

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

Bruno Bianch Loureiro

**CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ COMO
SUBSTITUTO DA FARINHA DE PEIXE EM DIETAS PARA JUVENIS
DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Santa Maria, RS
2016**

Bruno Bianch Loureiro

**CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ COMO SUBSTITUTO DA
FARINHA DE PEIXE EM DIETAS PARA JUVENIS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leila Picolli da Silva

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bianch Loureiro, Bruno
Concentrado proteico de farelo de arroz como substituto da farinha de peixe em dietas para juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) / Bruno Bianch Loureiro.-2016.
89 f.; 30cm

Orientadora: Leila Picolli da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, RS, 2016

1. *Rhamdia quelen* 2. Concentrado proteico 3. Nutrição de peixes 4. Proteínas vegetais 5. Farelo de arroz I. Picolli da Silva, Leila II. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Bruno Bianch Loureiro. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: brunodino_zoo@hotmail.com

Bruno Bianch Loureiro

CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ COMO SUBSTITUTO DA FARINHA DE PEIXE EM DIETAS PARA JUVENIS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Zootecnia**

Aprovado em 24 de fevereiro de 2016:

Leila Picolli da Silva, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Rafael Lazzari, Dr. (CESNORS/UFSM)

Alexandra Pretto, Dra. (UNIPAMPA-Campus Uruguaiana)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

Ao meus pais (**Luiz e Jucélia**),
minha irmã e cunhado (**Cristiane e Junior**),
minha querida vó (**Angelina**) e a
minha eterna namorada **Naglezi**, dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luiz e Jucélia, por todo o carinho, esforço, dedicação, apoio em todos os momentos da minha vida. Tudo que sou hoje como pessoa e profissional eu devo a vocês, que sempre buscaram dar a melhor educação aos filhos, nunca desistindo de seguir em frente, até mesmo nos momentos mais difíceis da vida. Nunca poderei retribuir todo o carinho e dedicação que tiveram e ainda tem comigo. Obrigado por acreditarem nos meus sonhos e decisões, pois sem o apoio de vocês nunca poderia chegar onde estou agora. Amo vocês!

À minha irmã e cunhado (Cristiane e Junior), por todo carinho, apoio, brincadeiras e amizade. Sei que sempre poderei contar com vocês em todos os momentos e decisões na minha vida.

À minha Vó Angelina, minha segunda mãe. Um anjo incrível que tive e tenho a oportunidade de conhecer, conviver e por alguns anos morar junto. Mulher batalhadora, dedicada e esforçada sempre buscando dar o melhor aos seus filhos, netos e bisnetos. De coração sem fronteiras, por muitos anos me cuidou, deu amor, carinho e ensinamentos que ficaram para sempre. Obrigado por tudo minha Vó amada.

À minha eterna namorada Naglezi, companheira de risadas, brincadeiras, carinhos, estudos, rotina e decisões. Não tenho palavras para expressar toda a gratidão e alegria de ter você na minha vida, sempre ao meu lado me apoiando e ajudando de todas as formas possíveis. Obrigado por tudo meu amor, por todas as alegrias e momentos fantásticos que passamos até hoje.

À Valentina nossa filha canina, que durante todo esse tempo de escrita me fez companhia em nossa casa.

À minha orientadora professora Dra. Leila Picolli da Silva, por ter me acolhido e concedido a oportunidade de estar aqui hoje. Obrigado por todos os ensinamentos, paciência e dedicação ao longo dessa trajetória.

Ao professor Dr. João Radünz Neto, profissional incrível que tive a oportunidade de conhecer e conviver. Obrigado por todos os ensinamentos e lutas por uma piscicultura melhor.

Aos professores do Departamento de Zootecnia, pelo conhecimento e dedicação, em especial aos professores Gerson Garcia, Paulinho Pacheco, Marco Antônio Fialho (disciplina de economia rural) e professora Geni Toledo pela amizade do dia a dia. Aos demais funcionários deste Departamento, em especial à Olirta pelo auxílio, esclarecimentos prestados e amizade, pois é devido a ela que hoje estou tendo a oportunidade de tentar obter o título de Mestre em Zootecnia.

Ao professor Dr. Rafael Lazzari pela disponibilidade de ler esta dissertação e fazer parte da banca examinadora do trabalho.

À Dra. Alexandra Pretto pela disponibilidade de ler esta dissertação e fazer parte da banca examinadora do trabalho, mas também pela amizade e auxílio em muitos momentos dessa trajetória.

À Taida, Patrícia (Paty) e Dirleise (Dina) por essa amizade incrível e toda a dedicação, brincadeiras, risadas, apoio e auxílio antes, durante e depois do experimento. Sem vocês não teria conseguido chegar até o final, pois foram vocês que me ajudaram a não desistir e largar tudo nos momentos mais difíceis desses 2 anos de mestrado. Sou eternamente grato. Obrigado por tudo!

À Fernanda Macagnan pela ajuda nas análises, amizade e por tornar às sextas-feiras mais alegres. E também pelo apoio e conselho nos momentos mais difíceis que tive no mestrado.

Aos amigos Ana Betine, Artur, Fernanda Goulart, Fredi e Carol pela amizade, companhia, brincadeiras, boas risadas e muitos mates. Um obrigado especial a Ana Betine, Fernanda e Carol pela ajuda nas análises e por acreditarem no sucesso dessa nova conquista.

Aos meus colegas de profissão e futuros mestres Gilmar e Vinícius (Alemão), grandes amigos e profissionais dedicados. Obrigado por todos esses anos de amizade.

À Maria, servidora Técnico-Administrativa no laboratório de Piscicultura, por todo auxílio prestado, apoio e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Piscicultura, os quais foram imprescindíveis para o início e finalização com sucesso desse trabalho: Sharine Thaís, Letícia, Marina, Joziane, Vagner, Jackson, Shelen, Silvano, Shelen e Marco Aurélio, Marisa e Suziane. Obrigado pela amizade, companheirismo e auxílio nos manejos e análises.

RESUMO

CONCENTRADO PROTEICO DE FARELO DE ARROZ COMO SUBSTITUTO DA FARINHA DE PEIXE EM DIETAS PARA JUVENIS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

AUTOR: Bruno Bianch Loureiro
ORIENTADORA: Leila Picolli da Silva

Nosso estudo testou a inclusão do concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) em dietas contendo farinha de peixe, visando reduzir seu uso na alimentação de jundiás (*Rhamdia quelen*). Foram avaliados parâmetros de crescimento, composição corporal, deposição de nutrientes, respostas metabólicas e atividades de enzimas digestivas. O CPFA foi obtido do Laboratório de Piscicultura da Universidade Federal de Santa Maria, RS. Durante 45 dias, 500 juvenis de jundiá com peso médio inicial de $6,28 \pm 0,12$ g foram distribuídos aleatoriamente em 20 tanques circulares de polietileno (280 L cada), conectados a um sistema de recirculação de água termorregulado dotado de tanque de decantação, dois filtros biológicos, reservatório de água e filtro ultravioleta. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia às 9h:00, 13h:00 e 17h:00, até a saciedade aparente com dietas contendo níveis crescentes de inclusão do CPFA (10, 15, 20, e 30%). Ao final do estudo, foram avaliados parâmetros de crescimento, composição corporal, deposição de nutrientes, índices digestórios, atividades das enzimas tripsina e quimotripsina, parâmetros plasmáticos e hepáticos. Os dados foram submetidos a teste de normalidade e análise de variância e as médias foram comparadas com o controle por teste de Dunnett, exceto para ganho de peso (GP) e taxa de crescimento específico (TCE) que foram calculados por análise de regressão cúbica. As diferenças foram consideradas significativas a um nível de probabilidade de $P < 0,05$. Não foram observadas diferenças significativas para composição corporal, conversão alimentar aparente, atividade de enzimas digestivas e parâmetros plasmáticos dos peixes alimentados com as dietas experimentais. Foram encontrados menor peso final e fator de condição nos peixes alimentados com as dietas CPFA10 e CPFA15, além da menor deposição de proteína corporal e consumo diário de ração na dieta CPFA10. Os parâmetros de crescimento GP e TCE ajustaram-se ($P = 0,003$ e $P = 0,004$) ao modelo de regressão cúbica, indicando o nível ideal de inclusão do CPFA na dieta para o máximo crescimento (25,01% e 25,07%, respectivamente). Os peixes alimentados com a dieta CPFA30 apresentaram menor taxa de eficiência proteica e índice hepatossomático, além de maior atividade da enzima alanina aminotransferase. Com base nos resultados obtidos, é possível observar que a inclusão de 20% de CPFA na dieta não alterou nenhum dos parâmetros analisados neste estudo, demonstrando desempenho de crescimento numericamente superior ao controle e as demais dietas, demonstrando a significativa qualidade nutricional do CPFA. Portanto, a inclusão de 20% de CPFA pode ser utilizada em dietas para jundiás, como ingrediente proteico alternativo para reduzir o uso da farinha de peixe.

Palavras-chave: *Rhamdia quelen*. Concentrado proteico. Nutrição de peixes. Proteínas vegetais. Farelo de arroz.

ABSTRACT

RICE MEAL PROTEIN CONCENTRATE AS REPLACEMENT OF FISH MEAL IN DIETS FOR SILVER CATFISH JUVENILE (*Rhamdia quelen*)

AUTHOR: Bruno Bianch Loureiro

ADVISER: Leila Picolli da Silva

Our study tested the inclusion of rice meal protein concentrate (RMPC) in diets containing fish meal, to reduce their use in silver catfish (*Rhamdia quelen*) nutrition. Were evaluated growth parameters, body composition, deposition of nutrients, metabolic responses and digestive enzymes activities. RMPC was obtained from the Fish Farming Laboratory of the Federal University of Santa Maria, RS. During 45 days, 500 silver catfish juvenile with initial weight of 6.28 ± 0.12 g were average and randomly divided into 20 cylindrical tanks (280 L, each), connected to thermoregulated water recirculation system, two biological filters and ultraviolet filter. The fish were fed three times daily at 9: 00, 13h: 00 to 17h: 00 at apparent satiety, with diets increasing levels of inclusion of RMPC (10, 15, 20, and 30%). At end of the study, we evaluated growth parameters, body composition, nutrient deposition, digestive indices, activities of trypsin and chymotrypsin enzymes, blood parameters and liver. The data were submitted to normality test and analysis of variance and the means were compared with the Control diet by Dunnett test, except weight gain (WG) and specific growth rate (SGR), which were calculated by analysis of cubic regression. Differences were considered significant at probability level of $P < 0.05$. There were no mortalities during the experimental period. Significant differences in body composition, feed conversion, activity of digestive enzymes and plasma parameters of the fish fed with the experimental diets were observed. Significant differences were found for lower final weight and condition factor in fish fed the RMPC10 and RMPC15 diets, as well as lower body protein deposition and daily feed intake in RMPC10 diet. WG and SGR parameters ($P = 0.003$ and $P = 0.004$) set up to the cubic regression model, indicating the optimal level of inclusion of RMPC in the diet for maximum growth (25.01% and 25.07% respectively). Fish fed the RMPC30 diet had lower protein efficiency ratio (PER) and hepatosomatic index (HSI) as well as increased activity enzyme alanine aminotransferase. Based on the results obtained, it can be seen that the inclusion of 20% RMPC in diet did not change any of the parameters analyzed in this study, showing growth performance numerically superior to the control and the other diets, demonstrating significant nutritional quality of RMPC. Therefore, adding 20% of RMPC can be used in diets for silver catfish, as an alternative protein ingredient to reduce the use of fishmeal.

Keywords: *Rhamdia quelen*. Protein concentrate. Fish nutrition. Plant protein. Rice meal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 2

Figure 1 - Regression analysis cubic of WG and SGR silver catfish juvenile (initial body weight, $6.28 \pm 0.12\text{g}$) fed for 45 days diets formulated with different percentages of rice meal protein concentrate.....	53
--	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Formulação e composição proximal das dietas experimentais	25
Tabela 2 - Perfil de aminoácidos das dietas experimentais	26
Tabela 3 - Desempenho de crescimento de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) durante 45 dias	30
Tabela 4 - Composição centesimal (%) de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) durante 45 dias (base matéria seca).....	31
Tabela 5 - Índices somáticos e atividade de enzimas digestivas de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) durante 45 dias.	33

ARTIGO 2

Table 1 - Proximate composition and amino acid profiles of fish meal (FM) and rice meal protein concentrate (RMPC).....	46
Table 2 - Ingredients, chemical composition and essential amino acid content of the experimental diets (based on dry matter).	48
Table 3 - Survival rate, protein retention, feed conversion ratio and hepatosomatic index of silver catfish juvenile fed for 45 days experimental diets formulated with different percentages of rice meal protein concentrate (RMPC).	54
Table 4 - Plasma parameters of silver catfish juvenile fed for 45 days diets formulated with inclusion of different percentages of rice meal protein concentrate (RMPC).	54
Table 5 - Hepatic parameters of silver catfish juvenile fed for 45 days diets formulated with the inclusion of different percentages of rice meal protein concentrate (RMPC).	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ALAT	Alanina aminotransferase
AOAC	Association of Analytical Chemists
AVMA	Association American Veterinary Medical
BFD	Body fat deposition
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
BPD	Body protein deposition
CDR	Consumo diário de ração
CONT	Controle
CPA	Concentrado proteico de arroz
CPFA	Concentrado proteico de farelo de arroz
CPS	Concentrado proteico de soja
CT	Comprimento total
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization of United Nations
FC	Fator de condição
FCR	Feed conversion rate
FDN	Fibra em detergente neutro
FM	Fish meal
HSI	Hepatosomatic index
IDS	Índice digestivo somático
IGV	Índice de gordura visceral
NDF	Neutral detergent fiber
NDSC	Neutral detergent soluble carbohydrate
PER	Protein efficiency ratio
PF	Peso final
QI	Quociente intestinal
RC	Rendimento de carcaça
RMPC	Rice meal protein concentrate
SGR	Specific growth rate
SR	Survival rate
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria
WG	Weight gain

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.2	OBJETIVOS.....	14
1.1.2	Objetivo Geral.....	14
1.2.2	Objetivos Específicos.....	14
1.3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.3.1	Proteína na alimentação de peixes.....	15
1.3.2	Fontes proteicas vegetais.....	16
1.3.3	Concentrados proteicos vegetais.....	17
1.3.4	Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	18
2	ARTIGO 1 - Efeitos da inclusão de concentrado proteico de farelo de arroz em dietas para jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) sobre crescimento e atividade de enzimas digestivas	20
3	ARTIGO 2 - Inclusion of rice meal protein concentrate in practical diets for silver catfish juvenile (<i>Rhamdia quelen</i>) - Impact on growth performance, plasma and hepatic biochemistry	422
4	DISCUSSÃO GERAL	655
5	CONCLUSÃO GERAL	688
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	699
	ANEXO A – Instruções para submissão de trabalhos na revista Aquaculture - Artigo 1 e Artigo 2	766

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2012, estudo realizado pelo Instituto norte-americano Earth Policy apontou que pela primeira vez no mundo a produção de pescado e frutos do mar (66,5 milhões toneladas) superou a produção de carne bovina (63 milhões toneladas) (LARSEN e RONEY, 2013). Esse fato demonstra que o mercado aquícola exigirá maior eficiência nos próximos anos a fim de abastecer a crescente demanda de alimentos causada pelo aumento exponencial da população mundial.

A maior produção aumentará a demanda quantitativa e qualitativa de rações para a aquicultura, normalmente de teores proteicos elevados (acima de 28% de PB) devido às exigências diferenciadas destes animais em relação a outras espécies usadas para produção de carne.

Atualmente as fontes de origem animal são as mais usadas como ingrediente proteico em rações aquícolas, devido ao elevado valor biológico e digestibilidade. Contudo, essas fontes são onerosas, sazonais e heterogêneas (GABER, 2006), motivando estudos para sua substituição parcial ou total por ingredientes vegetais (EL-SAYED, 1999) que sejam economicamente viáveis, não sazonais e qualitativamente promissores.

Estudos mostram que as fontes vegetais em rações aquícolas apresentam qualidade inferior àquelas de origem animal, devido à menor digestibilidade, deficiência em aminoácidos e presença de fatores antinutricionais (SANTIGOSA et al., 2008). Porém, esse cenário pode ser alterado se os ingredientes forem adequadamente estudados para sua otimização, respeitando as vantagens e deficiências de cada fonte de origem vegetal (CABRAL et al., 2011).

Algumas estratégias industriais tem buscado a minimização dos fatores adversos das fontes vegetais pela concentração de nutrientes. Normalmente estes novos produtos apresentam ação melhorada para o desempenho animal devido a redução ou eliminação de fatores antinutricionais (MARIOD et al., 2010), melhorando o perfil de aminoácidos, agregando valor comercial e interesses tecnológicos para obtenção de produto diferenciado. Um exemplo é o concentrado proteico de soja (CPS) com 60% ou mais de PB, muito estudado e utilizado na nutrição do camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*; SOARES et al., 2015; FORSTER et al., 2002; BAUER et al., 2012) e diversas espécies de peixes como o salmão do Atlântico (*Salmo salar L.*; PRATOOMYOT et al., 2010), linguado (*Scophthalmus maximus L.*; DAY e GONZÁLEZ, 2000), bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua L.*; HANSEN et al., 2007), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*; AKSNES et al.,

2006; COLLINS et al., 2012), pregado (*Psetta maxima* L.; NAGEL et al., 2012), black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*; NGANDZALI et al., 2011). Outras fontes como o concentrado proteico de farelo de arroz também vem sendo desenvolvidas e demonstram viabilidade de aplicação para formulação de rações, porém ainda são pouco estudadas para a nutrição de peixes.

A melhora da composição nutricional de fontes vegetais é uma ótima alternativa para intensificar o uso dessas proteínas, pois estudos demonstram que a substituição da farinha de peixe por fontes proteicas vegetais provocam alterações metabólicas que se refletem sobre o desempenho dos animais. Esse fato ressalta a necessidade de conduzir estudos sobre a capacidade digestória, atividade de enzimas digestivas (LUNDSTEDT et al., 2004; STECH et al., 2009), bem como, estudos relativos ao metabolismo proteico e enzimas envolvidas no catabolismo hepático.

1.2 OBJETIVOS

1.1.2 Objetivo Geral

Testar o concentrado proteico de farelo de arroz como ingrediente proteico vegetal, como substituto parcial à farinha de peixe na nutrição de jundiás (*Rhamdia quelen*), avaliando reflexos sobre aspectos de desempenho, metabolismo e enzimas digestivas.

1.2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a inclusão de concentrado protéico de farelo de arroz em dietas para jundiás através do desempenho zootécnico, parâmetros bioquímicos e enzimáticos;

Identificar o melhor nível de inclusão do concentrado proteico de farelo de arroz em dietas para o jundiá.

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Proteína na alimentação de peixes

A proteína é o nutriente orgânico mais importante encontrado no tecido dos peixes, corresponde cerca de 70% do total da matéria seca corporal (WILSON, 2002) sendo necessária para uma série de funções biológicas (LEHNINGER et al., 2004). A disponibilidade na dieta e ingestão diária de proteína são importantes porque influenciam a produtividade dos peixes, atuando na formação e manutenção de tecidos, enzimas, hormônios e anticorpos (PORTZ e FURUYA, 2013). Entretanto, sabe-se que a produtividade pode ser afetada por diversos fatores ligados a digestão da proteína, sua absorção e utilização metabólica como o hábito alimentar (espécies carnívoras possuem maior exigência que onívoros e herbívoros), conteúdo energético da dieta, fase de desenvolvimento dos animais, frequência alimentar e temperatura da água, entre outros (RIBEIRO et al., 2012).

Após digestão e absorção no trato gastrintestinal, os aminoácidos são distribuídos pelo sangue para órgãos e diferentes tecidos, tanto para a síntese de novas proteínas (crescimento e reprodução) como para a substituição das existentes (manutenção) (HALVER e HARDY, 2002; WILSON, 2002). Segundo Ribeiro et al. (2012) é fundamental que se estabeleça um teor protéico mínimo na dieta através do conteúdo adequado de aminoácidos, visando garantir a presença dos mesmos nos locais de síntese e otimizando a eficiência da proteína ingerida.

A ingestão inadequada de proteínas advindas de dietas desbalanceadas ou de baixo valor biológico podem causar a redução do crescimento e perda de peso dos animais, resultante da remoção da proteína de alguns tecidos para manutenção de funções vitais. Em contrapartida, a proteína em excesso na dieta causará menor eficiência protéica, pois parte será utilizada para o crescimento e o restante será convertido em energia (WILSON, 2002), o que é indesejável na nutrição de peixes, pois a proteína é o maior e mais caro nutriente da dieta (MILLWARD, 1989). Em peixes, o valor biológico da proteína de um ingrediente é verificado pelo perfil de aminoácidos (essenciais e não essenciais) e pela digestibilidade dos aminoácidos presentes nesse ingrediente (HALVER e HARDY, 2002).

Muitas são as fontes de proteínas utilizadas na alimentação animal apresentando origem animal (farinhas de peixe, farinha de carne e ossos suína, farinha de vísceras), vegetal (farelos de soja, canola, girassol, arroz, entre outras) e derivadas da proteína animal (hidrolizados e silagens de peixe, por exemplo) (PENNY, 1999). As fontes de origem animal são as mais utilizadas na nutrição aquícola (SANTIGOSA et al., 2011) e essa demanda é

resultante do seu elevado valor biológico, perfil de aminoácidos essenciais compatível com as exigências dos peixes (GATLIN et al., 2007; LARSEN et al., 2012), equilibrado nível de cálcio e fósforo e de vitaminas lipó e hidrossolúveis (PEZZATO, 1995).

A farinha de peixe é o ingrediente mais utilizado na elaboração de dietas para organismos aquáticos, devido ao excelente perfil de aminoácidos e ácidos graxos essenciais, vitaminas, minerais e ótima palatabilidade (TEIXEIRA et al., 2006; LIU et al., 2012; NUNES et al., 2011; TACON et al., 2002). A principal origem da matéria prima utilizada para obtenção da farinha de peixe é advinda, em maior proporção, da pesca extrativa de peixes pelágicos do grupo da espécie de anchovetas. Desta maneira, a quantidade do ingrediente produzido no mundo é regulado conforme a pesca desta espécie (SOARES, 2014). No entanto, a produção de farinha de peixe obteve uma redução de 42,8% em 2010 quando comparado ao ano 2000 (FAO, 2012). Essa redução ocasionou o aumento dos custos com a alimentação dos animais devido à baixa oferta do ingrediente ao mercado consumidor. Diante desses fatos, Bauer et al. (2012) afirmam que a viabilidade econômica e a manutenção do crescimento da aquicultura podem ser afetadas pela grande demanda de farinha de peixe.

Contudo, alternativas a redução ou substituição da farinha de peixe por fontes de proteína de boa qualidade nutricional e economicamente viáveis podem ser encontradas com o uso de fontes vegetais e seus derivados.

1.3.2 Fontes proteicas vegetais

A maior demanda por fontes proteicas de origem animal aumenta a procura por fontes alternativas vegetais com potencial para substituí-las em dietas de organismos aquáticos (RAMOS, 2011). Ressalta-se que há grande variabilidade de espécies vegetais com amplo potencial para uso como ingrediente protéico, embora apenas uma pequena quantidade seja atualmente utilizada na alimentação animal.

Várias são as pesquisas dedicadas a avaliar a utilização de fontes proteicas vegetais como ingredientes alternativos e viáveis a substituição das fontes proteicas de origem animal na nutrição de peixes (CABRAL et al., 2011; HARDY, 2010). Atualmente, fontes vegetais como farelo e torta de girassol (NYINA-WAMWIZA et al., 2010), fermentado de farelo de algodão (SUN et al., 2015), farelo de soja e concentrado proteico de soja (FASAKIN et al., 2005; SALZE et al., 2010), fermentado de soja (ZHOU et al., 2011) e concentrado protéico de ervilha (SÁNCHEZ-LOZANO et al., 2011) tem sido utilizadas como ingredientes

promissores para alimentação de peixes e normalmente essa substituição tem sido alcançada em níveis de até 30% (HARDY et al., 2010, LOVATTO et al., 2014).

Porém, ingredientes vegetais apresentam algumas restrições quanto ao seu uso na nutrição de peixes, como baixa aceitabilidade (GATLIN et al., 2007) e digestibilidade (PEZZATO, 1995), presença de fatores antinutricionais (GATLIN et al., 2007; MARIOD et al., 2010; PRATOOMYOT et al., 2010) e desequilíbrio no perfil de aminoácidos (SANTIGOSA et al., 2008; KAUSHIK e HEMRE, 2008). Mas segundo Davis e Miles (2001), a melhora de um ingrediente deficiente em algum nutriente pode ser alcançada com a complementação com outras fontes de proteína animal ou vegetal com diferente perfil de aminoácidos.

Para que determinada fonte proteica vegetal seja considerada um ingrediente alternativo a farinha de peixe ou outra fonte de origem animal, precisa possuir algumas características como: disponibilidade e produção constante ao longo do ano, baixo custo, facilidade de transporte e de armazenagem, baixo teor de fibra e carboidratos insolúveis, ser livre ou possuir reduzida presença de antinutrientes, ter alto teor de proteína, boa digestibilidade, bom perfil de aminoácidos e razoável palatabilidade (GATLIN et al., 2007).

1.3.3 Concentrados proteicos vegetais

Segundo Ogunwolu et al. (2009), uma grande diversidade de plantas com potencial protéico de baixo custo tem despertado o interesse do seu uso como fonte complementar na alimentação animal. Entretanto, muitos ingredientes vegetais possuem ampla variedade de substâncias antinutricionais que prejudicam a digestão das proteínas (inibidores de protease, taninos e lecitina), a utilização de minerais e de vitaminas (fitatos, gossipol, oxalatos); além de apresentarem micotoxinas, saponinas, nitratos, alcalóides, de distintos efeitos negativos sobre o aproveitamento dos nutrientes (OLIVEIRA, 2003).

A redução ou eliminação de fatores antinutricionais podem ser obtidos através da aplicação de técnicas químicas (MODESTI et al., 2007; SMITH et al., 1946), físicas (HABIBA, 2002) ou enzimáticas (TANG et al., 2003), tendo em vista que as proteínas podem ser concentradas e modificadas buscando a melhoria da digestibilidade, reduzido teor de fibras e melhor perfil de aminoácidos. De acordo com Lovatto (2012), a concentração de nutrientes é motivada por princípios nutricionais, organolépticos, funcionais e econômicos. Na nutrição de peixes, os principais motivos que levam a concentração de proteína vegetal são o aumento do valor biológico do ingrediente através da extração ou inativação de substâncias

tóxicas (fortemente ligadas às proteínas) e a separação da proteína dos compostos indigestíveis (celulose, lignina, polifenóis, entre outros).

Entre os concentrados protéicos estudados e utilizados na nutrição peixes é possível destacar o concentrado protéico de arroz (CPA) como fonte alternativa, comparável a farinha de peixe em proteína e gordura (OUJIFARD et al., 2012). O CPA já foi utilizado para substituir a farinha de peixe em dietas para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*; PALMEGIANO et al., 2006), robalo (*Dicentrarchus labrax*; GÜROY et al., 2013), dourada (*Sparus aurata*; SÁNCHEZ-LOZANO et al., 2009), goraz (*Bogaraveo pagellus*; PALMEGIANO et al., 2007; DAPRÀ et al., 2009). No entanto, não existem informações disponíveis sobre a utilização e eficácia da substituição da farinha de peixe por concentrado protéico de farelo de arroz (CPFA) em dietas para peixes, especialmente para o jundiá (*Rhamdia quelen*).

1.3.4 Jundiá (*Rhamdia quelen*)

O jundiá é um peixe de couro, encontrado em quase toda a América do Sul e Central. Espécie nativa da Região Sul do Brasil, que tem se destacado pelo elevado potencial de crescimento, aceitação comercial, características desejáveis para produção, crescimento satisfatório até mesmo nos meses de inverno (RODRIGUES et al., 2012), fácil adaptação ao cultivo intensivo, facilidade de indução a reprodução (DIEMER et al., 2011), boa eficiência alimentar, além da carne sem espinhos intramusculares (FRACALOSSO et al., 2004). Porém, apresenta alguns aspectos considerados indesejáveis para a produção intensiva durante a fase de engorda, como a maturação precoce e o crescimento heterogêneo (BALDISSEROTTO e RADÜNZ NETO, 2004).

Os mesmos autores relatam que o jundiá tem preferência por ambientes de águas calmas, sendo encontrado em lagos e poços fundos de rios com fundo arenoso e argiloso. Em seu estágio larval alimenta-se de zooplâncton, e na fase adulta possui forte tendência a onivoria e hábito alimentar variado, consumindo peixes, insetos, crustáceos, restos de vegetais e detritos orgânicos (BALDISSEROTTO e RADÜNZ NETO, 2004). Devido ao hábito onívoro tem a capacidade de se nutrir, conforme a disponibilidade, de uma grande variedade de alimentos (GOMIERO et al., 2007), apresentando potencial para o aproveitamento de dietas elaboradas com distintas fontes proteicas, animais e/ou vegetais (NAYLOR et al., 2009).

Estudos realizados em sistemas de cultivo intensivos demonstraram que a combinação de fontes de origem animal (farinha de peixe, farinha de carne e osso) e origem vegetal (farelo de soja, de canola e girassol) proporcionaram melhor desempenho em juvenis de jundiá, em relação à utilização de uma única fonte proteica (LAZZARI et al., 2006; VEIVERBERG, 2011), demonstrando que a espécie não é totalmente dependente da farinha de peixe.

Contudo, estudos usando fontes proteicas vegetais em dietas para o jundiá ainda são pouco conclusivos, havendo necessidade de maior exploração do potencial dessas fontes diferenciadas na alimentação dessa espécie.

2 ARTIGO 1¹

Inclusão de concentrado proteico de farelo de arroz em dietas para jundiá
(*Rhamdia quelen*) sobre crescimento, composição centesimal e atividade de
enzimas digestivas

Bruno Bianch Loureiro^{1*}, Fernanda Rodrigues Goulart¹, Fernanda Teixeira Macagnan¹, Sharine Nunes Descovi¹, Naglezi de Menezes Lovatto², Thais Soares dos Santos¹, Marina Osmari Dalcin¹, Leila Picolli da Silva¹.

¹Department of Animal Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul. Avenue Roraima nº1000, University City, Neighborhood Camobi, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil.

²Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio Grande do Sul, Campus Bento Gonçalves, Avenue Osvaldo Aranha, 540, Neighborhood Juventude da Enologia, Bento Gonçalves, RS, CEP: 95700-000, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8365; fax: +55 55 3220 8240.
E-mail addresses: brunodino_zoo@hotmail.com

¹Artigo a ser submetido à revista Aquaculture

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o uso de concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA), em diferentes níveis de inclusão (10, 15, 20, 30%) na dieta do jundiá (*Rhamdia quelen*) sobre os parâmetros de crescimento, composição corporal, índices somáticos e atividade de enzimas digestivas. Cinco dietas isoprotéicas e isocalóricas foram formuladas com quatro repetições cada. Durante 45 dias, 500 juvenis de jundiá com peso médio inicial de $6,28 \pm 0,12$ g e comprimento total de $8,68 \pm 0,06$ cm, foram distribuídos em 20 tanques redondos de polietileno (280 L) conectados a um sistema de recirculação de água termorregulado. Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais três vezes ao dia às 9h:00, 13h:00 e 17h:00, até a saciedade aparente. Os dados foram submetidos a teste de normalidade e análise de variância e as médias foram comparadas com o Controle pelo teste de Dunnett. As diferenças foram consideradas significativas a um nível de probabilidade de $P < 0,05$. Ao final do estudo, não foram encontradas diferenças significativas para composição corporal (matéria seca, proteína bruta, matéria mineral e lipídeos), índices somáticos e atividade das enzimas tripsina e quimotripsina dos peixes alimentados com as dietas experimentais. Foram encontrados menor peso final e fator de condição nos peixes alimentados com as dietas CPFA10 e CPFA15, além do consumo diário de ração na dieta CPFA15. A partir dos resultados obtidos neste estudo, fica evidente que utilização de CPFA como fonte proteica alternativa à farinha de peixe é eficiente, uma vez que maiores níveis de inclusão de CPFA (20 e 30%) não resultam em diferenças no desempenho de crescimento, composição corporal, índices somáticos e atividade de enzimas digestivas dos animais. Portanto, a inclusão de CPFA pode ser utilizada em dietas para juvenis de jundiá, sendo considerado um ingrediente proteico alternativo com potencial para diminuir o uso da farinha de peixe.

Palavras-chave: Peixes. Concentrado proteico. Enzimas digestivas. Proteínas alternativas. Farelo de arroz.

1. Introdução

A farinha de peixe é o ingrediente proteico mais comumente utilizado na produção de alimentos para piscicultura. Contudo, o aumento na produção de peixes acarreta na necessidade de substituir a farinha de peixe por fontes proteicas alternativas. Esse fato se dá devido às farinhas de peixe serem preparadas a partir de pequenos peixes pelágicos, como sardinhas e anchovitas advindas principalmente do Peru ou norte do Chile, alimentos que poderiam ser utilizados diretamente na alimentação humana (Naylor et al., 2009).

A transição do uso de proteínas animais por outras fontes proteicas, tais como fontes de proteína à base de plantas, é uma demanda iminente para assegurar a sustentabilidade dos sistemas de produção e estabilidade do mercado aquícola (Fuertes et al. 2013). Além disso, a quantidade limitada disponível no mercado resultou em pesquisas maciças para identificar fontes proteicas alternativas (Olsen e Hasan, 2012).

Para desenvolver ingredientes proteicos vegetais compatíveis com a qualidade proteica das farinhas de peixe, métodos como cozimento, torrefação e extrusão são frequentemente usados com objetivo de reduzir os fatores antinutricionais e melhorar a digestibilidade proteica dos vegetais (Nyina-Wamwiza et al., 2010).

Métodos químicos e enzimáticos também podem ser usados para reduzir fatores antinutricionais, melhorar digestibilidade proteica, reduzir o teor de fibras e aumentar o conteúdo de aminoácidos de fontes proteicas de origem vegetal (Lovatto et al., 2016). Esses métodos viabilizam a obtenção de concentrados proteicos vegetais, como por exemplo, o concentrado proteico de arroz, que apresenta elevado valor proteico (Palmegiano et al., 2006).

O arroz é a segunda cultura mais produzida no mundo, sendo o Brasil o maior produtor fora do continente asiático (FAO, 2013). A orizicultura é responsável pelo maior volume de resíduos agroindustriais produzidos (Nakhshiniev et al., 2014). Dentre esses

resíduos, o farelo de arroz apresenta potencial nutricional, porém tem elevado conteúdo de fibras e fatores antinutricionais (Piyaratne et al., 2009). A obtenção de concentrado proteico de farelo de arroz é viável e esse novo ingrediente deve ser nutricionalmente estudado como fonte proteica vegetal alternativa na dieta de peixes.

Para avaliar o potencial nutricional de novos ingredientes proteicos é necessário analisar o potencial de esse ingrediente ser digerido e absorvido pelo organismo animal, até transformar-se em proteína corporal e não avaliar apenas desempenho de crescimento e ganho de peso dos peixes. Nesse aspecto, as enzimas digestivas tripsina e quimotripsina são importantes proteases envolvidas no processo de digestão proteica por hidrólise enzimática. Estes dois tipos de enzimas, junto com outras enzimas proteolíticas, permitem que a proteína ingerida seja dividida em moléculas simples, que poderão então ser absorvidas e utilizadas em vias metabólicas (Guillaume e Choubert, 2001).

Nosso estudo avaliou o uso de concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) na dieta do jundiá (*Rhamdia quelen*) sobre parâmetros de crescimento, composição corporal, parâmetros digestórios e atividade de enzimas digestivas.

2. Material e métodos

2.1 Dietas experimentais

Foram formuladas cinco dietas isoproteicas e isocalóricas com a inclusão de concentrado protéico de farelo de arroz (CPFA) em níveis de 0% (CONT), 10% (CPFA10), 15% (CPFA15), 20% (CPFA20) ou 30% (CPFA30). O CPFA foi obtido do Laboratório de Piscicultura da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

As dietas experimentais foram confeccionadas no Laboratório de Piscicultura da UFSM de acordo com as exigências de 37% de proteína bruta estabelecidas por Meyer e

Fracalossi (2004), 3.200 Kcal de Energia Digestível Kg⁻¹ e exigência em aminoácidos conforme Montes-Girao e Fracalossi (2006). Os ingredientes foram moídos, pesados e misturados manualmente até a completa homogeneização. Em seguida, foi adicionada água e a mistura extrusada em micro extrusora laboratorial com capacidade de 15kg de ração/hora.

Os extrusados com 4 mm de diâmetro foram secos em estufa de circulação de ar forçado durante 24 horas a 50 ° C de temperatura e, em seguida, armazenados (-18 ° C). A composição proximal e o perfil de aminoácidos das dietas experimentais estão descritos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

2.2 Instalações e manejo experimental

O estudo foi realizado no Laboratório de Piscicultura do Departamento de Zootecnia da UFSM, RS. Um total de 500 juvenis de jundiá (peso médio inicial de $6,28 \pm 0,12$ g e comprimento total de $8,68 \pm 0,06$ cm) obtidos da Piscicultura Paz Peixe de Cruz Alta, RS, foram distribuídos aleatoriamente em 20 unidades experimentais, constituindo cinco tratamentos com quatro repetições cada. As unidades foram constituídas por tanques circulares de polietileno (280 L de volume útil) com entrada e saída individuais de água, conectados a um sistema de recirculação de água termorregulado dotado de 4 aquecedores elétricos (2000 Watts cada) composto por tanque de decantação (280 L), dois filtros biológicos compostos por pedra britada (1000 L cada), reservatório de água (2000 L) e filtro esterilizador ultravioleta (GreenFreeTMUV-2 18W).

Durante 45 dias os peixes foram alimentados com as dietas experimentais três vezes ao dia (9h:00, 13h:00 e 17h:00), até a saciedade aparente. Duas vezes ao dia (8h:00 e 15h:00) foi realizada a limpeza dos tanques experimentais por sifonagem, para retirada das fezes e eventuais resíduos de ração.

Tabela 1

Formulação e composição proximal das dietas experimentais.

	Dietas experimentais				
	CONT	CPFA10	CPFA15	CPFA20	CPFA30
Ingredientes (g 100 g⁻¹)					
CPFA ^a	0	10	15	20	30
Farinha de Peixe ^b	40,00	35,40	33,10	30,80	26,20
CPSoja ^c	22,27	22,27	22,27	22,27	22,27
Amido	19,66	18,60	18,1	17,54	12,00
Óleo de soja	3,00	3,00	3,00	3,00	4,65
Premix Vit. Min. ^d	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Fosfato Bicálcico	1,00	1,00	1,00	1,00	0,60
Glutamato Monossódico	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
BHT ^e	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Calcário Calcítico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
INERTE ^f	9,79	5,45	3,25	1,11	0
Composição proximal (g 100 g⁻¹)					
Proteína bruta ^g	37,01	37,01	37,01	37,01	37,00
Energia digestível (kcal kg ⁻¹) ⁱ	3200,29	3200,15	3201,11	3200,20	3200,05
Lipídeos ^g	7,76	7,88	7,95	7,99	7,96
Matéria seca ^g	95,94	96,3	96,12	96,02	95,79
Matéria mineral ^g	25,39	20,7	18,61	16,43	13,84
FDN ^{g,h}	20,2	24,9	26,79	28,27	29,93
Carboidratos solúveis ^j	5,76	6,44	5,76	6,32	7,06
Cálcio ^l	0,81	0,81	0,80	0,80	0,74
Fósforo ^l	0,72	0,71	0,71	0,71	0,63

^a Desenvolvido pelo Laboratório de Piscicultura da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).^b Farinha de resíduos de tilápia obtidos a partir da cooperativa agro-industrial de piscicultura (COPISCES), Toledo, Paraná, Brasil.^c Concentrado protéico de soja (60% PB).^d Composição da mistura vitamínica e mineral (kg): ácido fólico 997,50 mg; ácido pantotênico 9975,00 mg; biotina 159,60 mg; cobalto 39,90 mg; cobre 2800,00 mg; etoxiquin 24,78 g; ferro 19,62 g; iodo 120,00 mg; manganês 5200,00 mg; niacina 19,95 g; selênio 119,70 mg; vitamina A 1995000 UI; vitamina B1 4987,50 mg; vitamina B12 5985,00 mcg; vitamina B2 4987,50g; vitamina B6 4987,50 mg; vitamina C 70,00 g; vitamina D3 198000,05 UI; vitamina E 19950,00 UI; vitamina K 997,50 mg; zinco 28,00 g.^e Butil-hidroxi-tolueno (antioxidante).^f Areia fina lavada.^g Analisados – Laboratório de Piscicultura, UFSM, RS.^h Fibra em detergente neutro (Van soest et al., 1991).ⁱ Energia digestível calculada: [(Proteína bruta * 5,65 * 0,85) + (Gordura * 9,4 * 0,9) + (Carboidratos * 4,15 * 0,7)] (adaptado de Meyer et al., 2004).^j Calculado: 100 – (proteína bruta + material mineral + lipídeos + fibra em detergente neutro + umidade).^l Calculados com base na análise dos ingredientes.

Tabela 2

Perfil de aminoácidos das dietas experimentais (base matéria seca).

	Dietas experimentais				
	CONT	CPFA10	CPFA15	CPFA20	CPFA30
Perfil de aminoácidos ^a (g 100 g ⁻¹)					
Lisina	2,67	2,64	2,62	2,61	2,58
Arginina	3,24	3,29	3,32	3,34	3,39
Treonina	1,85	1,87	1,88	1,89	1,91
Tirosina	1,37	1,4	1,41	1,43	1,46
Valina	2,04	2,1	2,12	2,15	2,2
Metionina + Cistina	1,23	1,24	1,24	1,24	1,25
Isoleucina	1,75	1,77	1,78	1,79	1,81
Leucina	3,13	3,19	3,21	3,24	3,29
Fenilalanina	1,93	1,97	1,99	2	2,04
Histidina	0,97	0,98	0,99	1	1,01
Asparagina	1,25	1,33	1,36	1,40	1,47
Glutamina	2,74	2,83	2,88	2,93	3,02
Serina	2,09	2,13	2,15	2,17	2,21
Glicina	3,53	3,39	3,32	3,25	3,11
Alanina	2,67	2,66	2,65	2,65	2,64

^a Calculado com base na análise dos ingredientes em base de matéria seca.

2.3 Qualidade da água

Para o controle de qualidade da água, foram mensurados diariamente: temperatura (termômetro de bulbo úmido) e oxigênio dissolvido (oxímetro digital YSI modelo 550A) e semanalmente: o pH, alcalinidade, dureza, amônia e nitrito realizadas com o kit colorimétrico Alfakit®.

Os dados de qualidade de água obtidos durante o período experimental foram: temperatura da manhã ($23,16 \pm 2,01$ °C), temperatura da tarde ($24,11 \pm 1,52$ °C), oxigênio dissolvido ($6,47 \pm 0,29$ ppm), pH ($7,5 \pm 0,23$), amônia ($0,08 \pm 0,04$ ppm), nitrito ($0,02 \pm 0,01$ ppm), alcalinidade total ($43,50 \pm 5,79$ mg CaCO₃ L⁻¹) e dureza ($44,17 \pm 11,14$ mg CaCO₃ L⁻¹).

De acordo com Baldisserotto e Silva (2004), esses parâmetros estão dentro da faixa adequada para o cultivo do jundiá.

2.4 Coleta de dados e variáveis analisadas

Ao final dos 45 dias experimentais realizou-se biometria para coleta de dados de peso (g) e comprimento total (cm). Para tal procedimento todos os peixes passaram por jejum de 24 horas e foram anestesiados com benzocaína (100 mg L⁻¹). A partir dos dados coletados foram determinados os seguintes parâmetros zootécnicos:

- Peso final (g): PF;
- Comprimento total (cm): CT;
- Consumo diário de ração (% de peso médio / dia): CDR

$$[\text{consumo total de ração (g)}] / [(\text{peso inicial} * \text{peso final})] \times 100;$$
- Fator de condição (g cm⁻³): FC = (peso / CT³).

$$[\text{peso peixe vivo (g)} / \text{comprimento total}^3 \text{ (cm)}] \times 100$$

Após a biometria, foram eutanaziados 8 animais por tratamento, por overdose de benzocaína (250 mg L⁻¹) (AVMA, 2013) para determinação da composição centesimal. Após coleta de sangue, outros 12 animais por tratamento foram eutanaziados e eviscerados, para obtenção de: peso (g) e comprimento do peixe inteiro (cm), comprimento (cm) e peso (g) do trato digestório e gordura visceral (g). A partir destes resultados foram calculados os parâmetros:

- Rendimento de carcaça (%): RC

$$(\text{peso eviscerado com cabeça e brânquias} / \text{peso do peixe inteiro}) \times 100;$$
- Índice digestivo-somático (%): IDS

$$(\text{peso do trato digestivo} / \text{peso do peixe inteiro}) \times 100;$$

- Quociente intestinal: QI

(comprimento do trato digestivo / comprimento do peixe);

- Índice de gordura visceral (%): IGV

(peso gordura visceral / peso do peixe inteiro) x 100;

Após a pesagem, o trato digestivo foi separado em estômago e intestino total e armazenado a -20 °C.

2.5 Análises químicas e enzimas digestivas

Para obtenção dos resultados da composição bromatológica das dietas e química do peixe inteiro, foram realizadas análises de umidade (secagem das amostras a 105 °C até o peso constante), cinzas (incineração em 600 °C por 4 h) e proteína bruta (método de microkjeldahl – N x 6,25) determinadas seguindo as metodologias descritas pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000) e a gordura foi extraída e quantificada pelo método de BLIGH-DYER (1959).

Para análise de enzimas digestivas o intestino foi triturado e homogeneizado em solução tampão pH 7,0 (0,02 M Tris/0,01 M fosfato) com o auxílio de um homogenizador elétrico tipo Turrax. Os homogeneizados foram centrifugados a 1200 x g durante 10 minutos. O sobrenadante obtido após centrifugação foi usado nos ensaios como fonte enzimática para determinação das atividades de tripsina e quimotripsina (HUMMEL, 1959).

- Tripsina: foi utilizado α - ρ -toluenesulphonyl-L-argininemethyl ester hydrochloride (TAME) como substrato. Os extratos foram incubados durante dois minutos (25 °C) em 2 ml de tampão (0,2 M Tris / 0,01 M de CaCl₂, pH 8,1).

- Quimotripsina: foi utilizado benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) como substrato. Os extratos foram incubadas durante dois minutos em 1 ml de tampão (0,1 M Tris / CaCl₂ 0,1 M), pH 7,8.

Ambas as atividades de tripsina e quimotripsina foram analisadas em duplicada e as leituras realizadas em espectrofotômetro com absorvância de 247 e 256 nm, respectivamente, de acordo com protocolos descritos por Hummel (1959). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolizar 1 μmol de substrato (TAME ou BTEE) / min / mg de proteína.

2.6 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. A análise estatística foi realizada utilizando o SPSS 13.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EUA). Os resultados obtidos foram submetidos a teste de normalidade e análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas com o Controle por teste de Dunnett. As diferenças foram consideradas significativas a um nível de probabilidade de $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Desempenho de crescimento

Ao final do estudo, os juvenis de jundiás alimentados com as dietas CPFA10 e CPFA15 apresentaram PF e FC significativamente menor ($P < 0,05$), ainda foi observada menor CDR dos peixes que receberam a dieta CPFA10. Não foram observadas diferenças significativas para os parâmetros CT e RC nos grupos alimentados com CPFA em relação ao grupo controle (Tabela 3).

3.2 Composição centesimal de peixe inteiro

Os resultados obtidos a partir da análise de matéria seca e mineral, proteína bruta e lipídios de juvenis de jundiá alimentados com as dietas experimentais podem ser observados na Tabela 4. A inclusão de diferentes níveis de CPFA nas dietas não resultou em diferenças significativas na composição centesimal dos peixes ao final do período experimental.

Tabela 3

Desempenho de crescimento de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) durante 45 dias.

	Dietas experimentais				
	CONT	CPFA10	CPFA15	CPFA20	CPFA30
PF ¹ (g)	25,04 ± 2,14	21,08 ± 1,30*	21,19 ± 1,57*	25,33 ± 1,50	23,73 ± 1,46
CT ² (cm)	13,68 ± 0,39	13,19 ± 0,25	13,15 ± 0,24	13,82 ± 0,34	13,62 ± 0,31
FC ³	0,97 ± 0,02	0,94 ± 0,01*	0,94 ± 0,01*	0,96 ± 0,02	0,95 ± 0,01
CDR ⁴ (%)	2,86 ± 0,07	2,57 ± 0,15*	2,79 ± 0,09	3,02 ± 0,07	3,05 ± 0,10
RC ⁵ (%)	87,54 ± 0,56	86,89 ± 0,86	87,47 ± 0,81	87,12 ± 0,81	86,83 ± 0,75

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. Os valores (média ± SD) na mesma linha com asterisco (*) diferem significativamente do controle pelo teste de Dunnett (P < 0,05). Peso inicial: 6,28 ± 0,12 g.

¹ Peso final (PF, g).

² Comprimento total (CT, cm).

³ Fator de condição (FC, g cm³⁻¹) = (peso / Comprimento total³).

⁴ Consumo diário de ração (CDR, % de peso médio / dia) = 100 × [consumo total de ração (g)] / [(peso inicial * peso final)].

⁵ Rendimento de carcaça (RC, %) = (peso eviscerado com cabeça e brânquias/peso do peixe inteiro) x 100.

Tabela 4

Composição centesimal (%) de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) durante 45 dias (base matéria seca).

	Dietas experimentais				
	CONT	CPFA10	CPFA15	CPFA20	CPFA30
Matéria seca	23,54 ± 1,86	24,20 ± 1,88	23,68 ± 1,28	23,71 ± 0,74	24,03 ± 0,34
Matéria mineral	2,55 ± 0,26	2,65 ± 0,35	2,83 ± 0,32	2,74 ± 0,23	2,65 ± 0,32
Proteína bruta	13,59 ± 1,03	13,20 ± 0,34	11,66 ± 1,07	12,26 ± 1,22	13,04 ± 1,15
Lipídios	6,66 ± 1,62	6,89 ± 0,73	6,27 ± 0,66	7,28 ± 1,28	5,93 ± 0,97

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. Os valores (média ± SD) na mesma linha com asterisco (*) diferem significativamente do controle pelo teste de Dunnett (P <0,05).

3.3 Índices somáticos e atividade das enzimas digestivas tripsina e quimotripsina

A tabela 5 apresenta os resultados dos índices somáticos e atividade de enzimas digestivas em jundiás alimentados com CPFA. A inclusão de CPFA nas dietas não causou nenhuma alteração significativa sobre o IDS, QI, IGV e atividades das enzimas tripsina e quimotripsina destes peixes ao final do estudo.

4. Discussão

O presente estudo de nutrição demonstra pela primeira vez o potencial da inclusão do CPFA em dietas para juvenis de jundiá. Os resultados obtidos mostraram que a inclusão de 20% ou 30% de CPFA nas dietas, como ingrediente proteico, não causou quaisquer efeitos negativos nos parâmetros de crescimento, composição corporal e atividades enzimáticas dos jundiás. No entanto, os menores níveis de inclusão (10 e 15%) do CPFA induziram a redução do desempenho de crescimento, sendo isto confirmado pelo menor PF e baixo FC dos peixes.

Estes resultados diferem de outros estudos utilizando fontes proteicas vegetais na alimentação de peixes como *Acanthopagrus schlegelii* (Sun et al., 2015), *Oreochromis niloticus* (El-Saidy e Saad, 2011), *Psetta maxima L.*, (Nagel et al., 2012), *Oncorhynchus mykiss* (Rinchar et al., 2003) e *Dicentrarchus labrax* (Güroy et al., 2013), os quais obtiveram menor desempenho de crescimento com maiores níveis de inclusão de fontes proteicas vegetais em substituição parcial a farinha de peixe.

O menor FC observado nos peixes alimentados com as dietas CPFA10 e CPFA15 pode ser explicado pela menor espessura do filé (Bonaldo et al., 2011). Lovatto et al. (2014) também encontraram menor FC quando utilizaram concentrados proteicos vegetais em dietas para jundiá, que ocorreu devido à adaptação nutricional dos peixes às dietas experimentais. Segundo os autores, esse resultado foi encontrado em peixes alimentados com dietas contendo maior nível de substituição da farinha de peixe ao contrário dos obtidos no presente estudo.

A redução no CDR foi observada apenas nos peixes que receberam a dieta CPFA10. Resultados semelhantes ao baixo CDR foram encontrados por Cheng et al. (2010) ao utilizarem farelo de canola em substituição a farinha de peixe na alimentação de *Lateolabrax japonicus*, os quais relataram que o aumento do consumo de ração possui relação com uma tentativa do organismo em obter mais energia devido a perda de energia digestível. Este resultado difere dos encontrados em estudos anteriores por Xu et al. (2016) e Nagel et al. (2012), onde o aumento do uso de fontes proteicas vegetais na dieta foi acompanhado pela redução do CDR.

A composição centesimal do peixe inteiro não foi afetada pelos níveis de inclusão de CPFA. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Hansen et al. (2007), Cheng et al. (2010) e Ye et al. (2011) onde a composição centesimal não apresentou nenhuma alteração pelos diferentes níveis de inclusão de fonte proteica vegetal nas dietas.

Tabela 5

Índices somáticos e atividade de enzimas digestivas de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA) durante 45 dias.

	Dietas experimentais				
	CONT	CPFA10	CPFA15	CPFA20	CPFA30
IDS ¹ (%)	4,07 ± 0,23	3,99 ± 0,18	3,84 ± 0,33	4,16 ± 0,22	4,25 ± 0,12
QI ²	0,94 ± 0,09	1,06 ± 0,08	0,96 ± 0,03	1,09 ± 0,10	1,08 ± 0,10
IGV ³ (%)	1,45 ± 0,28	1,92 ± 0,74	1,87 ± 0,44	1,57 ± 0,34	1,81 ± 0,53
Tripsina ⁴	15,27 ± 3,84	19,36 ± 7,39	19,96 ± 4,24	16,70 ± 7,26	7,71 ± 2,89
Quimotripsina ⁵	4.613,71 ± 1.477,91	5.859,36 ± 3.997,46	4.703,15 ± 1.505,36	3.738,25 ± 2.480,68	5.860,04 ± 4.025,76

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. Os valores (média ± SD) na mesma linha com asterisco (*) diferem significativamente do controle pelo teste de Dunnett (P <0,05).

¹ Índice digestivo-somático (IDS, %) = (peso do trato digestivo/peso do peixe inteiro) x 100.

² Quociente intestinal (QI)= comprimento do trato digestivo/comprimento do peixe.

³ Índice de gordura visceral (IGV, %) = (peso gordura visceral/peso do peixe inteiro) x 100.

⁴ μmol / TAME / min / mg proteína.

⁵ μmol / BTEE / min / mg proteína.

No entanto, esses resultados não corroboram com os encontrados por Gaber (2006) e Lovatto et al. (2014), onde os níveis de inclusão dos concentrados proteicos influenciaram na composição corporal.

A quantificação dos índices somáticos é utilizada para indicar a ocorrência de possíveis alterações morfofisiológicas do animal em relação ao fornecimento de distintas dietas. Segundo Pedron (2006), esses índices são indicativos de adaptação do trato gastrointestinal a partir do alimento ingerido.

No entanto, essas variáveis podem alterar de acordo com a idade do peixe (Gomiero et al., 2007) e composição dos ingredientes da dieta fornecida (Leenhouders et al., 2006), uma vez que os animais possuem a habilidade de modificar a estrutura e a capacidade de absorção de seu sistema digestório conforme a alteração nutricional da dieta ingerida (Baldisserotto, 2009). No presente estudo, não foram observadas alterações no IDS, QI e IGV demonstrando que os peixes adaptaram-se as dietas contendo diferentes níveis de CPFA.

O estudo específico da atividade da enzima tripsina e a razão tripsina / quimotripsina são utilizados como indicadores da qualidade proteica da dieta fornecida, assim como da eficiência de conversão alimentar, podendo causar alteração no crescimento de organismos aquáticos (Sunde et al., 2004; Thongprajukaew et al., 2013a).

Geralmente, o uso de fontes proteicas vegetais na alimentação de peixes resulta na redução da atividade da tripsina (Krogdahl et al., 2003), ocasionado pela presença de fatores antinutricionais (Pavasovic et al., 2007). No entanto, a ocorrência de maior atividade da enzima é explicada pela tentativa do corpo em aumentar a digestibilidade da proteína ingerida, refletindo em uma maior atividade proteolítica (Lovatto et al., 2016).

Contudo, resultados observados nesse estudo demonstraram que a atividade das enzimas tripsina e quimotripsina não foram afetadas pela inclusão do CPFA, esses resultados são contrários aos descritos por Lilleeng et al. (2007) e Penn et al. (2011) utilizando farelo de

soja e concentrado proteico de ervilha, respectivamente, na alimentação de salmão do Atlântico (*Salmo salar L.*) resultando em maior atividade da tripsina.

5. Conclusão

Os maiores níveis de inclusão de CPFA (20 e 30%) nas dietas, não resultam em diferenças no desempenho de crescimento, composição corporal, índices somáticos e atividade de enzimas digestivas dos animais. Portanto, a inclusão de CPFA é possível de ser utilizada em dietas para juvenis de jundiá, sendo considerado um ingrediente proteico alternativo com potencial para diminuir o uso da farinha de peixe.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para a concessão de uma bolsa de produtividade em pesquisa (Leila Piccoli da Silva); à CAPES pela bolsa de Mestrado (Bruno Bianchi Loureiro); Cargill Alimentos Ltda, Chapecó-Brasil pela doação do premix mineral e vitamínico.

Referências

- AOAC, 2000. Association of Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC international, Gaithersburg, 17 edn, v. I e II.
- AVMA, 2013. Association American Veterinary Medical. Guidelines on Euthanasia. Schaumburg, IL, USA.

- Baldisserotto, B., 2009. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. 2 ed. revista ampliada Santa Maria, Ed. UFSM, 349 p.
- Baldisserotto, B., Silva, L.V.F., 2004. Qualidade da água. In: Criação do jundiá (Baldisserotto, B., Radunz Neto, J. eds), 73–94. UFSM, Santa Maria, RS.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Bonaldo, A., Parma, L., Mandrioli, L., Sirri, R., Fontanillas, R., Badiani, A., Gatta, P.P., 2011. Increasing dietary plant proteins affects growth performance and ammonia excretion but not digestibility and gut histology in turbot (*Psetta maxima*) juveniles. *Aquaculture* 318, 101–108.
- Cheng, Z., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Ma, H., Li, Y., Zhang, J., 2010. Effects of dietary canola meal on growth performance, digestion and metabolism of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture* 305, 102-108.
- El-Saidy, D., Saad, A.S., 2011. Effects of partial and complete replacement of soybean meal with cottonseed meal on growth, feed utilization and hematological indexes for mono-sex male Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquac. Res.* 42, 351-359.
- FAO, 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Available at: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E> (Verified on 12.01.2015).
- Fuertes, J.B., Celada, J.D., Carral, J.M., Sáez-Royuela, M., González-Rodríguez, A., 2013. Replacement of fish meal by pea protein concentrate in practical diets for juvenile crayfish (*Pacifastacus leniusculus* Dana, *Astacidae*) from the onset of exogenous feeding. *Aquaculture* 388-391, 159-164.

- Gaber, M.M., 2006. The effects of plant-protein-based diets supplemented with *Yucca* on growth, digestibility, and chemical composition of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, L) fingerlings. *J. World Aquacult. Soc.* 37, 74–81.
- Gomiero, L. M., Souza, U.P., Braga, F.M.S., 2007. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia. *Biota Neotropica*, 7 (3), 127-133.
- Guillaume, J., Choubert, G., 2001. Digestive physiology and nutrient digestibility in fishes. In: *Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans* (Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. & Metailler, R. eds), pp. 27–58. Springer Praxis Publishing, Chichester UK. Hummel, B.C.
- Güroy D., Şahin, I., Güroy, B., Merrifield, D.L., Bulut, M., Tekinay, A.A., 2013. Replacement of fishmeal with rice protein concentrate in practical diets for European sea bass *Dicentrarchus labrax* reared at winter temperatures. *Aquac. Res.* 44 (3), 462–471.
- Hansen, A.C., Rosenlund, G., Karlsen O., Koppe, W., Hemre, G.I., 2007. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I - Effects on growth and protein retention. *Aquaculture* 272, 599- 611.
- Hummel, B.C.W., 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 1393-1399.
- Krogdahl A., Bakke-Mckellep A.M., 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. Nutr.* 9, 361-371.
- Leenhouwers, J.I., Adjei-Boateng, D., Verreth, J.A.J., Schrama, J.W., 2006. Digesta viscosity, nutrient digestibility and organ weights in african catfish (*Clarias gariepinus*)

- fed diets supplemented with different levels of a soluble non-starch polysaccharide. *Aquacult. Nutr.* 12, 111-116.
- Lilleeng, E., Froystad, M.K., Ostby, G.C., Valen, E.C., Krogdahl, A., 2007. Effects of diets containing soybean meal on trypsin mRNA expression and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Comp. Biochem. and Physiol.. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 147, 25–36.
- Lovatto N.M., Goulart, F.R., Loureiro, B.B., Adorian, T.J., Freitas, S.T., Pianesso D., Dalcin M.O., Athayde M.L., Silva, L.P., 2016. Effects of phosphorylate protein concentrate of pumpkin seed meal on growth and digestive enzymes activity of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquac. Nutr.* 22.
- Lovatto, N.M., Silva, L.P., Loureiro, B.B., Goulart, F.R., Pretto, A., Speroni, C.S., Radünz Neto, J., Loro, V.L., 2014. Efeitos de dietas contendo concentrados proteicos vegetais no desempenho e atividade de enzimas digestivas de jundiá (*Rhamdia quelen*). *Semina: Ciências Agrárias (Online)*, 35, 1071-1081.
- Meyer, G., Fracalossi, D.M., 2004. Protein requirement of jundia fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. *Aquaculture* 240, 331–343.
- Montes-Girao, P.J., Fracalossi, D.M., 2006. Dietary lysine requirement as basis to estimate the essential dietary amino acid profile for jundiá, *Rhamdia quelen*. *J. World Aquacult. Soc.* 37, 388–396.
- Nagel, F., Arndt, V.D., Tusche, K., Kroeckel, S., Van Bussel, G.J., Schlachter, M., Adem, H., Tressel, R.P., Schul, C., 2012. Nutritional evaluation of rapeseed protein isolate as fish meal substitute for juvenile turbot (*Psetta maxima* L.) - Impact on growth performance, body composition, nutrient digestibility and blood physiology. *Aquaculture* 356–357, 357–364.

- Nakhshinieva, B., Biddinikaa, M.K., Gonzalesb, H.B., Sumidac, H., Yoshikawaa, K., 2014. Evaluation of hydrothermal treatment in enhancing rice straw compost stability and maturity. *Bior. Technology*. 151, 306-313.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrelle, A.P., Forster, I., Gatlinf, D.M., Goldburgh, R.J., Hua, K., Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS*, 106, 15103–15110.
- Nyina-Wamwiza, L., Wathelet, B., Richir, J., Rollin, X., Kestemont, P., 2010. Partial or total replacement of fish meal by local agricultural by-products in diets of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*): growth performance, feed efficiency and digestibility. *Aquac. Nutr.* 16, 237–247
- Olsen, R.L., Hasan, M.R., 2012. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends Food Sci. Technol.* 27, 120-128.
- Palmegiano, G.B., Daprà, F., Forneris, G., Gai, F., Gasco, L., Guo, K., Peiretti, P.G., Sicuro, B., Zoccarato, I., 2006. Rice protein concentrate meal as a potential ingredient in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 258, 357–367.
- Pavasovic, A., Anderson, A.J., Mather, P.B., Richardson, N., 2007. Influence of dietary protein on digestive enzyme activity, growth and tail muscle composition in red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens). *Aquac. Res.* 38, 644–652.
- Pedron, F. A. 2006. Fiber in Feeding catfish (*Rhamdia quelen*). MSc thesis - Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil.
- Penn, M.H., Bendiksen, E.A., Campbell, P., Krogdahl, A., 2011. High level of dietary pea protein concentrate induces enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture* 310, 267-273.

- Piyaratne, M. K. D. K., Atapattu, N.S.B.M., Mendis, A.P.S., Amarasinghe, A.G.C., 2009. Effects of balancing rice bran based diets for up to four amino acids on growth performance of broilers. *Trop. Agric. Res. and Ext.* 12, 57-61.
- Rinchard, J., Lee, K. J., Dabrowski, K., Ciereszko, A., Blom, J. H., Ottobre, J. S., 2003. Influence of gossypol from dietary cottonseed meal on haematology, reproductive steroids and tissue gossypol enantiomer concentrations in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.* 9, 275–282.
- Sun, H., Tang, J.W., Yao, X.H., Wu, Y.F., Wang, X., Liu, Y., Lou, B., 2015. Partial substitution of fish meal with fermented cottonseed meal in juvenile black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) diets. *Aquaculture* 446, 30–36.
- Sunde, J., Eiane, S.A., Rustad, A., Jensen, H.B., Opstvedt, J., Nygard, E., Venturini, G., Rungruangsak-Torrissen, K., 2004. Effect of fish feed processing conditions on digestive protease activities, free amino acid pools, feed conversion efficiency and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquac. Nutr.* 10, 261-277.
- Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Engkagul, A., Rungruangsak-Torrissen, K., 2013. Evaluation of growth performance and nutritional quality of diets using enzymatic markers and in vitro digestibility in Siamese fighting fish (*Betta splendens Regan*, 1910). *Afr. J. Biotechnol.* 12, 1689–1702.
- Van soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. Symposium: Carbohydrate Methodology, Metabolism and Nutritional Implications in Dairy Cattle. *J. of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
- Xu, D., He, G., Mai, K., Zhou, H., Xu, W., Song, F., 2016. Postprandial nutrient-sensing and metabolic responses after partial dietary fishmeal replacement by soybean meal in turbot (*Scophthalmus maximus L.*). *Brit. J. of Nutr.* 115, 379-388.

Ye, J., Liu, X., Wang, Z., Wang, K., 2011. Effect of partial fish meal replacement by soybean meal on the growth performance and biochemical indices of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquac. Int.* 19, 143-153.

3 ARTIGO 2²

Inclusion of rice meal protein concentrate in practical diets for silver catfish juvenile (*Rhamdia quelen*) - Impact on growth performance, plasma and hepatic biochemistry.

Bruno Bianch Loureiro^{1*}, Taida Juliana Adorian¹, Dirleise Pianesso¹, Patrícia Inês Mombach¹, Naglezi de Menezes Lovatto², Ana Betine Beutinger Bender³, Leila Picolli da Silva¹.

¹Department of Animal Science, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul. Avenue Roraima nº1000, University City, Neighborhood Camobi, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brazil.

²Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio Grande do Sul, Campus Bento Gonçalves, Avenue Osvaldo Aranha, 540, Neighborhood Juventude da Enologia, Bento Gonçalves, RS, CEP: 95700-000, Brazil.

³Farroupilha Federal Institute, Campus Frederico Westphalen, Linha 7 de Setembro, s/n - Centro, Frederico Westphalen - RS, 98400-000, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8365; fax: +55 55 3220 8240.
E-mail addresses: brunodino_zoo@hotmail.com

² Artigo submetido à revista Aquaculture

ABSTRACT

A 45-day feeding assay was carried out to evaluate the effects of different levels of rice meal protein concentrate (RMPC) on the diets of silver catfish aiming to minimize the use of fish meal (FM). The study monitored the effects of inclusion 10, 15, 20 and 30% of RMPC on growth performance, nutrient deposition, plasma and liver parameters of silver catfish. Five isonitrogenous and isocaloric diets were formulated with four replications each. A total of 500 silver catfish juveniles with initial weight of 6.28 ± 0.12 g, were distributed in 20 tanks arranged in a thermo regulated water recirculation system. Weight gain and specific growth rate data were evaluated by cubic regression analysis ($P < 0.05$) and displayed maximal growth with the inclusion of 25% RMPC in the diet. Data from the remaining parameters were subjected to Dunnett test. The results indicated that fish fed with RMPC15 and RMPC30 had lower body protein deposition and hepatosomatic index in relation to the CONTROL diet, respectively. No significant differences were assessed in plasma parameters. The activity of the ALAT enzyme was higher in fish fed RMPC30 when compared to CONTROL. In conclusion, our study has demonstrated that RMPC displayed significant nutritional quality for the silver catfish, and can be included as a protein source in the diets of fish when aiming to minimize the use of FM in fish diets.

Keywords: *Rhamdia quelen*. Protein concentrate. Nutrient deposition. Hepatic metabolism. Rice meal.

1. Introduction

Protein is the most important component in aquaculture feed; and the most often used protein source in aquaculture is fish meal (FM), due to its abundance of essential nutrients and well-balanced amino acid profile (Fernández-Gimenez et al., 2009; Nguyen et al., 2009). However, unstable production and the high price of FM have made it hard to meet the growing production demand of the aquatic feeds industry, encouraging the sector to search for alternative protein sources as FM substitute in fish diets (Tusche et al., 2012).

Therefore, finding alternative protein sources to minimize FM use in fish diets has become a global priority (Nguyen et al., 2009). The need to substitute FM with plant-based products in fish feed was recently emphasized by National Research Council (NRC, 2011) publications on fish and shrimp nutrition. One of the main alternatives for a continuous feed supply with high-quality nutrients relies on the use of vegetable raw materials (Tusche et al., 2012).

Among such alternatives, vegetal feedstuffs such as rice protein concentrate (RPC) may prove to be a valuable due to its high protein content (Palmegiano et al., 2006, 2007). Studies suggest that RPC may be a good quality high-nutrition alternative vegetable protein source when included at up to 20% in diets for shrimp (Oujifard et al., 2012), rainbow trout (Gai et al., 2012), gilthead seabream (Sánchez-Lozano et al., 2009) and blackspot seabream (Palmegiano et al., 2007; Daprà et al., 2009), as well as in diets for *European seabass* at up to 25% (Güroy et al., 2013).

In addition to the RPC, other plant protein concentrates have been tested in diets for different fish species such as pea protein concentrate for rainbow trout (Zhang et al., 2012) and gilthead sea bream (Sánchez-Lozano et al., 2011), soy protein concentrate for Atlantic

cod (Hansen et al., 2007) and canola protein concentrate for rainbow trout (Collins et al., 2012).

In Brazil, there are three thousands of fish species and several can be used for fish farming. Among such species, the silver catfish (*Rhamdia quelen*) is omnivorous (Salhi et al., 2004; Meyer and Fracalossi, 2004) and adapts easily to diets with high concentration of vegetable ingredients, which reduces production cost. Thus, there has been growing interest in Brazil for intensive cultivation and, in the coming years, the Silver Catfish could become an important source of fish grown for the domestic market.

The present study aims was to evaluate the potential of RMPC as a new ingredient in diets of silver catfish juvenile seeking formulating low-fish meal diets evaluating growth performance and metabolic responses.

2. Material and methods

2.1 Diet preparation

Five isonitrogenous (370 g/kg crude protein) and isocaloric (13.4 MJ/kg) diets were formulated with the inclusion of RMPC at either 0% (CONTROL), 10% (RMPC10), 15% (RMPC15), 20% (RMPC15) or 30% (RMPC30). The RMPC was obtained at the Fish Farming Laboratory of the Federal University of Santa Maria - Brazil (UFSM). The proximate composition of both protein sources used in the study (FM and RMPC) are presented in Table 1.

The experimental diets were prepared according to the crude protein requirements for silver catfish established by Meyer and Fracalossi (2004) and amino acids requirements established by Montes-Girao and Fracalossi (2006). The ingredients were ground, weighed

and then manually mixed until homogeneous, then water was added and diets were extruded in an EX-MICRO Lab Micro extruder (Model Extrusora EX Laboratorio, Exteec Maquinas, Campinas, Brazil), with production capacity of 15 kg of feed per hour. The extruded (4 mm) was dried in forced air stove for 24 hours at 50 °C and stored at -18 ° C. Nutrient composition, formulation and amino acid profiles of diets are presented in Table 2.

Table 1

Proximate composition and amino acid profiles of fish meal (FM) and rice meal protein concentrate (RMPC).

Items (% dry matter)	FM ^a	RMPC ^b
Dry matter	95.3	93.62
Crude protein	58.39	26.8
Ash	25.58	6.29
Crude lipid	10.55	6.12
Amino acid profile ^c (g AA/100g protein)		
Lysine	3.12	1.14
Arginine	4	2.33
Threonine	2.36	1.28
Tyrosine	1.35	0.92
Valine	2.44	1.64
Methionine	1.37	0.51
Cysteine	0.19	0.25
Isoleucine	1.75	1
Leucine	3.43	2.12
Phenylalanine	1.88	1.25
Histidine	0.96	0.57
Aspartic acid	2.58	1.9
Glutamic acid	6.25	3.81
Serine	2.23	1.42
Proline	4.64	1.5
Glycine	6.44	1.56
Alanine	4.21	1.84
Digestible energy ^d (MJ kg ⁻¹)	16.00	8.88

^a Waste tilapia flour obtained from agro-industrial cooperative of fish farming (COPISCES - Agroindustrial Cooperative Fish farming Pisces), Toledo, State of Parana, Brazil.

^b RMPC was developed in Fish Culture Laboratory of the Federal University of Santa Maria (UFSM)

^c Analyzed at the Protein Sources Laboratory (Laboratório de Fontes Proteicas (LaFoP), FEA, DEPAN, UNICAMP, Brazil).

^d Digestible energy: calculated digestible energy: [(crude protein × 5.65 × 0.85) + (fat × 9.4 × 0.9) + (carbohydrates × 4.15 × 0.7)] (adapted Meyer and Fracalossi, 2004).

2.2 Fish, experimental condition and feeding

This study was carried out at the experimental Fish Farming Laboratory at the Federal University of Santa Maria (Universidade Federal de Santa Maria— UFSM)—RS, Brazil. The fish were acquired from Peixe Paz Fish Farming, Cruz Alta, RS, Brazil.

A total of 500 silver catfish with initial mean weight of 6.28 ± 0.12 g, were evenly distributed (25 animals per tank) into 20 280-Liter polyethylene tanks with individual water inlets and outlets, connected to a water recirculating system consisting of two biological filters with gravel, backwash system, UV filter sterilizer (GreenFree™UV-2 18W) and controlled temperature. The fish were conditioned to diets and to the experimental system for seven days prior to experiment. After the acclimation period the fish were fed of the designated experimental diets for six weeks. During 45 days of the study, the fish were fed to apparent satiety, three times a day (9:00 a.m., 1:00 p.m. and 5:00 p.m.).

2.3 Water quality

During the experimental period, the water quality parameters were monitored and maintained as follows: temperature of 23.63 ± 1.76 ° C; dissolved oxygen: 6.47 ± 0.29 ppm; pH: 7.5 ± 0.23 ; total ammonia: 0.08 ± 0.04 ppm; nitrite: 0.02 ± 0.01 ppm; alkalinity: 43.50 ± 5.79 mg CaCO₃/L; and hardness: 44.17 ± 11.14 CaCO₃/L. According to Baldisserotto and Silva (2004), these parameters are within the optimum range for silver catfish *R. quelen* culture.

Table 2

Ingredients, chemical composition and essential amino acid content of the experimental diets (based on dry matter).

Content	Experimental diets				
	CONTROL	RMPC10	RMPC15	RMPC20	RMPC30
Ingredients (g kg ⁻¹)					
RMPC	0	10	15	20	30
Fish meal	400	354	331	308	262
SPC ^a	222.7	222.7	222.7	222.7	222.7
Starch	196.6	186	181	175.4	120
Soy oil	30	30	30	30	46.5
Mix vitamin/mineral ^b	30	30	30	30	30
Dicalcium phosphate	10	10	10	10	6
Monosodium glutamate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
BHT ^c	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Limestone calcitic	10	10	10	10	10
Inert ^d	97.9	54.5	32.5	11.1	-
Proximate composition (g kg ⁻¹)					
Crude protein ^e	370.1	370.1	370.1	370.1	370
Crude lipid ^e	77.6	78.8	79.5	79.9	79.6
Dry matter ^e	959.4	963	961.2	960.2	957.9
Digestible energy ^f (MJ kg ⁻¹)	13.4	13.4	13.4	13.4	13.4
Ash ^e	253.9	207	186.1	164.3	138.4
NDF ^{e,g}	202	249	267.9	282.7	299.3
NDSC ^h	57.6	64.4	57.6	63.2	70.6
Calcium ⁱ	8.1	8.1	8	8	7.4
Total phosphorus ⁱ	7.2	7.1	7.1	7.1	6.3
Amino acids ⁱ (% dry matter)					
Lysine	2.67	2.64	2.62	2.61	2.58
Arginine	3.24	3.29	3.32	3.34	3.39
Threonine	1.85	1.87	1.88	1.89	1.91
Tyrosine	1.37	1.4	1.41	1.43	1.46
Valine	2.04	2.1	2.12	2.15	2.2
Methionine + cysteine	1.23	1.24	1.24	1.24	1.25
Isoleucine	1.75	1.77	1.78	1.79	1.81
Leucine	3.13	3.19	3.21	3.24	3.29
Phenylalanine	1.93	1.97	1.99	2	2.04
Histidine	0.97	0.98	0.99	1	1.01

^a Soybean protein concentrate (60% crude protein).

^b Composition of vitamin and mineral mixture (kg): Folic Ac: 997,50 mg; Pantothenic Ac: 9975,00 mg; Biotin: 159,60 mg; Cobalt: 39,90 mg; Copper: 2800,00 mg; etoxiquin 24,78 g; ferro 19,62 g; Iodine: 120,00 mg; Manganese 5200,00 mg; niacin 19,95 g; Selenium: 119,70 mg; Vit A 1995000 UI; Vit B1 4987,50 mg; Vit B12 5985,00 mg; Vit B2 4987,50g; Vit B6 4987,50 mg; Vit C 70,00 g; Vit D3 198000,05 UI; Vit E 19950,00 UI; Vit K 997,50 mg; Zinc 28,00 g.

^c Butyl-hydroxy-toluene (antioxidant).

^d Fine sand washed.

^e Analyzed – Fish Culture Laboratory (Laboratório de Piscicultura, UFMS, Brazil).

^f Digestible energy: calculated digestible energy: [(crude protein × 5.65 × 0.85) + (fat × 9.4 × 0.9) + (carbohydrates × 4.15 × 0.7)] (adapted Meyer and Fracalossi, 2004).

^g Neutral detergent fiber (Van Soest et al., 1991).

^h NDSC (neutral detergent soluble carbohydrate) = 1000 – (crude protein + ash + fat + neutral detergent fiber + moisture).

ⁱ Calculated by analyzing the ingredients.

2.4 Sample collection and analytical methods

In the early and late 45-day experimental period, biometrics was performed to collect individual data of the animals, all of which had fasted for 24 h and were anesthetized with benzocaine (100 mg L⁻¹). Body weight (g) and total length of each animal was collected to estimate the following:

- Weight gain (WG, %):

$(\text{final weight} - \text{initial weight} \times 100 / \text{initial weight})$.

- Specific growth rate (SGR, %):

$100 \times [\ln(\text{final body weight}) - \ln(\text{initial body weight})] / \text{days of experiment}$.

- Feed conversion rate (FCR):

$\text{total feed consumption (g)} / [\text{final fish weight (g)} - \text{initial fish weight (g)}]$.

- Survival rate (SR, %):

$100 \times \text{final fish number} / \text{initial fish number}$.

Three fish were randomly selected from each tank (12 animals per experimental diet), and euthanized by overdose of benzocaine (250 mg L⁻¹) in accordance with the American Veterinary Medical Association (AVMA, 2013) to determine nutrient retention, which was calculated according to the following equations:

- Protein efficiency ratio (PER):

$\text{body weight gain (g)} / \text{protein intake (g)}$.

- Body protein deposition (g): BPD

$[\text{final weight} \times (\% \text{ final body protein} / 100)] - [\text{initial weight} \times (\% \text{ initial body protein} / 100)]$.

- Body fat deposition (g): BFD

$[\text{final weight} \times (\% \text{ final body fat} / 100)] - [\text{initial weight} \times (\% \text{ initial body fat} / 100)]$.

Crude protein was determined by the micro-Kjeldahl method (method 960.52) using the NX6.25 factor (AOAC 2000) and fat by Bligh and Dyer (1959).

2.5 Blood sampling and analysis

At the end of the experimental period, after 24 hours of fasting, three fish per tank (12 fish per experimental diet) were used for analysis of blood parameters. Blood samples were collected by puncture in the tail vein with prefilled heparin syringes and placed in refrigerated micro centrifuge tubes for plasma separation by centrifugation (1000 g, 10 min at room temperature). The plasma was stored and refrigerated (-20 °C) for analyzes of the total proteins, glucose and albumin quantified by colorimetric commercial kit (Doles®, Doles Reagents and Laboratory Equipment Ltda., Goiania, State of Goias, Brazil) and free AA level determined by Spies (1957) method.

2.6 Hepatic biochemistry analysis

After the blood sample collection, the fish were euthanized by overdose of benzocaine (250 mg L⁻¹) (AVMA, 2013). Subsequently, the animals were eviscerated and the liver for removed to calculate the hepatosomatic index (HSI%) = (weight of the liver/ weight of the whole fish) x 100. The liver samples were frozen at -20 ° C for analysis of biochemical parameters.

Liver glycogen levels were determined according to Bidinotto et al. (1998). The samples were weighed (50 mg) and KOH and ethanol (1 and 3 mL, respectively) were added for glycogen hydrolysis and precipitation. For protein analysis, the samples were heated at 100°C with KOH and centrifuged (1000xg for 10 min). Supernatant was used to determine the total protein level according to the method described by Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

To quantify the hepatic ammonia, tissue samples were homogenized by adding 10% TCA and centrifuged (1000g for 10 min) for protein flocculation. Hepatic ammonia was measured according to the technique described by Verdouw et al. (1978) protocol after ammonia reaction with phenol and hypochlorite forming a blue-colored indophenol compound.

To determine the amount of free liver AA, samples (50mg) were homogenized by adding 1 mL of a phosphate buffer (20 mM, pH 7.5) and then centrifuged (1000 x g for 10 min), the supernatant extract was used to determine amino acid concentration by colorimetry (Spies, 1957), using 1.5% ninhydrin solution in isopropyl alcohol as the color reagent.

Activity of the alanine aminotransferase Enzyme (ALAT) was determined by using colorimetric procedures following the protocols described in the kits (Doles®).

2.7 Statistical analysis

Initially, the data were checked for outlier existence. Statistical analysis was performed using SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). The experimental design was completely randomized with five treatments and four replications. The data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and means were compared to the control by the Dunnett test, except the SGR and WG results which were calculated by cubic regression analysis. Differences were considered to be significant at a probability level of $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Growth, nutrient deposition and hepatosomatic index

Throughout the trial period no mortalities were observed (SR = 100%). At the end of the experimental period, the WG and SGR parameters (Fig. 1) were fitted for cubic regression

($P=0.003$ and $P= 0.004$, respectively), which is the model used to represent WG and SGR, depending on the RMPC inclusion levels in the diet.

The fish fed the RMPC15 presented lower ($P <0.05$) BPD and fish fed with RMPC30 smaller HSI and PER when compared to the fish fed the CONTROL diet. No significant differences ($P <0.05$) were found for FCR and BFD parameters when compared to the CONTROL diet group (Table 3).

3.2. Plasmatic biochemistry

Table 4 shows the results of the plasma parameters of silver catfish juvenile fed rice meal protein concentrate. The inclusion of different values of RMPC in the experimental diets caused no change in the studied plasma parameters (proteins, glucose, albumin and free AA) of the fish the end of the experimental period.

3.3. Hepatic metabolism

No significant differences were found for the hepatic metabolism parameters evaluated: free AA, the total protein, glycogen and ammonia. However, the ALT enzyme activity was significantly higher ($P <0.05$) in fish fed the RMPC30 diet when compared to CONTROL (Table 5).

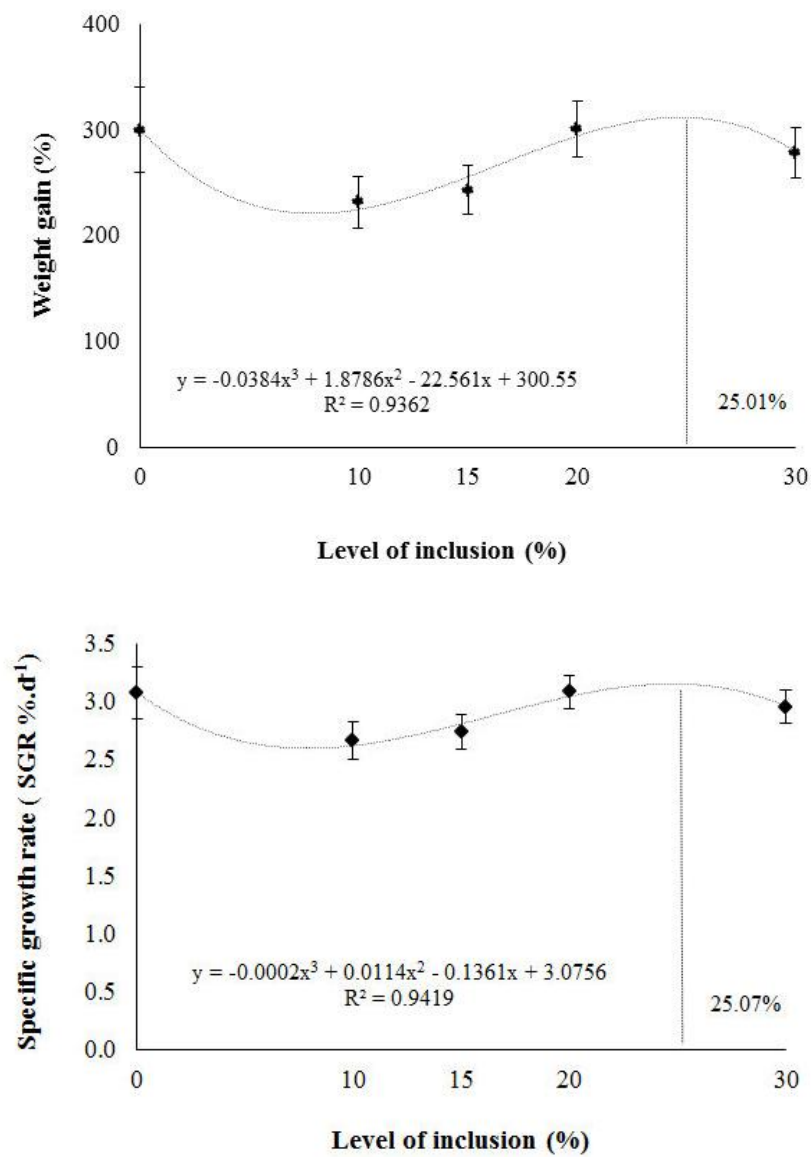


Fig.1. Regression analysis cubic of WG and SGR silver catfish juvenile (initial body weight, 6.28 ± 0.12 g) fed for 45 days diets formulated with different percentages of rice meal protein concentrate.

Table 3

Survival rate, protein retention, feed conversion ratio and hepatosomatic index of silver catfish juvenile fed for 45 days experimental diets formulated with different percentages of rice meal protein concentrate (RMPC).

Items	Experimental diets				
	CONTROL	RMPC10	RMPC15	RMPC20	RMPC30
SR ¹ (%)	100	100	100	100	100
FCR ²	1.36 ± 0.06	1.36 ± 0.02	1.43 ± 0.09	1.37 ± 0.11	1.43 ± 0.13
PER ³ (g)	1.26 ± 0.51	1.20 ± 0.14	1.15 ± 0.41	1.26 ± 0.69	1.10 ± 0.79*
BPD ⁴ (g)	2.30 ± 0.22	2.17 ± 0.17	1.68 ± 0.37*	2.18 ± 0.46	2.40 ± 0.40
BFD ⁵ (g)	1.39 ± 0.28	1.19 ± 0.19	1.08 ± 0.15	1.58 ± 0.32	1.16 ± 0.29
HSI ⁶ (%)	2.19 ± 0.06	2.18 ± 0.09	2.02 ± 0.22	1.94 ± 0.20	1.88 ± 0.12*

Values are given as mean ± standard deviation. Values (mean ± SD) in the same row with asterisks (*) differ significantly from the control by Dunnett's test (P<0.05).

¹ Survival rate (SR, %) = 100 x final fish number / initial fish number.

² Feed conversion rate (FCR) = total feed consumption (g) / (final fish weight (g) – initial fish weight (g)).

³ Protein efficiency ratio (PER) = body weight gain (g) / protein intake (g).

⁴ Body protein deposition (g): [final weight × (% final body protein / 100)] – [initial weight × (% initial body fat / 100)].

⁵ Body fat deposition (g): [final weight × (% final body fat / 100)] – [initial weight × (% IBF / 100)].

⁶ Hepatosomatic index (HSI, %) = (weight of the liver / weight of the whole fish) x 100.

Table 4

Plasma parameters of silver catfish juvenile fed for 45 days diets formulated with inclusion of different percentages of rice meal protein concentrate (RMPC).

Items	Experimental diets				
	CONTROL	RMPC10	RMPC15	RMPC20	RMPC30
Free AA ¹	2.84 ± 0.53	2.42 ± 0.29	2.61 ± 0.32	2.78 ± 0.44	2.96 ± 0.48
Protein ²	3.35 ± 0.18	3.36 ± 0.61	3.68 ± 0.22	3.68 ± 0.13	3.85 ± 0.41
Albumin ³	0.65 ± 0.18	0.78 ± 0.37	0.68 ± 0.49	0.56 ± 0.16	0.52 ± 0.12
Glucose ⁴	46.41 ± 10.96	39.06 ± 5.66	59.59 ± 15.93	58.53 ± 13.23	49.86 ± 10.28

Values are given as mean ± standard deviation. Values (mean ± SD) in the same row with asterisk (*) differ significantly from the control by Dunnett's test (P<0.05).

¹ Amino acids (mmol dL⁻¹).

² Protein (g dL⁻¹).

³ Albumin (g dL⁻¹).

⁴ Glucose (mg dL⁻¹).

Table 5

Hepatic parameters of silver catfish juvenile fed for 45 days diets formulated with the inclusion of different percentages of rice meal protein concentrate (RMPC).

Items	Experimental diets				
	CONTROL	RMPC10	RMPC15	RMPC20	RMPC30
Free AA ¹	11.92 ± 1.55	11.85 ± 2.11	12.36 ± 2.51	13.58 ± 3.26	13.89 ± 2.82
Protein ²	6.81 ± 1.86	7.29 ± 2.63	6.94 ± 3.33	7.52 ± 3.64	5.92 ± 1.46
ALAT ³	35.61 ± 5.81	35.82 ± 4.79	36.47 ± 3.92	39.75 ± 4.88	41.39 ± 3.01*
Glycogen ⁴	5.72 ± 2.05	6.78 ± 0.83	6.34 ± 1.03	6.45 ± 2.14	6.23 ± 1.61
Ammonia ⁵	6.35 ± 1.69	6.29 ± 2.06	7.07 ± 1.61	7.34 ± 1.15	7.60 ± 1.15

Values are given as mean ± standard deviation. Values (mean ± SD) in the same row with asterisk (*) differ significantly from the control by Dunnett's test (p<0.05).

¹ Amino acids, µmol/g tissue.

² Protein, mg/g tissue.

³ ALAT (alanine aminotransferase), UI/mg tissue.

⁴ Glycogen, µmol glucose/g tissue.

⁵ Ammonia, mol/g tissue.

4. Discussion

In most studies, the use of vegetable protein sources show a decrease in fish growth performance, with increasing FM substitution levels for whole soybean meal and corn gluten meal (Mundheim et al., 2004), concentrated rapeseed protein isolate (Nagel et al., 2012), soybean protein concentrate (Deng et al., 2006), corn gluten meal and wheat gluten meal (Pratoomyot et al., 2010), soybean meal (Ye et al., 2011) and rice protein concentrate (Güroy et al., 2013).

However, in our study, the highest levels of inclusion of RMPC (20 and 30%) in the diets did not result in adverse effects on growth performance (Figure 1), survival (Table 3) or plasma parameters of silver catfish (Table 4). The cubic regression analysis results for WG and SGR indicate that the level of inclusion RMPC in the diet for maximum growth was 25.01% and 25.07%, respectively (Fig. 1). Fish fed the two highest levels of RMPC inclusion

of presented WG and SGR higher than animals fed diets with the lower inclusion. These results do not agree with other studies using plant sources to replace fish meal in diets of different species of fish as gilthead sea bream (*Sparus aurata*; Sánchez-Lozano et al., 2011), black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*; Zhou et al., 2011.), European seabass (*Dicentrarchus labrax*; Güroy et al., 2013), turbot (*Psetta maxima*; Bonaldo et al., 2011) and Atlantic salmon (*Salmo salar L.*; Pratoomyot et al., 2010).

In the present study, RMPC30 diet resulted in a significant reduction of PER and HSI (Table 3) and increase in enzyme activity ALAT (Table 4) of the fish when compared to CONTROL. These results can be attributed to lower digestibility of RMPC regarding FM (data not show). Day and Gonzalez (2000) report that the reduction of PER is associated with a higher proportion of protein use in the catabolic processes (energy production) when compared to anabolic (protein synthesis), caused by higher replacement levels of animal sources protein by vegetable protein.

The reduction in the HSI with higher inclusion levels of RMPC corroborate the results obtained by Albrektsen et al. (2006), where HSI decreased as the inclusion of vegetable protein sources in the experimental diets increased. Similar results for PER and HSI have also been reported in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*; Sun et al., 2015), Juvenile turbot (*Psetta maxima L.*; Nagel et al., 2012), turbot (*Scophthalmus maximus*; Xu et al., 2016), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*; Ye et al., 2011), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*; Aksnes et al., 2006), when fed with different vegetable protein sources.

The composition of the diets affects not only the growth and the amount of nutrients within the body, but also interferes with enzyme activity of the liver. In this study, higher ALAT activity in the liver of fish fed the RMPC30 diet (Table 3) suggests increased protein catabolism and hepatic gluconeogenic activity (Metón et al., 1999; Lovatto et al., 2015.).

Increased ALAT activity may also indicate unexpected amino acid deficiencies in the diet, resulting in the use of proteins (oxidation of excess AAs) to obtain energy, affecting protein synthesis (Melo et al., 2006).

Fournier et al. (2004) observed that the increased activity of this enzyme and high ammonia excretion correlated with the reduction of PER in juvenile turbot (*Psetta maximum*) fed diets with increasing inclusion levels of vegetable protein sources (wheat gluten, lupine, corn gluten bran) as partial FM substitutes.

In our study we observed similar behavior as the RMPC30 diet yielded greater ALAT activity, lower PER and tendency to increase liver ammonia (7.60 ± 1.15 mol / g liver tissue; $P = 0.0584$), when compared to the CONTROL diet. This PER and ammonia behavior was also reported in other studies on the inclusion of vegetable protein sources as partial replacement for FM (Fournier et al., 2003; Gomez-Requeni et al., 2003).

Among the studied nutrient deposition parameters, there was a lower concentration ($P < 0.05$) BPD of fish fed RMPC15 when compared to CONTROL (Table 3), WG and SGR (Fig. 1) followed the same trend and also had lower values than the ones found with the CONTROL diet.

The inclusion of vegetable protein sources in the diet might have caused a reduction in dietary energy available for protein synthesis, leading to slower growth and nutrients deposition (Gaber, 2006). However, this behavior was not observed in other levels (10, 20 and 30%) of RMPC inclusion, when compared to Control diet.

5. Conclusion

Based on the resulting estimates from the regression model tested for the variables WG and SGR, we recommend including from 25% RMPC in silver catfish diet. The RMPC showed significant nutritional quality when aiming to reduce the use of FM and based on the parameters evaluated in this study (growth, plasma, liver and nutrients deposition) the inclusion of RMPC in the diet is feasible up to the highest level tested. Such inclusion does not affect performance negatively and causes little or no alteration in nutrient deposition, and plasma and hepatic parameters of silver catfish juvenile when compared to fish fed the CONTROL diet.

Acknowledgements

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for granting a scholarship of research productivity (Leila Picolli da Silva); CAPES for granting a Master Science scholarship (Bruno Bianch Loureiro); Cargill Alimentos Ltda, Chapecó-Brazil for donating vitamin and mineral mixture.

References

Albrektsen, S., Mundheim, H., Aksnes, A., 2006. Growth, feed efficiency, digestibility and nutrient distribution in Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed two different fish meal qualities at three dietary levels of vegetable protein sources. *Aquaculture* 261, 626–640.

- AOAC, Association of Analytical Chemists. 2000. Official methods of analysis of AOAC international, Gaithersburg, 17 edn, v. I e II.
- Association American Veterinary Medical (AVMA), 2013. Guidelines on Euthanasia. AVMA. Schaumburg, IL, USA.
- Baldisserotto, B., Silva, L. V. F., 2004. Qualidade da água. In: Criação do jundiá (Baldisserotto, B., Radunz Neto, J. eds), p. 73–94. UFSM, Santa Maria, RS.
- Bidinotto, P.M., Moraes, G., Souza, R.H.S., 1997. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. Boletim Técnico do CEPTA Pirassununga, 10, 53–60.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911–917.
- Bonaldo, A., Parma, L., Mandrioli, L., Sirri, R., Fontanillas, R., Badiani, A., Gatta, P.P., 2011. Increasing dietary plant proteins affects growth performance and ammonia excretion but not digestibility and gut histology in turbot (*Psetta maxima*) juveniles. Aquaculture 318, 101–108.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal. Biochem. 72 (1), 248–254.
- Collins, S.A., Desai, A.R., Mansfield, G.S., Hill, J.E., Van Kessel, A.G., Drew, M.D., 2012. The effect of increasing inclusion rates of soybean, pea and canola meals and their protein concentrates on the growth of rainbow trout: Concepts in diet formulation and experimental design for ingredient evaluation. Aquaculture 344–349, 90–99.
- Daprà, F., Gai, F., Costanzo, M.T., Maricchiolo, M., Micale, V., Sicuro, B., Caruso, G., Genovese, L., Palmegiano, G.B., 2009. Rice protein-concentrate meal as a potential

- dietary ingredient in practical diets for blackspot sea bream *Pagellus bogaraveo*: a histological and enzymatic investigation. *J. of Fish Biol.*, 74, 773–789.
- Day, O.J., Gonzalez, H.G.P., 2000. Soybean protein concentrate as a protein source for turbot, *Scophthalmus maximus L.* *Aquac. Nutr.* 6, 221–228.
- Deng, J., Mai, K., Ai, Q., Zhang, W., Wang, X., Xu, W., Liufu, Z., 2006. Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate on feed intake and growth of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 258, 503–513.
- Fernandez Gimenez, A.V., Diaz, A.C., Velurtas, S.M., Fenucci, J.L., 2009. In vivo and in vitro protein digestibility of formulated feeds for *Artemesia longinaris* (Crustacea, Penaeidae). *Braz. arch. biol. technol.* 52, 6, 1379–1386.
- Fournier, V., Gouillou-Coustans, M.F., Métailler, R., Vachot, C., Moriceau, J., Le Delliou, H., Huelvan, C., Desbruyères, E., Kaushik, S.J., 2003. Excess dietary arginine affects urea excretion but does not improve N utilization in rainbow *Oncorhynchus mykiss* and turbot *Psetta maxima*. *Aquaculture* 217, 559–576.
- Fournier, V., Huelvan, C., Desbruyeres, E., 2004. Incorporation of a mixture of plant feedstuffs as substitute for fish meal in diets of juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 236, 451–465.
- Gaber, M.M., 2006. The effects of plant-protein-based diets supplemented with Yucca on growth, digestibility, and chemical composition of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus, L*) fingerlings. *J. World Aquacult. Soc.* 37, 74–81.
- Gai, F.; Gasco, L.; Dapra, F.; Palmegiano, G. B.; Sicuro, B., 2012. Enzymatic and histological evaluations of gut and liver in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed with rice protein concentrate-based diets. *J. World Aquacult. Soc.* 43, 218–229.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, V., Pérez-Sánchez, J., 2004. Protein growth performance,

- amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493-510.
- Güroy D., Şahin, I., Güroy, B., Merrifield, D.L., Bulut, M., Tekinay, A.A., 2013. Replacement of fishmeal with rice protein concentrate in practical diets for European sea bass *Dicentrarchus labrax* reared at winter temperatures. *Aquac. Res.* 44, 3, 462–471.
- Hansen, A.C., Rosenlund, G., Karlsen, O., Koppe, W., Hemre, G.I., 2007. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) I—effects on growth and protein retention. *Aquaculture* 272, 599–611.
- Lovatto, N.M., Goulart, F.R., Freitas, S.T., Mombach, P.I., Loureiro, B.B., Bender, A.B.B., Boligon, A.A., Radünz Neto, J., Silva, L.P., 2015. Nutritional evaluation of phosphorylated pumpkin seed (*Cucurbita moschata*) protein concentrate in silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824), *Fish Physiol Biochem.* 41:6, 1557-1567.
- Melo, J.F.B., Lundstedt, L.M., Metón, I., Baanante, I.V., Moraes, G., 2006. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: *Pimelodidae*). *Comp. Biochem. and Physiol. Part A.* 145, 181–187.
- Metón, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Canto, E., Fernández, E., Baanantet, I.V., 1999. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis–gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br. J. Nutr.* 82, 223–232.
- Meyer, G., Fracalossi, D.M., 2004. Protein requirement of jundia fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. *Aquaculture* 240, 331–343.

- Montes-Girao, P.J., Fracalossi, D.M., 2006. Dietary lysine requirement as basis to estimate the essential dietary amino acid profile for jundiá, *Rhamdia quelen*. J. World Aquacult. Soc. 37, 388–396.
- Mundheim, H., Aksnes, A., Hope, B., 2004. Growth, feed efficiency and digestibility in salmon (*Salmo salar* L.) fed different dietary proportions of vegetable protein sources in combination with two fish meal qualities. Aquaculture 237, 315–331.
- Nagel, F., Arndt, V.D., Tusche, K., Kroeckel, S., Van Bussel, G.J., Schlachter, M., Adem, H., Tressel, R.P., Schul, C., 2012. Nutritional evaluation of rapeseed protein isolate as fish meal substitute for juvenile turbot (*Psetta maxima* L.) — Impact on growth performance, body composition, nutrient digestibility and blood physiology. Aquaculture 356–357, 357–364.
- Nguyen, T.N., Davis, D.A., Saoud, I.P., 2009. Evaluation of alternative protein sources to replace fish meal in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis* spp. J. World Aquac. Soc. 40, 113–121.
- NRC – National Research Council., 2011 Nutrients requirements of fish. The National Academy Press, Washington, D.C. 376 p.
- Oujifard, A., Seyfabadi, J., Kenari, A.A., Rezaei, M., 2012. Growth and apparent digestibility of nutrients, fatty acids and amino acids in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with rice protein concentrate as total and partial replacement of fish. Aquaculture 342-343, 56–61.
- Palmegiano, G.B., Costanzo, M.T., Daprà, F., Gai, F., Galletta, M.G., Maricchiolo, G., Micale, V., Peiretti, P.G., Genovese, L., 2007. Rice protein concentrate meal as potential dietary ingredient in practical diets for blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). J. of Animal Phys. and Animal Nutr. 91, 235–239.

- Palmelegiano, G.B., Daprà, F., Forneris, G., Gai, F., Gasco, L., Guo, K., Peiretti, P.G., Sicuro, B., Zoccarato, I., 2006. Rice protein concentrate meal as a potential ingredient in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 258, 357–367.
- Park, J.T.; Johnson, M.J., 1949. A submicro determination of glucose. *J. of Biolog. Chem.*, 181, 149-151.
- Pratoomyot, J., Bendiksen, E.Å., Bell, J.G., Tocher, D.R., 2010. Effects of increasing replacement of dietary fishmeal with plant protein sources on growth performance and body lipid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 305, 124-132.
- Salhi M., Bessonart M., Chediak G., Bellagamba M., Carnevia D., 2004. Growth, feed utilization, and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen*, fry fed diets containing different protein and energy levels. *Aquaculture* 231, 435–444.
- Sánchez-Lozano, N., Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., Jover-Cerdá, M., 2011. Amino acid retention of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed with pea protein concentrate. *Aquac. Nutr.* 17, 604-614.
- Sánchez-Lozano, N.B., Martínez-Llorens, S.M., Tomás-Vidal, A., Cerdá, M.J., 2009. Effect of high-level fish meal replacement by pea and rice concentrate protein on growth, nutrient utilization and fillet quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture* 298, 83–89.
- Spies, J.R., 1957. Colorimetric procedures for amino acids. *Method Enzymol* 3:467–477.
- Sun, H., Tang, J.W., Yao, X.H., Wu, Y.F., Wang, X., Liu, Y., Lou, B., 2015. Partial substitution of fish meal with fermented cottonseed meal in juvenile black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) diets. *Aquaculture* 446, 30–36.

- Tusche, K., Arning, S., Wuertz, S., Susenbeth, A., Schulz, C., 2012. Wheat gluten and potato protein concentrate — promising protein sources for organic farming of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 344-349, 120-125.
- Van soest, P. J.; Robertson, J. B.; Lewis, B. A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. Symposium: Carbohydrate Methodology, Metabolism and Nutritional Implications in Dairy Cattle. *J. of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
- Verdouw, H., Van Echteld, C. J. A., Dekkers, E. M. J., 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res.* 12, 6, 399-402.
- Xu, D., He, G., Mai, K., Zhou, H., Xu, W., Song, F., 2016. Postprandial nutrient-sensing and metabolic responses after partial dietary fishmeal replacement by soyabean meal in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Brit. J. of Nutr.* 115, 379-388.
- Ye, J., Liu, X., Wang, Z., Wang, K., 2011. Effect of partial fish meal replacement by soybean meal on the growth performance and biochemical indices of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquac.. Int.* 19, 143-153.
- Zhang, Y., Overland, M., Sørensen, M., Penn, M., Mydland, L.T., Shearer, K.D., Storebakken, T., 2012. Optimal inclusion of lupin and pea protein concentrates in extruded diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 344, 344-349.
- Zhou, F., Song, W.X., Shao, Q.J., Peng, X., Xiao, J.X., Hua, Y., Owari, B.N., Zhang, T.Z., Ng, W.K., 2011. Partial replacement of fish meal by fermented soybean meal in diets for black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*, juveniles. *J. World Aquac.. Soc.* 42, 184–197.

4 DISCUSSÃO GERAL

Atualmente, a escassez e o alto custo da farinha peixe, principal ingrediente utilizado na nutrição de organismos aquáticos, vem se destacando como o maior entrave na redução dos custos com a alimentação desses animais, além de causar elevados danos ao ambiente, devido à grande parte desse ingrediente ser obtido da pesca extrativa. Fato que demonstra a necessidade de buscar novas fontes de proteína, que apresentem maior viabilidade econômica, reduzido impacto ambiental e qualidade proteica semelhante ou superior à farinha de peixe. A partir disso, surge a possibilidade da utilização de coprodutos de origem vegetal gerados por agroindústrias, os quais podem ser aproveitados na alimentação de peixes, beneficiando não somente a cadeia piscícola, mas também agroindústrias e meio ambiente.

Neste estudo, o coproduto vegetal utilizado como fonte proteica foi o concentrado proteico de farelo de arroz (CPFA), o qual foi obtido do Laboratório de Piscicultura - UFSM e incorporado em diferentes níveis (0, 10, 15, 20 e 30%) nas dietas de juvenis de jundiá. Após 45 dias de alimentação foram observadas diferenças significativas em comparação à dieta Controle nos parâmetros de desempenho avaliados como PF, FC (dietas CPFA10 e CPFA15) e CDR (dieta CPFA10) (Artigo 1 – Tabela 3). O menor FC pode ser explicado pela menor espessura do filé dos animais (BONALDO et al., 2011). Lovatto et al. (2014) também encontraram menor FC quando utilizaram concentrados proteicos vegetais em dietas para jundiá, que ocorreu devido à adaptação nutricional dos peixes às dietas experimentais.

Resultados semelhantes ao baixo CDR foram encontrados por Cheng et al. (2010), os quais relataram que o aumento do consumo de ração possui relação com uma tentativa do organismo em obter mais energia devido a perda de energia digestível. Este resultado difere dos encontrados em estudos de Xu et al. (2016) e Nagel et al. (2012), onde o aumento do uso de fontes proteicas vegetais na dieta foi acompanhado pela redução do CDR.

Os maiores níveis de inclusão de CPFA (20 e 30%) nas dietas não resultaram em efeitos adversos no desempenho de crescimento (Artigo 1 – Tabela 3 e Artigo 2 - Figura 1). Os resultados da análise de regressão cúbica para ganho de peso (GP) e taxa de crescimento específico (TCE) indicaram que o nível de inclusão CPFA na dieta para o crescimento máximo foi de 25,01% e 25,07%, respectivamente (Artigo 2 - Figura 1). Os peixes alimentados com os dois níveis mais altos de inclusão do CPFA apresentaram GP e TCE maiores do que os peixes alimentados com dietas com menor inclusão. Estes resultados se opõem com outros estudos utilizando fontes vegetais para substituir a farinha de peixe em dietas de diferentes espécies de peixes como *Sparus aurata* (SÁNCHEZ-LOZANO et al.,

2011), *Acanthopagrus schlegelii* (ZHOU et al., 2011.), *Dicentrarchus labrax*, (GÜROY et al., 2013), *Psetta máxima* (BONALDO et al., 2011) e salmão do Atlântico (*Salmo salar L.*, PRATOOMYOT et al., 2010).

Não foram observadas diferenças significativas para composição centesimal do peixe inteiro (Artigo 1 – Tabela 4), pois todas as dietas foram formuladas para suprir as exigências nutricionais da espécie estudada. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Hansen et al. (2007), Cheng et al. (2010) e Ye et al. (2011) onde a composição centesimal não apresentou nenhuma alteração pelos diferentes níveis de inclusão de fonte proteica vegetal nas dietas. No entanto, esses resultados diferem com os encontrados por Gaber (2006) e Lovatto et al. (2014), onde os níveis de inclusão dos concentrados proteicos influenciaram na composição corporal.

Entre os parâmetros de deposição de nutrientes avaliados, houve uma menor deposição de proteína corporal (DPC) nos peixes alimentados com CPFA15 quando comparado a dieta Controle (Artigo 1 - Tabela 3), a deposição de gordura corporal (DGC), GP e TCE seguiram a mesma tendência e também apresentaram valores mais baixos do que os encontrados na dieta controle. A inclusão de fontes de proteína vegetal na dieta pode ter causado uma redução da energia da dieta disponível para a síntese de proteínas, levando a um crescimento mais lento e deposição nutrientes (GABER, 2006). No entanto, esse comportamento não foi observado em outros níveis (10, 20 e 30%) de inclusão do CPFA.

A inclusão de diferentes valores de CPFA nas dietas experimentais não causou alteração dos parâmetros plasmáticos (Artigo 2 – Tabela 4) analisados ao final do período experimental, indicando que a semelhança de resultado de proteínas totais circulantes demonstra que a proteína ofertada foi utilizada e metabolizada de maneira adequada, sem afetar a síntese hepática (MARKS et al., 2007; LOVATTO et al., 2015).

No entanto, a maior atividade de ALT hepática nos peixes que receberam a dieta CPFA30 sugere aumento do catabolismo de proteínas e atividade gliconeogênica hepática (MÉTTON et al., 1999; LOVATTO et al., 2015). Esse aumento pode também indicar a deficiência inesperada de aminoácidos na dieta, o que resulta na utilização de proteínas (de oxidação em excesso de AA) para obter energia, que afetam a síntese de proteínas (MELO et al., 2006). Contudo, não foram encontradas diferenças nos parâmetros hepáticos avaliados (Artigo 2 - Tabela 5) (aminoácidos livres, proteínas totais, glicogênio e amônia). Fournier et al. (2004) observaram o aumento da atividade da enzima ALT e alta excreção de amônia correlacionada com a redução do TEP em juvenis de *Psetta maximum* alimentados com rações

contendo níveis crescentes de fontes de proteína vegetal (glúten de trigo, tremçoço, farelo de glúten de milho) como substitutos parciais da farinha de peixe.

Peixes alimentados com a dieta CPFA30 apresentaram redução significativa da taxa de eficiência proteica (TEP) e índice hepatosomático (IHS) (Artigo 2 - Tabela 3), quando comparados ao controle. Estes resultados podem ser atribuídos a digestibilidade inferior do CPFA em relação à farinha de peixe (dados não mostrados). A redução da TEP está associada à proporção mais elevada de utilização de proteínas nos processos catabólicos (produção de energia) quando comparado em à síntese proteica (DAY e GONZÁLEZ, 2000).

Não houve alterações no IDS, QI e IGV em relação ao grupo da dieta controle (Artigo 1 – Tabela 5). Segundo Pedron (2006), esses índices são indicativos de adaptação do trato gastrointestinal a partir do alimento ingerido demonstrando que os peixes adaptaram-se as dietas contendo diferentes níveis de CPFA. A redução do IHS com níveis mais elevados de inclusão CPFA corroboram os resultados obtidos por Albrektsen et al. (2006), onde IHS diminuiu à medida que a inclusão de proteínas vegetais nas dietas aumentaram. A composição das dietas não só afeta o crescimento e a quantidade de nutrientes no interior do corpo, mas também interfere na atividade da enzima do fígado.

Nos últimos anos, muitos avanços já foram realizados no campo da nutrição de organismos aquáticos, sendo o principal deles a redução dos níveis de farinha de peixe das dietas pela substituição por fontes proteicas vegetais. Contudo, esses avanços nutricionais ainda não foram suficientes para diminuir significativamente a utilização dessa fonte animal, que acompanha a crescente expansão mundial da aqüicultura resultando na maior necessidade de seu uso.

Dessa maneira, pode-se inferir que estudos com novos ingredientes vegetais, que apresentam potencial de produção em escala industrial, devem avaliar o crescimento, metabolismo e atividade de enzimas digestivas nos peixes, a fim de esclarecer o comportamento desse ingrediente no organismo animal.

5 CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados obtidos, é possível observar que a inclusão de 20% de CPFA na dieta não alterou nenhum dos parâmetros analisados neste estudo, demonstrando desempenho de crescimento superior ao controle e as demais dietas, assim como a significativa qualidade nutricional do CPFA. Portanto, a inclusão de 20% de CPFA pode ser utilizada em dietas para jundiás, como ingrediente proteico alternativo para reduzir o uso da farinha de peixe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSNES A. et al. Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. **Aquaculture**, 261, 305–317, 2006.
- ALBREKTSSEN, S., MUNDHEIM, H., AKSNES, A. Growth, feed efficiency, digestibility and nutrient distribution in Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed two different fish meal qualities at three dietary levels of vegetable protein sources. **Aquaculture**, v. 261, p. 626–640, 2006.
- BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Criação do jundiá**. Santa Maria: UFSM, 2004. 232 p.
- BAUER, W. et al. Substitution of fish meal with microbial flocc meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 342-343, p. 112-116, 2012
- BONALDO, A. et al. Increasing dietary plant proteins affects growth performance and ammonia excretion but not digestibility and gut histology in turbot (*Psetta maxima*) juveniles. **Aquaculture**, v. 318, p. 101–108, 2011.
- CABRAL, E. M. et al. Replacement of fishmeal by increasing levels of plant protein blends in diets for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. **Aquaculture**, v. 322-323, p. 74–81, 2011.
- COLLINS, S. A. et al. The effect of increasing inclusion rates of soybean, pea and canola meals and their protein concentrates on the growth of rainbow trout: Concepts in diet formulation and experimental design for ingredient evaluation. **Aquaculture**, v. 344–349, p. 90–99, 2012.
- CHENG, Z. et al. Effects of dietary canola meal on growth performance, digestion and metabolism of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Aquaculture**, v. 305, p. 102-108, 2010
- DAPRÀ, F. et al. Rice protein concentrate meal as a potential dietary ingredient in practical diets for blackspot seabream *Pagellus bogaraveo*: a histological and enzymatic investigation. **Journal of Fish Biology**, 74, 773–789, 2009
- DAVIS, D. A.; MILES, R. D. Maximize a eficiência da ração mediante o manejo adequado da proteína. **Revista da ABCC**, v.2, p. 60-63, 2001
- DAY, O. J., GONZÁLEZ, H. G. P. Soybean protein concentrate as a protein source for turbot *Scophthalmus maximus* L. **Aquaculture Nutrition**, v. 6, p. 221–228, 2000
- DIEMER, O. et al. Níveis de fósforo total na alimentação de juvenis de jundiá criados em tanques-rede. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 4, p. 559-563, 2011.

EL-SAYED, A. F. M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis spp.* **Aquaculture**, v. 179, n. 1–4, p. 149-168, 1999.

EL-SAIDY, D.; SAAD, A. S. Effects of partial and complete replacement of soybean meal with cottonseed meal on growth, feed utilization and hematological indexes for mono-sex male Nile tilapia, (*Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 351-359, 2011.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). **The state of World Fisheries and Aquaculture**. Roma SOFIA, p. 24 – 26, 2012.

FASAKIN, E. A.; SERWATA, R. D.; DAVIES, S. J. Comparative utilization of rendered animal derived products with or without composite mixture of soybean meal in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*) diets. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 249, p. 329-338, 2005.

FRACALOSSO, D. M. et al. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil, **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 345-352, 2004.

FOURNIER, V., HUELVAN, C., DESBRUYERES, E. Incorporation of a mixture of plant feedstuffs as substitute for fish meal in diets of juvenile turbot (*Psetta maxima*). **Aquaculture**, v. 236, p. 451–465, 2004.

FORSTER, I. P.; DOMINY, W.; TACON, A. G. The use of concentrates and other soy products in shrimp feeds. In: Avances em Nutricion Acuicola VI. **Memorias del VI Simposium Internacional de Nutricion Acuicola**, Cancun, México, p. 528-540, 2002

GABER, M. M. Partial and complete replacement of fish meal by broad bean meal in feeds for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L., fry. **Aquaculture Research**, v. 37, p. 986- 993, 2006.

GATLIN, D. M. et al. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 551-579, 2007.

GOMIERO, L. M.; SOUZA, U. P.; BRAGA, F. M. S. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia. **Biota Neotropica**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 127-133, 2007.

GÜROY D. et al. Replacement of fishmeal with rice protein concentrate in practical diets for European sea bass *Dicentrarchus labrax* reared at winter temperatures. **Aquaculture Research**, v. 44, p. 462–471, 2013

HABIBA, R. A. Changes in anti-nutrients, protein solubility, digestibility, and HCl extractability of ash and phosphorus in vegetable peas as affected by cooking methods. *Food Chemistry*, vol. 77, n. 2, p. 187-192, 2002.

HALVER, J.E.; HARDY, R.W. Nutrient flow and retention In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Eds.) **Fish nutrition**. 3.ed. San Diego: Elsevier Science, p. 756-769, 2002.

HANSEN, A.C. et al. Total replacement of fish meal with plant proteins in diets for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I - effects on growth and protein retention. **Aquaculture**, v. 272, p. 599–611, 2007.

HARDY, R.W. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 770–776, 2010.

KAUSHIK S. J.; HEMRE G. I. Plant proteins as alternative sources for fish feed and farmed fish quality. In: Improving Farmed Fish Quality and Safety. **Woodhead Publishing Limited**, CRC Press, Cambridge, UK, p. 300–319, 2008.

LARSEN, B. K.; DALSGAARD, J.; PEDERSEN, P. B. Effects of plant proteins on postprandial, free plasma amino acid concentrations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 326–329, p. 90–98, 2012.

LARSEN, J.; RONEY J. M. Farmed fish production overtakes beef. In: Earthy Policy Intitute. Washington, 2013. Disponível em: <http://www.earth-policy.org/plan_b_updates/2013/update114>. Acesso em: 20 de dezembro de 2015.

LAZZARI, R. et al. Diferentes fontes protéicas para a alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, 2006.

LEHNINGER A. L.; NELSON D. L.; COX M. M. **Principles of Biochemistry**, Fourth Edition Nova York: W. H. Freeman, 2004, 1119 p.

LOVATTO, N. M. **Metabolismo e eficiência zootécnica de jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com concentrados proteicos vegetais**. 2012. 92 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2012.

LOVATTO, N. M. et al. Efeitos de dietas contendo concentrados proteicos vegetais no desempenho e atividade de enzimas digestivas de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Semina: Ciências Agrárias (Online)**, v. 35, p. 1071-1081, 2014.

LOVATTO, N. M. et al. Nutritional evaluation of phosphorylated pumpkin seed (*Cucurbita moschata*) protein concentrate in silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824), **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41:6, p. 1557-1567, 2015.

LIU, X. et al. Partial replacement of fish meal with peanut meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 745–755, 2012.

LUNDSTEDT, L. M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 137B, p. 331-339, 2004.

MARIOD, A. A.; FATHY, S. F.; ISMAIL, M. Preparation and characterisation of protein concentrates from defatted kenaf seed. **Food Chemistry**, v. 123, p. 747–752, 2010.

MARKS, A.D.; SMITH, C.; LIEBERMAN, M. **Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach**, 2nd Edition Colleen, 2007, 920p.

- MELO, J. F. B. et al. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: *Pimelodidae*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 145, p. 181–187, 2006.
- METÓN, I. et al. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **British Journal of Nutrition**, v. 82, p. 223–232, 1999.
- MILLWARD, D. J. The nutritional regulation of muscle growth and protein turnover **Aquaculture**, The Netherlands, v.79 p.1-58, 1989.
- MODESTI, C. F. et al. Caracterização de concentrado protéico de folhas de mandioca obtido por precipitação com calor e ácido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 27, n. 3, p. 464-469, 2007.
- NAGEL, F. et al. Nutritional evaluation of rapeseed protein isolate as fish meal substitute for juvenile turbot (*Psetta maxima L.*) - Impact on growth performance, body composition, nutrient digestibility and blood physiology. **Aquaculture**, v. 356–357, p. 357–364, 2012.
- NAYLOR, R. L. et al. Feeding aquaculture in an era of finite resources. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS**, v. 106, n. 36, p. 15103–15110, 2009.
- NGANDZALI, B. O. et al. Effect of dietary replacement of fish meal by soybean protein concentrate on growth performance and phosphorus discharging of juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, p. 526–535, 2011.
- NUNES, A. J. P.; SÁ, M. V. C.; NETO, H. S. As próximas gerações de ração para camarão marinho. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 21, n. 123, p. 24-35, jan–fev, 2011.
- NYINA-WAMWIZA, L. et al. Partial or total replacement of fish meal by local agricultural by-products in diets of juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*): growth performance, feed efficiency and digestibility. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, p. 237-247, 2010.
- OUIJIFARD, A. et al. Growth and apparent digestibility of nutrients, fatty acids and amino acids in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with rice protein concentrate as total and partial replacement of fish. **Aquaculture**, v. 342-343, 56–61, 2012.
- OLIVEIRA, A. M. B. M. S. **Substituição de fontes protéicas de origem animal por fontes protéicas de origem vegetal em rações para o “black bass” *micropterus salmoides***. 2003. 121 p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2003.
- OGUNWOLU, S. O. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale L.*) nut. **Food Chemistry**, v. 115, p. 852-858, 2009.
- PALMEGIANO, G. B. et al. Rice protein concentrate meal as potential dietary ingredient in practical diets for blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, p. 235–239, 2007.

PALMEGIANO, G. B. et al. Rice protein concentrate meal as a potential ingredient in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 258, p. 357–367, 2006.

PEDRON, F. A. **Fibra na alimentação do jundiá** (*Rhamdia quelen*). 2006, 64 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

PENNY, C. Proteins – The essential ingredients. **Journal of Food Ingredients and Processing International**, v. 34, p. 14–19, 1999.

PEZZATO, L. E. Alimentos convencionais e não-convencionais disponíveis para indústria da nutrição de peixes no Brasil. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS**, 1995, Campos de Jordão. Anais Campos de Jordão: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-Universidade de São Paulo (ESALQ), p. 34-52, 1995.

PORTZ, L.; FURUYA, W. M.. (Org.). Energia, Proteína e Aminoácidos. In:FRACALOSSI, D.M. e CYRINO, J.E.P. **Nutriaqua: Nutrição e Alimentação de Espécies de Interesse para Aquicultura Brasileira**. Ed. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Florianópolis, Brasil, p. 65, 2013.

PRATOOMYOT, J. et al. Effects of increasing replacement of dietary fishmeal with plant protein sources on growth performance and body lipid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 305, p. 124-132, 2010.

RAMOS, L. R. V. **Substituição da farinha de peixe pelo farelo de soja em dietas para *Mugil platanus*: estudos sobre o crescimento, composição corporal e viabilidade econômica**. 2011. 46 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)-Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2011)

RIBEIRO, P. A. P.; MELO, D. C.; COSTA, L. S.; TEIXEIRA, E. A. **Manejo nutricional e alimentar de peixes de água doce**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2012. v. 1. 89 p.

RINCHARD, J. et al. Influence of gossypol from dietary cottonseed meal on haematology, reproductive steroids and tissue gossypol enantiomer concentrations in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Nutrition**, v. 9, p. 275–282, 2003.

RODRIGUES, A. P. O. et al. Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 18, p. 65-72, 2012.

SÁNCHEZ-LOZANO, N. B. et al. Amino acid retention of gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) fed with pea protein concentrate. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, p. 604-614, 2011.

SÁNCHEZ-LOZANO, N. B. et al. Effect of high-level fish meal replacement by pea and rice concentrate protein on growth, nutrient utilization and fillet quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). **Aquaculture**, v. 298, p. 83–89, 2009.

SANTIGOSA, E. et al. Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and seabream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. **Aquaculture**, v. 282, p. 68–74, 2008.

SANTIGOSA, E. et al. Modifications of intestinal nutrient absorption in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources in seabream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 317, p. 146-154, 2011.

SALZE, G. et al. Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**, v. 298, p. 294–299, 2010.

SOARES, M. **Avaliação do desempenho zootécnico do camarão branco do Pacífico com dietas com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe por concentrado proteico de soja**. 2014. 66 p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2014.

SMITH, A. K.; JOHNSON, V. L.; BECKEL, A. C. Linseed proteins alkali dispersion and acid precipitation. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 38, p. 353- 356, 1946.

STECH, M. R.; CARNEIRO, D. J.; PIZAURO JÚNIOR, J. M. 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**, v. 13, n. 2, p. 79-93, 2009.

SOARES, M. et al. Replacement of fish meal by protein soybean concentrate in practical diets for Pacific white shrimp. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 44, n.10, p. 343-349, 2015

SUN, H. et al. Partial substitution of fish meal with fermented cottonseed meal in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) diets. **Aquaculture**, v. 446, p. 30–36, 2015

TACON, A. G. J. et al. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, p. 121-137, 2002.

TANG, S. et al. Protein Extraction from Heat-stabilized Defatted Rice Bran: II. The Role of Amylase, Celluclast, and Viscozyme. **Food Chemistry and Toxicology (JFS)**, v. 68, n. 2, 2003.

TEIXEIRA, E. A. et al.. Substituição de farinha de peixes em rações para peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3-4, p. 118-125, jul./dez. 2006.

VEIVERBERG, C. A. **Alimentos convencionais e não-convencionais na engorda e qualidade de pescado do jundiá (*Rhamdia quelen*)**. 2011. 90 p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2011.

YE, J. et al. Effect of partial fish meal replacement by soybean meal on the growth performance and biochemical indices of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture International**, v. 19, p. 143-153, 2011.

WILSON, R. P. Aminoacids and Protein. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W (Org.). **Fish Nutrition**. 3. ed., New York: Academic Press, 2002, cap. 3, p. 144-175.

XU, D. et al. Postprandial nutrient-sensing and metabolic responses after partial dietary fishmeal replacement by soyabean meal in turbot (*Scophthalmus maximus L.*). **British Journal of Nutrition**, v. 115, p. 379-388, 2016.

ZHOU, F. et al. Partial replacement of fish meal by fermented soybean meal in diets for black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*, juveniles. **Journal World Aquaculture Society**, v. 42, p. 184–197, 2011.

ANEXO A – Instruções para submissão de trabalhos na revista Aquaculture - Artigo 1 e Artigo 2

Introduction

Types of paper

Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere. Articles are expected to contribute new information (e.g. novel methods of analysis with added new insights and impacts) to the knowledge base in the field, not just to confirm previously published work. **Review Articles** can cover either narrow disciplinary subjects or broad issues requiring interdisciplinary discussion. They should provide objective critical evaluation of a defined subject. Reviews should not consist solely of a summary of published data. Evaluation of the quality of existing data, the status of knowledge, and the research required to advance knowledge of the subject are essential. **Short Communications** are used to communicate results which represent a major breakthrough or startling new discovery and which should therefore be published quickly. They should not be used for preliminary results. Papers must contain sufficient data to establish that the research has achieved reliable and significant results. **Technical Papers** should present new methods and procedures for either research methodology or culture-related techniques. **The Letters to the Editor** section is intended to provide a forum for discussion of aquacultural science emanating from material published in the journal.

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals, <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines.** More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

If the manuscript to be submitted was previously rejected by *Aquaculture* or another journal, it is necessary to specify what substantive new work and/or revisions have been included to elevate the manuscript's quality for consideration by *Aquaculture*.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be

reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups

through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).

- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is **USD 3600**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy:<https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. This journal has an embargo period of 24 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors should avoid responding by messages received from the system using the 'Reply' button on their e-mail message; this will send the message to the system support and not to the editorial office, and will create unnecessary load of sorting out and forwarding

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/aqua/>

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Preparation

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class *elsarticle.cls* (<http://www.ctan.org/tex-archive/macros/latex/contrib/elsarticle>) to prepare your manuscript and BibTeX (<http://www.bibtex.org>) to generate your bibliography. For detailed submission instructions, templates and other information on LaTeX, see <https://www.elsevier.com/latex>.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Numbering.** Manuscripts that are sequentially numbered (e.g., I, II, etc.) are no longer accepted.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon

abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should be not longer than 400 words.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 4-6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Highlights of the manuscript

As part of the submission process, authors are required to provide 3 or 4 highlights, each one sentence long. Beyond stating key discoveries, these highlights must explicitly establish why the work is novel and why it has an application to aquaculture. It is not sufficient to state that the species is one that is farmed.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.
2. All biota (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the

National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** Note that in the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺ and not Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ¹⁸O. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g., phosphate as P₂O₅).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman,

Symbol, or use fonts that look similar.

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be

automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:
<http://open.mendeley.com/use-citation-style/aquaculture>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Journal Abbreviations Source

Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database:

xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

See <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. For instructions please go to <https://www.elsevier.com/interactiveplots>.

Submission

checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes.

Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).