composição proximal das dietas experimentais.

<i>Ingredientes (%)</i>	<i>Dietas</i>					
Farinha de Peixe						8,0
Farinha de Vísceras						15,0
Farelo de soja						40,0
Farelo de trigo						10,0
Gelatina						3,0
Amido						16,0
Óleo de peixe						7,0
Premix ¹						1,0
<i>Composição proximal (%)</i>						
Matéria Seca						94
Proteína Bruta						41
Extrato Etéreo						8
Cinza						8
ENN						34
Energia Metabolizável (MJ g ⁻¹) ²						15,53
Fósforo						1,134
Cálcio						0,97
<i>Atividade enzimática</i>						
Rovabio Max AP (mg/kg)	0	25	50	100	250	500
Xilanase (U/kg)	-	694	950	1762	4991	9240
Fitase (U/kg)	-	416	540	947	2203	4404

¹ Premix M. Cassab, SP, Brasil: Vit. A (500000 UI kg⁻¹), Vit. D3 (250000 UI kg⁻¹), Vit. E (5000 mg kg⁻¹), Vit. K3 (500 mg kg⁻¹), Vit. B1 (1000 mg kg⁻¹), Vit. B2 (1000 mg kg⁻¹), Vit. B6 (1000 mg kg⁻¹), Vit. B12 (2000 mg kg⁻¹), Niacina (2500 mg kg⁻¹), Pantotenato de cálcio (4000 mg kg⁻¹), Ácido fólico (500 mg kg⁻¹), Biotina (10 mg kg⁻¹), Vit. C (10000 mg kg⁻¹), Colina (100000mg kg⁻¹), Inositol (1000 mg kg⁻¹). Elementos traços: Selênio (30 mg kg⁻¹), Ferro (5000 mg kg⁻¹), Cobre (5000 mg kg⁻¹), manganês (5000 mg kg⁻¹), Zinco (9000 mg kg⁻¹), Cobalto (50 mg kg⁻¹), Iodo (200 mg kg⁻¹).

² Calculado a partir de valores fisiológicos padrão, em que 1 kg de carboidratos, proteínas e lipídios rende 16,7, 16,7 e 37,6 MJ, respectivamente (Garling & Wilson, 1976).

2.3. Análise proximal

Para a determinação da composição da carcaça e para certificação dos valores de composição das dietas, foi feita a análise da composição proximal segundo método AOAC (1999), no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, IO - FURG. A análise da matéria seca (MS) foi realizada em estufa a 102°C por 5 h; para cinzas (MM) as amostras sofreram uma pré-calcinação e posteriormente levadas à mufla a 600°C por 5 h. A análise de proteína bruta (PB) foi realizada de acordo a metodologia de Kjeldahl, onde ocorre à digestão previa das amostras e posteriormente a destilação e titulação do nitrogênio, multiplicando-se o resultado por 6,25. O valor de extrato etéreo (EE) foi obtido com o uso do método de extração a quente, pelo extrator de Soxhlet, utilizando-se éter de petróleo como solvente, por 5 h. Para a análise da fibra bruta (FB), foi utilizada a digestão ácida e básica da amostra por 30 min em cada digestão, seguida pela queima do resíduo em mufla a 500°C, sendo o valor de FB obtida por diferença (Silva & Queiroz, 2009).

2.4. Avaliação de desempenho Zootécnico

Para avaliar o desempenho zootécnico, ao final do experimento, foram analisados os seguintes parâmetros:

1. Conversão alimentar aparente (CAA) = ração fornecida / ganho de peso
2. Taxa de crescimento específico (TCE) = $[(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{dias de criação}] \times 100$
3. Taxa de eficiência proteica (TEP): ganho de peso (g) / proteína ingerida (g)
4. Sobrevivência (%) = $(\text{quantidade final de animais} / \text{quantidade inicial dos animais}) \times 100$.

2.5. Análises bioquímicas

Para as análises de triglicerídeos, colesterol e glicogênio no fígado, as amostras foram homogeneizadas durante 40 min em um sonicador com ácido perclórico (6%) em um volume de 7,5 vezes o peso da amostra (Láiz-Carrión et al, 2012; modificado por Zamora-Sillero et al. 2013).

Após sonicação, os homogeneizados, foram neutralizados com o mesmo volume de bicarbonato de potássio (1 M), e centrifugados (13 000 g durante 30 min), e após a centrifugação o sobrenadante foi usado para as análises. Os níveis totais de triglicérides foram dosados usando kits comerciais (Triglicérides Enzimático Líquido, Doles, Goiania, Brasil). O conteúdo de glicogênio do fígado foi dosado em duplicata (Carr & Neff, 1984; modificado por Nery & Santos, 1993).

O conteúdo de glicogênio foi obtido através da degradação enzimática da glicose (amiloglicosidase; Sigma). O produto resultante foi aferido com um kit comercial (Glicose enzimática; Doles). Todas as medições foram realizadas em um espectrofotômetro com um leitor de microplacas a um comprimento de onda de 490 nm (ELx800; Biotek Instruments Inc., Winooski, VT).

2.6. Análise de minerais

A solução para análise de Ca e P nos ossos, foi preparada segundo a metodologia de Santos et al. (2009), por digestão nitro-perclórica. O cálcio foi determinado usando o kit comercial (Cálcio arsenazo, Doles, Goiania, GO, Brasil), o qual usa metodologia que tem por princípio a reação do cálcio presente na amostra com o arsenazo III, sendo originado um complexo corado com intensidade variando conforme a concentração de cálcio na água (cálcio-arsenazo III), que foi lido no espectrofotômetro (Biospectro, Espectrofotometro SP-22), com o comprimento de onda 670 nm.

Para a determinação do fósforo total, as amostras foram processadas pelo método que faz a conversão do fósforo presente na amostra em ortofosfato. A reação deste com o molibdato em meio ácido produz um complexo misto molibdato/fosfato que, na presença do íon vanadato, forma o ácido molibdovanadofosfórico de cor amarelada. A intensidade da cor amarela é proporcional à concentração de íons fosfato na amostra e quantificada espectrofotometricamente a 420nm (AOAC – Official Method 965.17, 2010).

2.7. Histologia do Fígado e Intestino

Foi analisado o fígado e o intestino dos organismos nos diferentes tratamentos, como forma de avaliar possíveis alterações morfológicas. O material coletado após finalização do experimento foi fixado em formol a 20% tamponado, sendo processado

posteriormente em um processador automático LUPE PT 05, passado para o processo de inclusão em Paraplast e cortado a 5µm de espessura em micrótomo LUPETEC MRPO3. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina. As lâminas foram observadas com um microscópio Zeis Primo Star.

O critério utilizado para observação e avaliação de possíveis alterações morfológicas no fígado foi o sugerido por McFadzen et al. (1997), que propõe uma avaliação em uma escala de 1 a 3, onde: O grau 1 representa a um fígado em bom estado. Com grânulos levemente presentes, pequenos e distintos núcleos e citoplasma dos hepatócitos com uma estrutura variando em textura e grânulos dispersos; O grau 2 indica uma condição intermediária. Os nucléolos são alargados ou amorfos, o citoplasma é homogêneo e vacuolizado em um grau muito limitado; O grau 3 corresponde a um fígado degradado. Apresentam muitos núcleos picnóticos, pequenos e negros, o citoplasma é hialino com uma falta de textura.

Na observação e avaliação das amostras de intestino, foi usado os critérios sugeridos por Krogdahl et al. (2003), que classifica possíveis alterações a morfologia intestinal, quanto: 1) alargamento ou encurtamento das pregas intestinais; 2) perda da vacuolização supranuclear nas células absortivas (enterócitos) no epitélio intestinal; 3) alargamentos da lâmina central, dentro das dobras intestinais, com o aumento da quantidade do tecido conjuntivo; 4) presença de uma população mista de leucócitos na lâmina central da dobra intestinal e submucosa.

2.8. Análise estatística

O experimento foi baseado na oferta de seis dietas experimentais, em triplicata. Todos os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Previamente à análise de variância, foram verificadas a normalidade dos dados com o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias com o teste de Levene. Uma vez comprovados estes princípios os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Quando detectadas, as diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as médias, foi usado o teste de Tukey ao nível de 5%.

3. Resultados

3.1. Qualidade da água

A concentração de oxigênio dissolvido foi de $6,23 \pm 0,28$, a temperatura de $25,57^{\circ}\text{C} \pm 0,17^{\circ}\text{C}$, o pH de $7,97 \pm 0,09$, e a alcalinidade de $136,41 \pm 17,79$ mg/L CaCO_3 . Os valores de amônia total de $0,14 \pm 0,14$ mg/L e nitrato de $0,11 \pm 0,11$ mg L⁻¹.

3.2. Sobrevivência e crescimento

Os valores da taxa de sobrevivência foram igual ou superior a 90%, não apresentando diferença significativa entre os tratamentos experimentais (Tabela 2). Foi observado crescimento significativamente maior nos tratamentos T100 e T500, quando comparado ao observado no TC ($P < 0,05$). Contudo, não houve diferença significativa para os parâmetros de taxa de eficiência proteica, taxa de crescimento específico e conversão alimentar aparente entre os tratamentos.

3.3. Composição de carcaça

Não houve diferença significativa para matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo e cinza, entre os tratamentos. Os valores da concentração de minerais apresentou diferença significativa para as leituras de cálcio total. A concentração de cálcio total apresentou os menores valores para os tratamentos TC e T25, enquanto os maiores valores foram apresentados pelos peixes do tratamento T250. A concentração de fósforo total não apresentou diferença significativa, entre os tratamentos.

Tabela 2 – Os efeitos da suplementação de enzimas sobre os parâmetros de desempenho zootécnico do *Trachinotus marginatus* alimentados com dietas experimentais por 80 dias.

Dietas	TC	T25	T50	T100	T250	T500
Peso inicial (g)	1,00 ± 0,17	1,00 ± 0,13	1,00 ± 0,11	0,99 ± 0,14	0,99 ± 0,13	0,99 ± 0,13
Peso final (g)	7,78 ± 2,08 ^b	8,30 ± 2,43 ^{ab}	8,73 ± 1,86 ^{ab}	9,21 ± 2,55 ^a	8,77 ± 2,27 ^{ab}	9,23 ± 2,14 ^a
TCE¹	2,56 ± 0,14	2,60 ± 0,26	2,70 ± 0,12	2,79 ± 0,07	2,71 ± 0,11	2,78 ± 0,01
CAA²	2,51 ± 0,27	2,69 ± 0,63	2,33 ± 0,16	2,30 ± 0,20	2,35 ± 0,17	2,24 ± 0,05
TEP³	0,87 ± 0,10	0,84 ± 0,22	0,95 ± 0,08	0,97 ± 0,08	0,94 ± 0,08	0,99 ± 0,02
Sobrevivência	0,98 ± 0,04	0,90 ± 0,04	0,98 ± 0,04	0,89 ± 0,14	0,95 ± 0,04	0,95 ± 0,04

Os valores são expressos em médias ± DP com n=3.

¹ Taxa de Crescimento Específico;

² Conversão Alimentar Aparente;

³ Taxa de Eficiência Proteica.

Tabela 3 – Análise proximal da carcaça do *Trachinotus marginatus* (% peso úmido) alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de enzimas, por 80 dias.

Dietas	TC	T25	T50	T100	T250	T500
Matéria seca	37,49 ± 0,01	35,86 ± 0,01	37,47 ± 0,03	38,52 ± 0,01	37,53 ± 0,01	37,59 ± 0,02
Proteína Bruta	18,56 ± 0,01	19,17 ± 0,01	18,44 ± 0,01	18,78 ± 0,01	19,11 ± 0,01	19,22 ± 0,01
Extrato etéreo	14,68 ± 0,02	14,82 ± 0,01	15,54 ± 0,03	16,61 ± 0,01	15,57 ± 0,01	15,80 ± 0,01
Cinza	4,27 ± 0,003	4,70 ± 0,003	4,44 ± 0,005	4,29 ± 0,004	4,17 ± 0,003	4,45 ± 0,004
P*	10,70 ± 0,39	10,73 ± 0,28	10,27 ± 0,49	10,00 ± 0,68	10,02 ± 0,53	10,15 ± 1,15
Ca*	31,21 ± 2,54 ^c	31,52 ± 1,71 ^c	35,23 ± 1,85 ^{ab}	35,31 ± 2,11 ^{ab}	36,77 ± 2,89 ^a	33,07 ± 3,31 ^{bc}

Os valores são expressos em médias ± DP com n=3.

* Medido nos ossos.

3.4. Bioquímica do fígado e músculo

Os índices hepáticos para glicogênio não mostrou diferença significativa entre os tratamentos. Já os índices hepáticos para triglicerídeos demonstraram um aumento significativo entre os tratamentos ($p < 0,05$; Tabela 4). Onde o tratamento TC apresentou o menor valor de deposição de triglicerídeos. Os tratamentos T250 e T500 apresentaram os maiores valores de deposição.

Tabela 4 – Os efeitos da suplementação de enzimas sobre parâmetros hepáticos do pampo, *Trachinotus marginatus* alimentados com dietas experimentais por 80 dias.

Dietas	TC	T25	T50	T100	T250	T500
Glicogênio (mmol L^{-1})	333 ± 34	285 ± 85	296 ± 75	332 ± 28	331 ± 36	259 ± 42
Triglicerídeos (mg L^{-1})	83 ± 6^c	120 ± 26^{bc}	120 ± 23^{bc}	138 ± 21^{ab}	178 ± 13^a	184 ± 17^a

Os valores são expressos em medias \pm DP de três grupos replicados.

3.5. Histologia do fígado e intestino

A análise histológica do fígado apontou altas taxas de formação de vacúolos nos hepatócitos dos peixes do tratamento T250 e T500 devido ao grande acúmulo lipídico (Tabela 4). Já os peixes alimentados com o tratamento TC não apresentaram alterações nas células do fígado. Este fato pode ser evidenciado pela pouca ou nenhuma alteração na morfologia das células do fígado dos tratamentos T25, T50 e T100 (Tabela 5).

Tabela 5 – Características morfológicas do fígado de *Trachinotus marginatus*, alimentados por 80 dias com dietas suplementadas com diferentes níveis enzimáticos.

Dieta experimental	Grau 1	Grau 2	Grau 3
	Estruturas normais	Mudanças moderadas	Mudanças severas
TC	8	1	-
T25	4	5	-
T50	4	5	-
T100	5	4	-
T250	1	4	4
T500	-	5	4

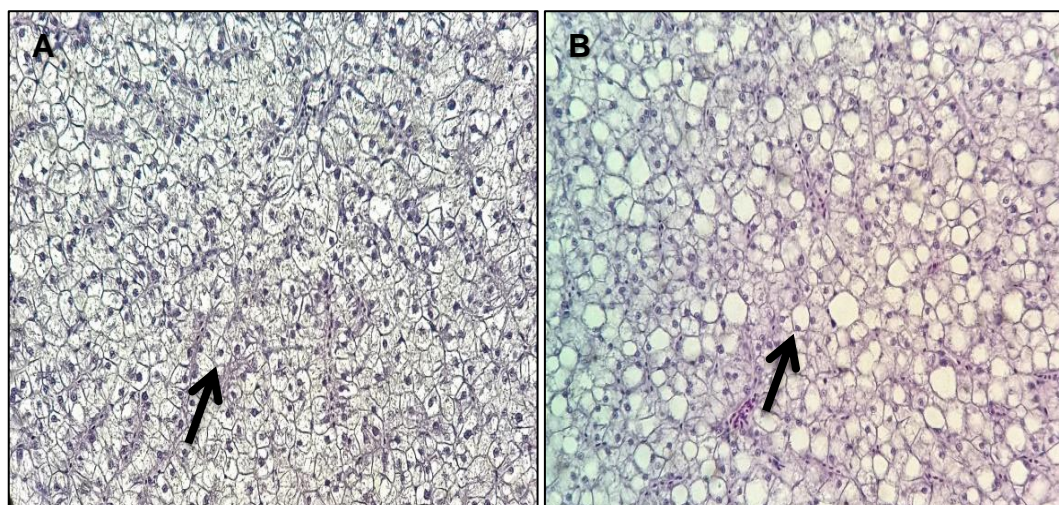


Figura 1 - Lâmina histológica do fígado de pampo, alimentado por 80 dias com e sem suplementação de enzimas. A) Dieta controle, a seta aponta para as células em estágio normal, sem alterações aparente. B) Dieta do tratamento T500, a seta aponta as células com grandes alterações, grande formação de vacúolos lipídicos, deslocamento do núcleo para as extremidades da célula e com maior volume. Resolução de 100×.

Não foram evidenciadas diferenças na morfologia do intestino dos peixes dos diferentes tratamentos. Todos os peixes analisados apresentaram uma pequena inflamação da membrana própria e uma inflamação moderada da camada epitelial, com redução na vacuolização supranuclear dos enterócitos.

4. Discussão

A aquicultura exerce uma forte demanda sobre o uso de farinha e o óleo de peixe o que compromete a sustentabilidade da atividade (Tacon & Metian, 2008; Bostock et al, 2010). O uso de fontes proteicas vegetais tem se apresentado como uma alternativa, para a redução do uso de farinha de peixe na dieta de organismos aquáticos (Gatlin III et

al., 2007). Contudo, a presença de fatores antinutricionais e pouca digestibilidade de alguns nutrientes é um fator limitante para o seu uso, principalmente para espécies carnívoras (Benevides et al., 2011; Castillo & Gatlin III, 2015)

A inclusão de enzimas exógenas na ração com base proteica vegetal, tem mostrado melhora no desempenho de crescimento de peixes (Jiang et al., 2014), utilização do fósforo e retenção mineral (Zhu et al., 2014), favorecendo a capacidade digestiva desses peixes e possibilitando a utilização de nutrientes que em condições normais não poderiam ser aproveitados (Adeola & Cowieson, 2011; Sinha et al., 2011).

No presente estudo, os peixes dos tratamentos T100, T250 e T500 tiveram seu crescimento influenciado positivamente pela suplementação enzimática, que beneficiou o crescimento. Corroborando os resultados de outros autores que utilizaram complexo enzimático para melhora no crescimento, como Zamini et al. (2014), em *Salmo trutta caspius*, como Ai et al. (2007), em *Lateolabrax japonicus*, e Lin et al. (2007), em juvenis de tilápia híbrida *Oreochromis niloticus x O. aureus*.

A melhora no crescimento dos peixes mediante a utilização de enzimas tem sido explicada por alguns autores como o efeito da ação de carboidrases e proteases frente aos polissacarídeos não amiláceos. As enzimas proporcionam um aumento na utilização dos nutrientes presentes na dieta, aumento a retenção de proteínas, lipídeos e carboidratos (Dalsgaard et al., 2012).

Outro efeito observado no presente estudo é a maior concentração de Ca nos ossos dos peixes dos tratamentos T50, T100 e T250. A diferença na concentração de Ca é efeito da presença da enzima fitase na dieta, que favoreceu a absorção deste micronutriente, como observado por Adeoye et al. (2016). Este mesmo resultado foi observado por Ramos et al. (2017), que utilizando as mesmas enzimas, mas com dietas para *Mugil liza*. Tanto neste trabalho como o de Ramos et al (2017), não houve variação na deposição de fósforo. Uma possível explicação, é a desproporção da relação Ca:P presente nas dietas. Onde o nível elevado de Ca poderia ter interferido na absorção de P e redução da atividade da fitase. Outra explicação possível é a concentração de P na dieta, que sendo pouco limitaria a deposição óssea e se elevado o P disponível reduziria a atividade da fitase (Cao et al, 2007).

É comum a alteração na morfologia do fígado causada pela acumulação de lipídeos. Ao serem alimentados com quantidades lipídeos ou energia na dieta que excedam a capacidade das células hepáticas em oxidar os ácidos graxos ou houver prejuízo da síntese proteica, os peixes tem um aumento massivo na síntese e deposição

de lipídeos na forma de vacúolos (Martínez-Llorens et al., 2012). A análise histológica do fígado mostrou um aumento na deposição lipídica nos peixes dos tratamentos T250 e T500, ocasionando a formação de muitos vacúolos lipídicos nos hepatócitos.

Essa tendência de aumento da acumulação lipídica hepática foi evidenciada pela análise do triglicerídeo hepático. O aumento de triglicerídeos no fígado foi resultado da maior utilização da energia proveniente da dieta, proporcionada pela suplementação de enzimas.

Os resultados obtidos com este estudo demonstram que a suplementação de 100, 250 e 500 mg kg⁻¹ de enzimas, do complexo enzimático Rovabio® Max AP, melhora o performance de crescimento do pampo *Trachinotus marginatus*. A suplementação de enzimas não alterou a composição de carcaça e a deposição de glicogênio. A suplementação elevada de enzimas causa uma maior acumulação lipídica no fígado. O tratamento com a suplementação de 100 mg kg⁻¹ de enzima, demonstrou ser o mais indicado para juvenis de pampo, sendo capaz de melhorar o desempenho de crescimento sem causar maiores alterações na morfologia do fígado.

5. Referências bibliográficas

- ABOU ANNI IS, BIANCHINI A, BARCAROLLI IF, VARELA JUNIOR AS, ROBALDO RB, TESSER MB AND SAMPAIO LA. 2016. Salinity influence on growth, osmoregulation and energy turnover in juvenile pompano *Trachinotus marginatus* Cuvier 1832. *Aquaculture* 455, 63-72.
- ADEOLA O AND COWIESON AJ. 2011. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *J Anim Sci* 89: 3189-3218.
- ADEOYE AA, JARAMILLO-TORRES A, FOX SW, MERRIFIELD DL AND DAVIES SJ. 2016. Supplementation of formulated diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) with selected exogenous enzymes: Overall performance and effects on intestinal histology and microbiota. *Anim Feed Sci Tech* 215: 133-143.
- AI Q, MAI K, ZHANG W, XU W, TAN B, ZHANG C AND LI H. 2007. Effects of exogenous enzymes (phytase, non-starch polysaccharide enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion of Japanese seabass,

- Lateolabrax japonicus*. Comparative Biochemistry and Physiology 147, 502-508.
- AOAC, 1999. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th ed. Washington, DC, USA.
- AOAC, 2010. Official Methods of Analysis of AOAC. AOAC International, Official Method 965.17. 18 ed. Gaithersburg, MD, USA.
- BEDFORD MR. 2000. Exogenous enzymes in monogastric nutrition—their current value and future benefits. Animal Feed Science and Technology 86, 1-13.
- BENEVIDES CMJ, SOUZA MV, SOUZA RDB AND LOPES MV. 2011. Fatores antinutricionais em alimentos. Segurança Alimentar Nutricional 18 (2), 67-79.
- BOSTOCK J, MCANDREW B, RICHARDS R, JAUNCEY K, TELFER T, LORENZEN K, LITTLE D, ROSS L, HANDISYDE N, GATWARD I AND CORNER R. 2010. Aquaculture: global status and trends – Review. Philosophical Transactions of the Royal Society B 365, 2897-2912.
- CASTILLO S AND GATLIN III DM. 2015. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: a review. Aquaculture 435, 286-292.
- CAVALHEIRO ACM, CASTRO MLS, EINHARDT MDS, POUHEY LOF, PIEDRAS SN AND XAVIER EG. 2014. Use of microingredients in farmed fish feeding – a Review. Revista Portuguesa de Ciência Veterinária 109 (589-590), 11-20.
- COSTA LF, MIRANDA-FILHO KC, SEVERO MP AND SAMPAIO LA. 2008. Tolerance of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at different salinity levels. Aquaculture 285, 270-272.
- DALSGAARD J, VERLHAC V, HJERMITSLEV NH, EKMANN KS, FISCHER M, KLAUSEN M AND PEDERSEN PB. 2012. Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. Animal Feed Science and Technology 171, 181-191.
- FRACALOSSO DM AND CYRINO JEP. 2013. Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 1ed., Florianópolis, SC: AQUABIO.
- GARLING DL AND WILSON RP. 1976. Optimum dietary protein to energy ratio for channel catfish fingerlings, *Ictalurus punctatus*. J Nutr 106: 1268-1375.
- GATLIN III DM, BARROWS FT, BROWN P, DABROWSKI K, GAYLORD G, HARDY R, HERMAN E, HU G, KROGDAHL A, NELSON R, OVERTURF

- K, RUST M, SEALY W, SKONBERG D, SOUZA EJ, STONE D, WILSON R AND WURTELE E. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac. Res.* 38, 551–579.
- GHOMI M.R, SHAHRIARI R, LANGROUDI HF, NIKOO M, ELERT EV. 2012. Effects of exogenous dietary enzyme on growth, body composition, and fatty acid profiles of cultured great sturgeon *Huso huso* fingerlings. *Aquacult. Int.* 20, 249-254.
- JIANG T-T, FENG L, LIU Y, JIANG W-D, JIANG J, LI S-H AND TANG L. 2014. Effects of exogenous xylanase supplementation in plant protein-enriched diets on growth performance, intestinal enzyme activities and microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquac. Nutr.* 20, 632-645.
- JORY DE, IVERSEN ES AND LEWIS RH. 1985. Culture of fishes of the genus *Trachinotus* (Carangidae) in the western Atlantic: prospects and problems. *Journal of the World Mariculture Society* 16, 87-94.
- KAMALAM BS, MEDALE F AND PANSERAT S. 2017. Utilization of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies. *Aquaculture* 467, 3-27.
- KROGDAHL A, BAKKE-MECKELLEP AM AND BAEVERFJORD G. 2003. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac Nut* 9: 361-371.
- KROGDAHL A, PENN M, THORSEN J, REFSTIE S AND BAKKE AM. 2010. Important antinutrientes in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquac. Res.* 41, 333-344.
- LIN S, MAI K AND TAN B. 2007. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquac. Res.* 38, 165-1653.
- MARTÍNES-LLORENS S, BAEZA-ARIÑO R, NOGALES-MÉRIDA S, JOVER-CERDÁ M AND TOMÁS-VIDAL A. 2012. Carob seed germ meal as a partial substitute in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Amino acid retention, digestibility, gut and liver histology. *Aquaculture* 338, 124-133.

- MCFADZEN IRB, COOMBS SH AND HALLIDAY NC. 1997. Histological indices of the nutritional condition of sardine, *Sardina pilchardus* (Walbaum) larvae off the north coast of Spain. J Exp Mar Bio Eco 212: 239-258.
- MCMASTER MF. 2014. FAO Cultured species sheet, Florida pompano (*Trachinotus carolinus*). Florida, USA. 23 pp.
- MENDONÇA PP, COSTA PC, POLESE MF, VIDAL JR MV AND ANDRADE DR. 2012. Efeito da suplementação de fitase na alimentação de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Archivos de zootecnia 61, 437-448.
- MENEZES NA AND FIGUEIREDO JL. 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil IV. Teleostei (3). São Paulo : Museu de Zoologia-USP, SP.
- MOURA GS, OLIVEIRA MGA AND LANNA EAT. 2009. Atividade de tripsina no quimo de tilápia-tailandesa submetida a diferentes temperaturas da água. Revista Brasileira de Zootecnia 38, 2086-2090.
- MOURÃO JS AND NORDI N. 2003. Etnoictiologia de pescadores artesanais do estuário do rio Mamanguape, Paraíba, Brasil. Boletim do Instituto de Pesca 29, p. 9.
- N.R.C., 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academy Press, Washington, DC.
- NERY LEM AND SANTOS EA. 1993. Carbohydrate metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry 106, 747-753.
- OGUNKOYA AE, PAGE GI, ADEWOLU MA AND BUREAU DP. 2006. Dietary incorporation of soybean meal and exogenous enzyme cocktail can affect physical characteristics of faecal material egested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 254, 466–475.
- RAMOS LRV, PEDROSA VF, MORI A, ANDRADE CFF, ROMANO LA, ABREU PC AND TESSER MB. 2017. Exogenous enzyme complex prevents intestinal soybean meal-induced enteritis in *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) juvenile. An Braz Acad Sci 2017.
- SANTOS AD et al. 2009. Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes. 2. ed. Brasília: Embrapa. 624 p
- SILVA DJ AND QUEIROZ AC. 2009. Análise de Alimentos: Métodos Químicos e Biológicos, 3 ed., Viçosa, MG: UFV.

- SILVA EM, MONSERRAT JM, SAMPAIO LA AND TESSER MB. 2015. Crescimento e metabolismo do nitrogênio em juvenis de *Trachinotus marginatus* alimentados com diferentes níveis proteicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 67, 131-139.
- SILVA JAM, PEREIRA-FILHO M, CAVERO BAS AND OLIVEIRA-PEREIRA MI. 2007. Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com enzimas digestivas exógenas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818). *Acta Amazônica* 37, 157-164.
- SINGH B AND SATYANARAYANA T. 2014. Fungal phytases: characteristics and amelioration of nutritional quality and growth of non-ruminants. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (2014), 1-15.
- SINHA AK, KUMAR V, MAKKAR HPS, BOECK G AND BECHER K. 2011. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition – A review. *Food Chem.* 127, 1409-1426.
- STECH MR, CARNEIRO DJ AND PIZAURO JM. 2009. Fatores que afetam a produção de enzimas digestivas em peixes e o uso de enzimas exógenas como ferramentas em nutrição de peixes. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde* 13, 79-93.
- TACON AGJ AND METIAN M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 146-158.
- TACON AGJ. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados Manual de capacitación. Proyecto AQUILA II, Doc. de campo nº 4, Brasília, FAO – Itália.
- UNESCO, 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris, FR.
- YOON JH, THOMPSON LU AND JENKINS DJA. 1983. The effect of phytic acid on in vitro rate of starch digestibility and blood glucose response. *The American Journal of Clinical Nutrition* 38, 385-842.
- ZAMINI A, KANANI H, ESMAEILI A, RAMEZANI S AND ZORIEZAHRA S. 2014. Effects of two dietary exogenous multi-enzyme supplementation, Natuzyme® and beta-mannanase (Hemicell®), on growth and blood parameters of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). *Comp. Clin. Pathol.* 23, 187–192.

- ZAMINI A, KANANI H, ESMAEILI A, RAMEZANI S AND ZORIEZAHRA S. 2014. Effects of two dietary exogenous multi-enzyme supplementation, Natuzyme® and beta-mannanase (Hemicell®), on growth and blood parameters of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*). *Comp. Clin. Pathol.* 23, 187–192.
- ZAMORA-SILLERO J, RAMOS LRV, ROMANO LA, MONSERRAT JM AND TESSER MB. 2013. Effect of dietary dextrin levels on the growth performance, blood chemistry, body composition, hepatic triglycerides and glycogen of Lebranche mullet juveniles (*Mugil liza* Valenciennes 1836, Mugilidae). *Journal of Applied Ichthyology* 29, 1342-1347.
- ZHU Y, QIU X, DING Q, DUAN M AND WANG C. 2014. Combined effects of dietary phytase and organic acid on growth and phosphorus utilization of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture* 430, 1-8.

ANEXO I

CERTIFICADO CEUA - FURG

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL

Universidade Federal do Rio Grande
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP
ceua@furg.br <http://www.propeps.furg.br>

CEUA



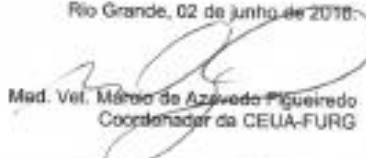
CERTIFICADO Nº P044/2016

Certificamos que o projeto intitulado "Uso de carboidratos e fitases exógenas na ração de pampo *Trachinotus marginatus*", protocolo nº 23116.002095/2016-70, sob a responsabilidade de Marcelo Borges Tesser - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 25 de maio de 2016 (Ata 006/2016).

A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

CEUA Nº	P008/2016
COLABORADORES	Cleber dos Santos Simião
VIGÊNCIA DO PROJETO	31/12/2017
ESPÉCIE/LINHAGEM	<i>Trachinotus marginatus</i>
NÚMERO DE ANIMAIS	300
PESO/IDADE	5 g / Juvenis
SEXO	Indeterminado
ORIGEM	Captura na praia do Cassino, Rio Grande, RS.
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Janeiro de 2018

Rio Grande, 02 de junho de 2016.


Mar. Vel. Marisa de Azevedo Piqueiro
Coordenadora da CEUA-FURG

ANEXO II

AUTORIZAÇÃO ICMBio - SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 52073-1	Data da Emissão: 01/12/2015 08:51	Data para Revalidação*: 30/12/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: cleber dos santos simiao	CPF: 859.127.942-53
Título do Projeto: Uso de carboidrases e fitase exógenas na ração de pampo <i>Trachinotus marginatus</i>	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG	CNPJ: 94.877.586/0001-10

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	coleta de organismos para submissão a atividade de suplementação nutricional	12/2015	05/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		RS	Praia do Cassino, coordenadas -32.203552, -52.171667	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	<i>Trachinotus marginatus</i>
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	<i>Trachinotus marginatus</i> (*Qtde: 300)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1 Método de captura/coleta (Peixes)	Outros métodos de captura/coleta (rede de arrasto manual), Rede de arrasto de praia (tração manual)
-------------------------------------	---

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 56643223



Página 1/3