

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

**FARELOS DE ARROZ DESFITINIZADOS NA
NUTRIÇÃO DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cristiano Costenaro Ferreira

Santa Maria, RS, Brasil

2011

**FARELOS DE ARROZ DESFITINIZADOS NA NUTRIÇÃO DE
JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

por

Cristiano Costenaro Ferreira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia.

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

Santa Maria, RS, Brasil,

2011

F383f Ferreira, Cristiano Costenaro
Farelos de arroz desfitinizados na nutrição de jundiá (*Rhamdia quelen*) / por
Cristiano Costenaro Ferreira. – 2011.
64 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Leila Picolli da Silva

Coorientador: João Radünz Neto

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de
Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, RS, 2011

1. Zootecnia 2. Desfitinização 3. Fitase 4. Metabolismo 5. Fósforo
I. Silva, Leila Picolli da II. Radünz Neto, João III. Título.

CDU 639.3.043

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109
Biblioteca Central UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**FARELOS DE ARROZ DESFITINIZADOS NA NUTRIÇÃO DE JUNDIÁ
(*Rhamdia quelen*)**

elaborada por
Cristiano Costenaro Ferreira

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA

João Radünz Neto, Dr. (UFSM)
(Presidente)

Leonardo José Gil Barcellos, Dr. (UPF)

Marcos Martinez do Vale, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 24 de Fevereiro de 2011.

Aos meus pais Renato e Vilma

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado a capacidade de trabalhar e disponibilizado os recursos necessários (família, mestres e amigos) para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais Renato e Vilma que com o suor de seus trabalhos investiram e investem no estudo, meu e de minhas irmãs, sem medir esforços, além dos valiosos conselhos para a tomada de decisões importantes e resolução de problemas.

Às minhas irmãs Patrícia e Jéssica pela amizade e momentos de descontração quando eu aparecia por casa.

À minha noiva Marcelle que, fazendo parte da minha vida, presenciou todas as alegrias e angústias que um mestrado pode proporcionar. Seus conselhos e carinho me mantiveram centrado nos objetivos. Esta conquista também é sua!

À professora Leila pela amizade, orientação e ensinamentos que com certeza auxiliaram na minha formação pessoal e profissional.

Ao professor Radünz pela amizade e exemplo de caráter para mim e para todos os que passam pela piscicultura.

Aos amigos do Laboratório de Piscicultura que foram a base de toda a execução da pesquisa, em especial aos bolsistas Marco, Suzi e Gobe que me auxiliaram mais diretamente e em quem pude confiar parte das análises.

À Edi Franciele Ries que prestou grande auxílio nas análises de minerais.

À professora Ione Denardin que tem sido uma grande amiga e apoiadora.

Ao CNPq pela concessão de bolsa por todo o período do mestrado.

À BASF pela doação da enzima fitase Natuphos[®] e à INGAL pelo fornecimento do farelo de arroz com ácido fítico extraído.

À Doles[®] que facilitou a minha vida com a praticidade dos kits de análises.

A todos que de alguma forma contribuíram para que esta etapa tivesse início e fosse concluída, meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigado!

*“Quem diz que a vida só traz desilusão,
é porque nunca fez nada a não ser se iludir.”*

Francisco Cândido Xavier

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

FARELOS DE ARROZ DESFITINIZADOS NA NUTRIÇÃO DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

AUTOR: Cristiano Costenaro Ferreira

ORIENTADOR: Leila Picolli da Silva

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de Fevereiro de 2011.

Essa pesquisa foi realizada com o propósito de avaliar o desempenho, metabolismo, deposição de minerais nos ossos e excreção de fósforo nas fezes de juvenis de jundiá alimentados com farelo de arroz desengordurado do qual o ácido fítico foi extraído ou degradado. Os experimentos de avaliação do desempenho e metabolismo e de coleta de fezes foram conduzidos em sistema de recirculação de água com temperatura controlada. No primeiro experimento, durante 60 dias, avaliou-se o desempenho de 300 juvenis de jundiá ($13,36 \pm 1,20\text{g}$) alimentados com quatro rações experimentais, isoprotéicas e isoenergéticas, que formaram os tratamentos: CONT – composta por ingredientes convencionais; FADE – com 20% de farelo de arroz desengordurado; FADFIT – com 20 % de farelo de arroz desengordurado tratado com 1500 FTU de fitase/kg de farelo; FADEX – com 20% de farelo de arroz desengordurado com ácido fítico extraído, em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento. No segundo experimento, a coleta de fezes foi realizada pelo sistema Guelf, utilizando-se 240 juvenis de jundiá ($52,15 \pm 8,42\text{g}$) dispostos em incubadoras (200L) com registros e tubos de falcon na parte inferior, tendo duração de 17 dias. Não foram verificadas diferenças no crescimento e composição do peixe inteiro, exceto para gordura corporal que foi maior nos jundiás alimentados com FADEX que com FADFIT. Com relação ao metabolismo, verificou-se que a dieta CONT proporciona baixo estoque de glicogênio e que FADE e FADFIT causaram maior mobilização dessas reservas corporais comparado ao FADEX. Maior deposição de fósforo foi verificada nos ossos dos jundiás alimentados com FADEX. No entanto, os farelos desfitinizados não influenciaram significativamente a excreção desse mineral. Nas condições dessa pesquisa, conclui-se que a degradação ou extração do ácido fítico não influenciou o crescimento, apesar de modificar o metabolismo. O uso de fosfato bicálcio, devido à extração do ácido fítico, promoveu maior deposição de fósforo nos ossos dos jundiás, não afetando a excreção de fósforo via fezes.

Palavras chave: desfitinização; fitase; fósforo; metabolismo

ABSTRACT

Animal Science Master Dissertation
Post-Graduate Program in Animal Science
Federal University of Santa Maria

DEPHYTINIZED DEFATTED RICE BRAN IN SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*) NUTRITION

AUTHOR: Cristiano Costenaro Ferreira

ADVISER: Leila Picolli da Silva

Date and Defense Place: Santa Maria, February 24th, 2011.

This survey was conducted for the purpose of evaluating the performance, metabolism, bone mineral deposition and phosphorus excretion in feces of *Rhamdia quelen* juvenile fed with defatted rice bran which phytic acid was extracted or degraded. The experiments for evaluating the performance and metabolism and fecal collection were conducted in recirculating water system with controlled temperature. The first trial for 60 days, we evaluated the performance of 300 juvenile catfishes (13.36 ± 1.20 g) fed four experimental diets were isonitrogenous and isocaloric, which formed the treatments: CONT - comprised of conventional ingredients; FADE - with 20% defatted rice bran; FADFIT - with 20% defatted rice bran treated with 1500 FTU phytase / kg of bran; FADEX - with 20% defatted rice bran with phytic acid extracted in a randomized design with three replicates per treatment. In the second experiment, the fecal collection was conducted by Guelph system, using 240 silver catfish juveniles (52.15 ± 8.42 g) placed in incubators (200L) with stopcock and falcon tubes at the bottom, lasting 17 days. No significant difference in growth and composition of whole fish, except for body fat was higher in the catfishes fed with FADEX than FADFIT. With respect to metabolism, it was found that CONT diet provides low glycogen stores and that FADE and FADFIT diets caused higher mobilization of these body reserves compared to FADEX. Increased deposition of phosphorus was found in the bones of fishes fed with FADEX. However, dephytinized rice brans did not influence the excretion of this mineral. Under the conditions of this research, we conclude that the degradation or extraction of phytic acid did not affect growth, although modifying the metabolism. The use of dicalcium phosphate, due to the extraction of phytic acid, promoted higher deposition of phosphorus in the bones of the catfishes, but did not influence the mineral excretion via feces.

Key words: dephytinization; phytase; phosphorus; metabolism

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Glicogênio e atividade de alanina aminotransferase hepáticos dos juvenis de jundiá..... | 38 |
| FIGURA 2 – Representação gráfica dos níveis de glicogênio hepáticos e glicose sangüínea dos juvenis de jundiá nos diferentes tratamentos..... | 40 |
| FIGURA 3 – Teores de cálcio e fósforo no plasma de juvenis de jundiá aos 60 dias experimentais | 42 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 – Ingredientes e composição bromatológica das dietas fornecidas aos juvenis de jundiá durante 60 dias. | 26 |
| TABELA 2 – Composição bromatológica dos farelos de arroz desengordurado sem tratamento, incubado com fitase e ácido fólico extraído..... | 27 |
| TABELA 3 – Valores médios dos parâmetros de qualidade da água durante os 60 dias de avaliação de desempenho e 17 dias de coleta de fezes..... | 33 |
| TABELA 4 – Desempenho de juvenis de jundiá após 60 dias de alimentação com ração contendo ingredientes convencionais, farelo de arroz desengordurado, farelo de arroz desengordurado tratado com fitase ou farelo de arroz desengordurado ácido fólico extraído | 34 |
| TABELA 5 – Composição corporal de juvenis de jundiá após 60 dias de alimentação com ração contendo ingredientes convencionais, farelo de arroz desengordurado, farelo de arroz desengordurado tratado com fitase ou farelo de arroz desengordurado ácido fólico extraído | 36 |
| TABELA 6 – Metabólitos e relação cálcio:fósforo sanguíneos de juvenis de jundiá aos 60 dias experimentais 16 horas após a alimentação. | 37 |
| TABELA 7 – Proteínas totais no fígado e aspartato aminotransferase hepáticos de juvenis de jundiá aos 60 dias experimentais 16 horas após a alimentação. | 39 |
| TABELA 8 – Minerais nos ossos de juvenis de jundiá alimentados com ração contendo ingredientes convencionais, farelo de arroz desengordurado, farelo de arroz desengordurado tratado com fitase ou farelo de arroz desengordurado ácido fólico extraído | 42 |
| TABELA 9 – Fósforo e matéria mineral nas fezes de juvenis de jundiá alimentados com ração contendo ingredientes convencionais, farelo de arroz desengordurado, farelo de arroz desengordurado tratado com fitase ou farelo de arroz desengordurado ácido fólico extraído | 44 |

LISTA DE APÊNDICES

| | |
|--|-----------|
| APÊNDICE A – Análise de cálcio e fósforo nos ossos | 58 |
| APÊNDICE B – Determinação de fósforo nas fezes e ingredientes | 60 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|-----------|
| ANEXO 1 – Detalhe das placas ósseas do crânio utilizadas nas análises de minerais..... | 62 |
| ANEXO 2 – Registro com tubo de falcon acoplado na parte inferior da incubadora..... | 62 |
| ANEXO 3 – Incubadoras de fibra de vidro e tanques de polipropileno utilizados para a pesquisa..... | 63 |
| ANEXO 4 – Jundiás dentro da incubadora sobre a tela impedindo o contato e revolvimento das fezes..... | 63 |
| ANEXO 5 – Isopores com gelo para evitar a proliferação bacteriana..... | 64 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: aminoácido

ADP: adenosina difosfato

ALT: alanina aminotransferase

AMP: adenosina monofosfato

AST: aspartato aminotransferase

ATP: adenosina trifosfato

CONT: ração controle

FADEX: farelo de arroz desengordurado ácido fítico extraído

FADE: farelo de arroz desengordurado

FADFIT: farelo de arroz desengordurado tratado com fitase

FAI: farelo de arroz integral

FTU: unidades de fitase ativa

IP6: inositol hexakisfosfato, ácido fítico

Pi: fósforo inorgânico

TCE: taxa de crescimento específico

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 17 |
| 2.1 | Geral..... | 17 |
| 2.2 | Específicos | 17 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 3.1 | Jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) | 18 |
| 3.2 | Farelo de Arroz..... | 19 |
| 3.3 | Ácido fítico | 20 |
| 3.4 | Fitase..... | 21 |
| 3.5 | Outras formas de tratamento para retirada do ácido fítico | 23 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 4.1 | Avaliação do desempenho..... | 25 |
| 4.1.1 | Animais e instalações | 25 |
| 4.1.2 | Tratamentos..... | 26 |
| 4.1.2.1 | Incubação do farelo de arroz desengordurado com fitase..... | 27 |
| 4.1.3 | Manejo experimental..... | 28 |
| 4.1.4 | Parâmetros analisados | 28 |
| 4.1.4.1 | Desempenho | 29 |
| 4.1.4.2 | Composição peixe inteiro | 29 |
| 4.1.4.3 | Metabólitos e eletrólitos sanguíneos | 29 |
| 4.1.4.4 | Metabólitos e transaminases hepáticas..... | 30 |
| 4.1.4.5 | Minerais nos ossos..... | 30 |
| 4.2 | Coleta das fezes..... | 30 |
| 4.2.1 | Animais e instalações | 30 |
| 4.2.2 | Manejo experimental..... | 31 |
| 4.2.2.1 | Limpeza das incubadoras..... | 32 |
| 4.2.3 | Análises realizadas | 32 |
| 4.3 | Qualidade da água | 33 |
| 4.4 | Análises estatísticas..... | 33 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 34 |
| 5.1 | Crescimento e composição corporal | 34 |
| 5.2 | Metabolismo | 37 |
| 5.3 | Absorção, deposição e excreção dos minerais | 41 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 45 |
| 7 | CONCLUSÕES | 46 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 47 |

1 INTRODUÇÃO

Segundo levantamento estatístico divulgado pelo Ministério da Pesca e Aqüicultura, a piscicultura brasileira atingiu 60,2% de crescimento em 2008 e 2009 comparado a 2007 (MPA, 2010). Esta rápida expansão é acompanhada pelo crescimento da produção de rações para alimentação das criações aqüícolas. Sendo o Brasil um país continental, a piscicultura nas distintas regiões se desenvolve a partir de espécies adaptadas às respectivas condições climáticas, destacando-se as nativas. Aliado a este fato, busca-se usar co-produtos gerados pelas culturas regionais na alimentação, a fim de diminuir os custos de produção.

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie nativa que se destaca pela rusticidade, facilidade de manejo, ritmo satisfatório de crescimento mesmo sob as baixas temperaturas da região Sul (FRACALOSSI et al., 2004) e por gerar filés isentos de espinhos, o que o torna apto ao processamento pela indústria (BALDISSEROTTO; RADÜNZ NETO, 2004; CARNEIRO et al., 2003). Além disso, seu hábito alimentar onívoro propicia boa adaptabilidade aos diferentes ingredientes da dieta, possibilitando o uso de ingredientes variados na formulação de sua ração.

Atualmente o Brasil detém o título de principal produtor de arroz fora do continente asiático e cerca de 60% é produzido somente pelo Estado do Rio Grande do Sul (CONAB, 2010), gerando vários co-produtos que podem ser utilizados como matéria prima na confecção de rações, em particular, o farelo de arroz desengordurado (FADE). Seu uso na alimentação animal é limitado, principalmente devido à presença de ácido fítico o qual é um poderoso quelante que tem ação negativa sobre a disponibilidade de nutrientes para animais não ruminantes (DENSTADLI et al., 2006; KIES et al., 2006; LAINING et al., 2010), afetando o metabolismo e desempenho animal (ANGEL et al., 2002; IMOROU TOKO et al., 2008) além de causar excessiva eliminação de nutrientes via fezes, levando à eutrofização das águas.

Como forma de aumentar a utilização do FADE e de outros co-produtos na nutrição animal, tem-se adicionado a enzima fitase nas rações para degradar o ácido fítico. Recentemente o mercado também tem disponibilizado uma nova forma de farelo de arroz tratado por processo físico-químico, o qual apresenta teores de ácido fítico até 95% menores que o farelo de arroz desengordurado, demonstrando grande

potencial para uso como ingrediente alternativo no arraçamento animal, ainda que não estudado nesse âmbito.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o impacto de uso dos farelos de arroz desengordurado tratado com fitase e com ácido fítico extraído sobre respostas metabólicas, desempenho zootécnico, deposição e excreção de minerais em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*).

2.2 Específicos

- Avaliar o crescimento, composição corporal e rendimento de carcaça de juvenis de jundiá alimentados com rações contendo as diferentes formas de farelo de arroz desengordurado;
- Avaliar a influência dos farelos testados sobre eletrólitos e metabólitos circulantes, metabólitos e transaminases hepáticos, deposição de cálcio e fósforo nos ossos
- Avaliar a excreção de fósforo via fezes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Jundiá (*Rhamdia quelen*)

O Rio Grande do Sul é um dos estados brasileiros que apresenta clima subtropical onde as estações do ano são bem definidas, com grandes variações de temperatura entre inverno e verão. Assim, as espécies de peixes criados com finalidade de produção de alimento (piscicultura) devem suportar essas condições para evitar prejuízos. A esse respeito, diferentemente de algumas espécies exóticas que diminuem significativamente seu crescimento quando inicia o período de inverno, o nativo jundiá mantém o mesmo ritmo tanto em 28 quanto 18°C (FRACALOSSI et al., 2004). Essa e outras características fizeram com que instituições de pesquisa, principalmente da região Sul do Brasil, o estudassem visto que seu desempenho, como de qualquer outra espécie, depende de vários fatores inerentes à alimentação e condições de cultivo.

O jundiá tem hábito onívoro generalista na natureza, ou seja, alimenta-se de grande variedade de itens de acordo com a disponibilidade (GOMIERO et al., 2007) e dessa forma, aceita bem as rações formuladas com os mais diversos ingredientes. No entanto, a escolha correta dos componentes da dieta se faz necessário, pois é claramente observado que quando em elevadas proporções, alguns podem diminuir o consumo (COLDEBELLA; RADÜNZ NETO, 2002; LAZZARI et al., 2006) ou mesmo seu aproveitamento, pois os coeficientes de digestibilidade são muito variados (OLIVEIRA FILHO;FRACALOSSI, 2006) o que pode estar ligado à atividade das respectivas enzimas digestivas (LAZZARI et al., 2010).

Fontes protéicas como levedura de cana, farinha de carne e ossos e farelo de soja foram avaliadas por Coldebella e Radünz Neto (2002) os quais verificaram que a levedura juntamente com o farelo de soja (1:1) foi mais eficiente promovendo taxa de crescimento específico (TCE) de 2,98% por dia em alevinos. O mesmo efeito não foi confirmado por Lazzari et al. (2006) na alimentação de juvenis, uma vez que a combinação de farelo de soja com farinha de carne e ossos ou farinha de peixe proporcionaram melhor desenvolvimento (TCE 2,6-2,8%/dia) que farelo de soja e levedura (TCE 2,4%/dia). A inclusão de 5 ou 10% de óleo de arroz, canola ou soja

na ração de juvenis de jundiá foram avaliadas por Losekann et al. (2008), os quais não observaram diferença no crescimento, porém a gordura depositada no filé foi menor com 5% de óleo de canola. Já a proporção carboidrato:lipídio na composição da energia da ração parece não ter influência no crescimento, no entanto, há menor deposição de gordura corporal com a relação 4,6:1 (MORO et al., 2010). Estudos sobre exigências protéica e energética foram realizados por Meyer e Fracalossi (2004), os quais concluíram que aumentando o nível energético da ração de 3200 para 3650 kcal/kg de energia metabolizável pode-se reduzir de 37 para 33% a proteína bruta da dieta mantendo uma taxa de crescimento específico (TCE) de 2,58% por dia. Fracalossi et al. (2004) avaliaram durante 365 dias o crescimento de jundiás com peso inicial de 6,2 e 8,8g criados em tanques de terra em duas cidades do estado de Santa Catarina. Os pesquisadores relataram ganho médio de 1,00 e 1,97g por dia, conversão alimentar de 1,85 e 1,78, respectivamente, e além disso, não apresentaram diminuição do crescimento no inverno mesmo sendo usada uma ração comercial genérica (não específica) com 36% de proteína bruta, comprovando o grande potencial da espécie.

Tendo-se em vista que a maioria dos estudos nutricionais conduzidos até o momento com essa espécie foram desenvolvidos a fim de testar ingredientes convencionais e/ou consolidados no mercado de rações animais, verifica-se a necessidade de testar ingredientes alternativos como o farelo de arroz desengordurado que é de fácil obtenção regional e baixo custo.

3.2 Farelo de Arroz

Para produzir o arroz branco faz-se o polimento do arroz descascado, gerando o farelo de arroz integral (FAI) que apresenta em torno de 15% de gordura (ROSTAGNO et al., 2005), sendo deste total, 30% poliinsaturada (FACCIN et al., 2009). Para evitar a rancificação deste farelo que possui lipases ativas, é necessário inativá-las através de alguns processos (MUJAHID et al., 2005; SILVA et al., 2006) ou extrair o óleo. Com a extração do óleo se obtém o farelo de arroz desengordurado (FADE) que, da mesma forma que o FAI, apresenta vários compostos químicos com propriedades benéficas à saúde tais como fibras solúveis

e insolúveis (QURESHI et al., 2002), oryzanol, vitaminas e minerais (LAI et al., 2009; FUH; CHIANG, 2001).

A qualidade da proteína dos farelos de arroz varia de acordo com a qualidade do grão polido e parte dela é composta por albumina (23-43%), que apresenta alto valor biológico devido às proporções e quantidades de aminoácidos essenciais e não essenciais, as quais variam de acordo com as variedades e cultivares (ADEBIYI et al., 2009; CAO et al., 2009; CHANPUT et al., 2009)

Alguns cuidados devem ser tomados quanto ao uso dos farelos de arroz na alimentação, dependendo a quem será fornecido. A capacidade laxativa da fibra insolúvel é inconveniente na alimentação de não ruminantes por diminuir a digestibilidade dos nutrientes (GUIMARÃES et al., 2008). Contudo, a maior preocupação com o uso do FADE na formulação de rações é pela presença de ácido fítico que possui alta capacidade de ligação a cátions di e trivalentes e proteínas, diminuindo o aproveitamento destes nutrientes não só pelos complexos formados (KIES et al., 2006; LAINING et al., 2010) mas também pela diminuição da atividade de enzimas digestivas (DENSTADLI et al., 2006) e, dependendo da variedade do arroz, a quantidade de fósforo no FADE pode chegar a 5% (AMISSAH et al., 2003) sendo que cerca de 80% está na forma de ácido fítico (ROSTAGNO et al., 2005).

3.3 Ácido fítico

Tanto em animais quanto em plantas há a formação de inositol a partir da glicose 6 fosfato, o qual é precursor de várias formas reativas importantes para o adequado funcionamento do organismo (LOEWUS; MURTHY, 2000; KOHLMEIER, 2003). Nos animais, através de reações de fosforilação, o inositol recebe até cinco moléculas de fósforo, tornando-se inositol mono, di, tri, tetrakis ou pentakisfosfato (KOHLMEIER, 2003), sendo que somente as plantas conseguem gerar o inositol hexakisfosfato (IP6), também chamado *myo*-inositol hexakisfosfato, ácido fítico ou fitato (LOEWUS; MURTHY, 2000).

O IP6 é produzido na fase de formação das sementes e apresenta os grupos fosfato altamente carregados negativamente, complexando-se com componentes carregados positivamente como os cátions e proteínas, servindo como forma de

estocagem de fósforo e outros minerais e evitando danos oxidativos (HERNÁNDEZ-UNZÓN; ORTEGA-DELGADO, 1989; DENDOUGUI; SCHWEDT, 2004). Seus níveis na semente aumentam gradativamente durante o processo de amadurecimento e, na germinação, fase em que é necessário o uso dos nutrientes estocados, seu nível diminui devido ao aumento da produção e atuação da fitase endógena (WALKER, 1974; AZEKE et al., 2011).

As mesmas propriedades que fazem do IP6 essencial para a adequada manutenção e germinação das sementes, o torna um antinutriente quando os grãos e seus co-produtos com elevada concentração desse composto são usados na alimentação de não ruminantes. Testes *in vitro* indicam a formação de complexo proteína-fitato insolúvel em condições de baixo pH (como no estômago), o qual é difícil de ser desfeito (KIES et al., 2006). De maneira geral, *in vivo*, quando adicionado mais de 1% na ração, diminui a atividade de tripsina e maltase e a digestibilidade da proteína e minerais em juvenis de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (SAJJADI; CARTER, 2004; DENSTADLI et al., 2006), ganho em peso, taxa de crescimento específico, gordura no peixe inteiro, P no plasma e Ca, Mg e Zn nos ossos de juvenis de linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*) (LAINING et al., 2010) e o desempenho de alevinos de mrigal (*Cirrhinus mrigala*) (USMANI; JAFRI, 2002).

3.4 Fitase

Para evitar as propriedades antinutricionais do fitato, formas de degradá-lo ou extraí-lo tanto dos grãos quanto dos farelos, têm sido estudadas. Na nutrição animal, o uso de fitase exógena tem sido a forma mais prática para degradar o IP6. Porém sua eficiência tem apresentado contradições na nutrição de peixes, dependendo da forma como é aplicada e da espécie que é destinada (TESKEREDŽIĆ et al., 1995; VIELMA et al., 2002; NAWANNA; SCHWARZ, 2007, 2008; NAWANNA et al., 2008).

Apesar de estar presente no trato gastrointestinal dos não ruminantes, seja pela produção intestinal (MAENZ; CLASSEN, 1998; ELLESTAD et al., 2002a; ELLESTAD et al., 2002b) ou por microorganismos ali presentes (HUANG et al., 2009; ROY et al., 2009), sua quantidade e atividade são insuficientes para a

adequada disponibilização de nutrientes, necessitando ser adicionada nos alimentos. Trata-se de uma fosfatase ácida que retira grupos fosfato do ácido fítico gerando mioinositol fosfato, mioinositol e fosfato inorgânico (MITCHELL et al., 1997). Sua atividade é medida em FTU (units of phytase activity), sendo que 1 FTU é a atividade de fitase que libera, do ácido fítico, 1 μmol de fósforo inorgânico por minuto sob condições padronizadas (pH 5,5 e 37°C) (WYSS et al., 1999).

De acordo com a forma que é aplicada nas rações, apresenta resultados diversos. Wang et al. (2009) observaram que quando o farelo de soja foi tratado com fitase antes da inclusão na ração de truta arco-íris, menor quantidade da enzima foi necessária para ter-se melhor desempenho comparado com fitase aspergida sobre a ração pronta. Tradicionalmente as fitases comercializadas não suportam as temperaturas do processo de peletização das rações, perdendo sua atividade. Devido a isso, elas são aplicadas na forma líquida após a peletização, elevando o custo de produção (GARRET et al., 2004).

Para contornar este problema, vários trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de produzir fitases resistentes às altas temperaturas para que a enzima possa ser misturada e peletizada junto com os ingredientes, perdendo o mínimo de atividade (HAN; LEI, 1999; RODRIGUEZ et al., 2000; GARRET et al., 2004; ZHANG et al., 2007). Contudo, apesar de todos os esforços para produzir uma enzima termoestável, Rodriguez et al. (2000) verificaram que ao conseguir 45% da atividade máxima a 80°C por 20 minutos com fitase produzida por *Pichia pastoris* transgênica, houve tendência à diminuição da sua atividade em temperaturas inferiores a 37°C, fato que implicaria em menor eficiência quando aplicada na alimentação de animais pecilotérmicos como os peixes.

Além do ácido fítico, dependendo do microorganismo produtor, a fitase pode degradar uma grande variedade de compostos que possuem fósforo em sua molécula, como por exemplo o p-nitrofenil fosfato, fenil fosfato, frutose 1,6-bifosfato, frutose 6-fosfato, glicose 6-fosfato, ribose 5-fosfato, alfa glicerofosfato, beta glicerofosfato, 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, AMP, ADP e ATP. Wyss et al. (1999a) avaliaram a atividade da fitase de diferentes microorganismos sobre os substratos acima citados e verificaram que a fosfatase de *Aspergillus fumigatus* apresentou maior atividade sobre p-nitrofenil fosfato, fenil fosfato e frutose 1,6-bifosfato (>110 FTU) que o próprio ácido fítico (30 FTU). Assim, torna-se importante

o uso de fitase com alta especificidade pelo IP6, uma vez que os efeitos da baixa especificidade podem ser observados na alimentação animal.

Wang et al. (2009) avaliaram níveis de inclusão de fitase na ração de truta arco-íris e verificaram que o coeficiente de digestibilidade aparente da gordura diminuiu com sua adição. Os autores sugeriram que a fitase pode ter inativado parcialmente a lipase, mas que o fato não está esclarecido. Riche e Garling Jr. (2004) avaliaram níveis de substituição da proteína da farinha de peixe por farelo de soja sem tratamento ou com 5000 FTU de fitase na ração da tilápia do Nilo e concluíram que poderia ser substituído 20-25% sem a fosfatase e até 10% com sua inclusão para não afetar o crescimento. Considerando que: (i) na pesquisa de Wang et al. (2009) 60% da ração foi composta por farelo de soja, o qual possui óleo rico em lecitina (TOCHER et al., 2008; PENCI et al., 2010), que (ii) a lecitinase e outras fosfolipases atuam no intestino; e que (iii) a variedade de substratos em que a fitase atua pode ser grande dependendo do organismo produtor, há indícios que pode haver interferência significativa no metabolismo de fosfolipídios quando da utilização de altas doses da fosfatase. Em vista disso, verifica-se que há vários fatores que devem ser observados para que a fitase usada seja eficiente.

3.5 Outras formas de tratamento para retirada do ácido fítico

O teor de ácido fítico de vários tipos de sementes também pode ser diminuído pela germinação, fermentação, autoclavagem, tostagem e cozimento (CHITRA et al., 1996; LUO et al., 2009); bem como, pelo processo de extrusão em farelo de canola (SATOH et al., 1998), o que não é efetivo nos farelos de aveia, trigo e arroz (GUALBERTO et al., 1997).

Fuh e Chiang (2001) propuseram a retirada do ácido fítico do farelo de arroz integral pela sua solubilização em solução com ácido clorídrico e posterior precipitação adicionando hidróxido de sódio e avaliaram o valor nutricional do novo co-produto. Eles observaram pequena redução na proteína (devido ao uso de protease na solução), Ca, P, K, Mg e 95% no teor de IP6. Porém, as vitaminas como niacina, riboflavina e tiamina, bem como os teores de fibras permaneceram quase intactos. Assim, apesar da diminuição de alguns nutrientes, a permanência e

possível mudança na estruturação química de outros, pode ocasionar efeitos metabólicos e zootécnicos diferenciados quando esse farelo tratado for aplicado na nutrição animal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos compuseram a estrutura desta pesquisa: inicialmente avaliou-se o desempenho por um período de 60 dias e posteriormente realizou-se a coleta das fezes durante 17 dias para quantificação da excreção de fósforo.

Todos os métodos descritos a seguir foram aprovados e registrados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria sob nº 23081.007947/2009-31, tendo cumprido todas as exigências em relação ao bem estar animal.

4.1 Avaliação do desempenho

4.1.1 Animais e instalações

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Piscicultura da Universidade Federal de Santa Maria entre os meses de fevereiro e abril de 2010, com duração de 60 dias. Utilizou-se 300 juvenis de jundiá com peso médio de $13,36 \pm 1,20$ g que antes do início do período experimental, passaram por 15 dias de adaptação nas unidades experimentais, recebendo ração comercial com 32% de proteína bruta. Estes animais foram alocados em 12 tanques de polipropileno (cor cinza) de 280L úteis (com sistemas individuais de abastecimento e escoamento) conectados em sistema de recirculação de água contendo dois filtros biológicos e um reservatório principal (2000L) com dois termostatos e duas resistências de 2000 watts cada para a manutenção da temperatura da água. Manteve-se o fotoperíodo natural com cerca de 14 horas luz no início e 12 horas luz no final do período experimental.

4.1.2 Tratamentos

Quatro rações isoprotéicas e isocalóricas foram formuladas (Tabela 1) de acordo com o proposto por Lazzari et al. (2006), dando origem aos seguintes tratamentos: CONT: ração formulada com farelo de soja, farinha de peixe, milho e farelo de trigo; FADE: inclusão de 20% de farelo de arroz desengordurado; FADFIT: inclusão de 20 % de farelo de arroz desengordurado tratado com fitase; FADEX: inclusão de 20% de farelo de arroz desengordurado com ácido fítico extraído.

Tabela 1 – Ingredientes e composição bromatológica das dietas fornecidas aos juvenis de jundiá durante 60 dias.

| Ingredientes (%) | Tratamentos ¹ | | | |
|---|--------------------------|---------|---------|---------|
| | CONT | FADE | FADFIT | FADEX |
| Farinha de peixe | 25,00 | 25,00 | 25,00 | 25,00 |
| Farelo de soja | 32,00 | 32,00 | 32,00 | 32,00 |
| Milho | 13,34 | 12,04 | 13,04 | 11,04 |
| Farelo de trigo | 18,00 | - | - | - |
| FADE | - | 20,00 | - | - |
| FADFIT | - | - | 20,00 | - |
| FADEX | - | - | - | 20,00 |
| Óleo de soja | 7,20 | 7,20 | 7,20 | 7,20 |
| Fosfato bicálcio | 1,70 | 1,00 | - | 2,00 |
| Cloreto de sódio iodado | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Colina | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 |
| Premix vitamínico mineral ² | 1,50 | 1,50 | 1,50 | 1,50 |
| Butil-hidroxi-tolueno | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |
| Composição centesimal analisada (%) | | | | |
| Matéria seca | 90,35 | 89,79 | 90,77 | 89,02 |
| Proteína bruta | 34,17 | 34,95 | 34,17 | 34,88 |
| Matéria mineral | 12,45 | 13,54 | 12,82 | 12,98 |
| Lipídios | 10,72 | 10,13 | 9,98 | 11,02 |
| CSDN ³ | 21,67 | 19,81 | 19,33 | 19,97 |
| Fibra em detergente neutro | 12,92 | 13,37 | 14,23 | 14,25 |
| Cálcio ⁴ | 2,18 | 2,05 | 1,80 | 2,27 |
| Fósforo total ⁴ | 1,69 | 1,98 | 1,64 | 1,75 |
| Fósforo disponível ⁴ | 1,45 | 1,46 | 1,48 | 1,46 |
| Energia digestível ⁵ (Kcal/kg) | 2920,24 | 2854,76 | 2867,73 | 2892,49 |

¹ CONT= ração controle com ingredientes convencionais, sem farelo de arroz; FADE= farelo de arroz desengordurado; FADFIT= farelo de arroz desengordurado tratado com fitase; FADEX= farelo de arroz desengordurado desfitinizado, ácido fítico extraído.

² Composição da mistura vitamínica por kg de produto. Ác. Fólico: 1200mg; Ác. Nicotínico: 24000mg; Ác. Pantotênico: 12000mg; Biotina: 48 mg; Vit.A: 1200000UI; Vit. B1: 4800mg; Vit. B2: 4800mg; Vit. B6: 4800mg; Vit. B12: 4800mcg, Vit. C: 48 g, Vit. D3: 200000UI, Vit. E: 12000 mg, Vit. K3: 2400mg, Cobalto: 10mg, Cobre: 3000mg; Ferro: 50000mg; Iodo: 100mg; Manganês: 20000mg; Selênio: 100mg; Zinco: 3000mg

³Carboidratos solúveis em detergente neutro calculado: $100 - (\text{proteína bruta} + \text{matéria mineral} + \text{lipídios} + \text{fibra em detergente neutro} + \text{umidade})$.

⁴ Calculado com base na análise dos ingredientes;

⁵ Calculada com a fórmula: $(\text{Proteína} * 5,64 * 0,83) + (\text{Lipídio} * 9,44 * 0,88) + (\text{Carboidrato} * 4,11 * 0,65) * 10$ (MEYER et al., 2004).

A composição bromatológica dos respectivos farelos encontra-se na Tabela 2. As rações foram elaboradas no Laboratório de Piscicultura da UFSM onde os ingredientes foram moídos em moinho a martelo e misturadas em amassadeira elétrica. Procedeu-se a peletização em moedor de carne com matriz de 3 mm e a secagem em estufa com circulação de ar a 50°C por 24 horas.

As exigências em aminoácidos essenciais recomendadas por Meyer e Fracalossi (2005) foram supridas pelos ingredientes, não sendo necessária a inclusão de sintéticos.

Tabela 2 – Composição bromatológica dos farelos de arroz desengordurado sem tratamento (FADE), incubado com fitase (FADFIT) e ácido fítico extraído (FADEX).

| | MS | PB | MM | LP | FDN | CSDN | Cálcio | Fósforo | P disp |
|--------|-------|-------|-------|------|-------|-------|--------|---------|--------|
| FADE | 87,54 | 16,89 | 13,03 | 2,15 | 43,02 | 24,91 | 0,31 | 2,83 | 0,94 |
| FADEX | 90,8 | 21,02 | 5,38 | 3,26 | 40,53 | 29,81 | 0,19 | 0,33 | 0,00 |
| FADFIT | 90,8 | 18 | 14,29 | 1,65 | 44,89 | 21,17 | 0,31 | 2,04 | 1,94 |

MS= matéria seca; PB= proteína bruta; MM= matéria mineral; LP= lipídeos; FDN= fibra em detergente neutro; CSDN= carboidratos solúveis em detergente neutro= $100 - (\text{PB} + \text{MM} + \text{LP} + \text{FDN} + \text{umidade})$; P disp= fósforo disponível.

4.1.2.1 Incubação do farelo de arroz desengordurado com fitase

O tratamento do farelo com a fitase foi realizado por metodologia modificada de Storebakken et al. (1998). Três quilos de FADE foram misturados com nove litros de água morna (40°C) (proporção 1p:3v) e adicionou-se 0,45g de fitase de *Aspergillus niger* (1500FTU do produto BASF Natuphos® 10000G) após ser dissolvida em um pouco de água morna. A incubação foi mantida por 2 horas em banho-maria (40°C) sendo que se realizava agitação com batedeira elétrica durante 20 minutos com intervalos de 10 minutos. Após esse tempo, o preparado foi

despejado em bandejas (fina camada) e levado para estufa a 70°C por 24 horas onde, a cada 2 horas, realizava-se a viragem da pasta a fim de evitar fermentação.

4.1.3 Manejo experimental

Diariamente realizava-se duas sifonagens (10:30 e 15:30 horas) para a retirada das fezes e eventuais sobras de ração e quatro alimentações (8:30, 11:30, 14:30 e 17:00 horas) sendo fornecido 3% da biomassa de cada unidade experimental em ração a qual ajustava-se quinzenalmente através de pesagem da biomassa. A cada 30 dias os peixes foram pesados em balança digital (precisão 0,01g) e medidos individualmente com ictiômetro para acompanhamento do desenvolvimento sendo que, no momento do manejo, eram anestesiados com Eugenol (20mg/L) (CUNHA et al., 2010). Ao final do período experimental, antes das pesagens e medições, três peixes de cada unidade experimental foram imobilizados para coleta de sangue, com seringa heparinizada, pela veia caudal e logo após foram abatidos em água+gelo (1:1) juntamente com outros três peixes que foram usados para análise centesimal no peixe inteiro. Para a coleta dos ossos, depois de eviscerados e coletados os fígados, as carcaças foram envoltas em papel alumínio e colocadas em forno elétrico por 15 minutos a 180°C, sendo descarnadas e os ossos armazenados em freezer para posterior análise. Evitou-se o cozimento a fim de evitar perdas de minerais para a água.

4.1.4 Parâmetros analisados

Todas as análises e técnicas descritas a seguir foram realizadas no Laboratório de Piscicultura da UFSM.

4.1.4.1 Desempenho

Com base nos dados coletados de peso final (g) e comprimento total (cm) foram calculados: ganho médio diário (g/dia): $(PF - PI)/d$; ganho em peso: $PF-PI$; taxa de crescimento específico (%/dia): $[(\ln PF - \ln PI)/d]*100$; conversão alimentar aparente: ACT/GPT e rendimento de carcaça (%): $Pevi/PF*100$. Onde: PF= peso final; PI= peso inicial; d= dias de alimentação; ln= logaritmo neperiano; ACT= alimento consumido total pela unidade experimental; GPT= ganho em peso total da unidade experimental; Pevi= peso eviscerado.

4.1.4.2 Composição peixe inteiro

Os três peixes de cada unidade experimental destinados à análise centesimal foram triturados em multiprocessador de alimentos. A matéria seca foi determinada pela perda de peso da amostra a 105°C em estufa com circulação de ar por 24 horas (AOAC, 1995). O conteúdo de cinzas foi quantificado colocando-se as amostras provenientes da análise de matéria seca em mufla a 550°C por 6 horas (AOAC, 1995). A proteína bruta foi determinada através da quantificação do nitrogênio pelo método de microKjeldahl e utilizando o fator 6,25 (AOAC 1995) e os lipídios foram quantificados pela metodologia de Bligh e Dyer (1959).

4.1.4.3 Metabólitos e eletrólitos sangüíneos

Proteínas totais, colesterol total, triglicerídeos, cálcio, fósforo e urato foram analisados por kits colorimétricos marca Doles[®], seguindo instruções de uso do fabricante, sendo calculada a relação cálcio:fósforo. Depois de realizado teste comparativo com kit colorimétrico Doles[®] optou-se por aferir a glicose com aparelho eletrônico portátil Accu-Chek[®] Active devido à praticidade.

4.1.4.4 Metabólitos e transaminases hepáticas

As proteínas totais foram analisadas pelo método de Lowry et al. (1951), glicogênio por Bidinotto et al. (1998) e as transaminases alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase por kit colorimétrico Doles[®].

4.1.4.5 Minerais nos ossos

Duas placas ósseas do crânio dos jundiás (Anexo 1) foram pesadas em balança digital com precisão de 0,001g, colocadas em tubos de microKjeldahl, adicionado 2 ml de solução nitroperclórica e levados ao bloco digestor a 80°C por 30 minutos e 3 horas a 200°C. Após esfriar, adicionou-se água destilada nos tubos até a marca de 50 ml realizando vigorosa agitação manual. Uma alíquota de 5 ml foi retirada e colocada em tubo de ensaio devidamente identificado. O resto de solução que sobrou nos tubos de ensaio foram quantificados em proveta de 50 ml e anotados (detalhes Apêndice A). A determinação de cálcio e fósforo foi realizada por kits colorimétricos Doles[®] seguindo a metodologia descrita para a análise desses minerais na urina, sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro UV. As outras partes que restaram do crânio foram pesadas e levadas à estufa a 105°C por 24hs para determinação da matéria seca e posteriormente à mufla a 500°C por 6 horas para quantificar as cinzas (AOAC, 1995).

4.2 Coleta das fezes

4.2.1 Animais e instalações

O trabalho foi realizado no Laboratório de Piscicultura da UFSM durante o mês de julho com duração de 17 dias. Foram coletadas as fezes de 240 juvenis de

jundiá com peso médio de $52,15 \pm 8,42\text{g}$ utilizando-se o método Guelph (ABIMORAD; CARNEIRO, 2004) em incubadoras de fibra de vidro de 200L com entrada e saída de água individuais dotadas, cada uma, de registro na parte inferior e tubo tipo *falcon* de 50 ml (Anexo 2). As incubadoras estavam conectadas ao sistema de recirculação em que foi realizado o ensaio de desempenho, ficando composto por seis unidades de 200L e 12 tanques de 280L (Anexo 3). Filtros foram mantidos nas torneiras de entrada de água para evitar contaminação das fezes por sujidades vindas do sistema e os peixes não entravam em contato com as fezes devido separação feita por tela plástica de 1/2" (Anexo 4). Neste ensaio foi necessário adicionar duas resistências de 2000w no reservatório principal, além de 12 aquecedores de 200w distribuídos nos tanques para a manutenção da temperatura, devido o período de inverno.

4.2.2 Manejo experimental

Por haver somente seis incubadoras, os peixes foram divididos em dois grupos compostos por seis unidades experimentais de tratamentos aleatórios que permaneceram nos tanques de desempenho durante o período de adaptação às rações que foi de cinco dias para cada grupo. Enquanto um grupo estava nas incubadoras, o segundo recebia ração comercial com 28% de proteína bruta. O período de coleta foi de dez dias para o primeiro grupo e sete para o segundo. O maior período foi por ter-se iniciado as coletas durante o dia em que o volume de fezes era muito pequeno (menos de 3 ml). No momento em que foi percebida maior defecação no período noturno (em torno de 10 ml), passou-se a coletar durante a noite. Para evitar que os animais regurgitassem a ração, realizava-se a limpeza das incubadoras e depois a alimentação.

4.2.2.1 Limpeza das incubadoras

Diariamente, às 8:00 horas, limpava-se as paredes das incubadoras com esponja e drenava-se parte da água pelos registros. Durante esse procedimento, mantinham-se os peixes presos dentro de rede tipo tule na borda da incubadora. Às 9:00 e 23:00 horas fornecia-se a alimentação na proporção de 3% da biomassa da unidade experimental colocada em bandejas com barras de chumbo para que as mesmas afundassem. Aguardava-se 10 minutos para que os peixes comessem e retiravam-se as bandejas sendo realizado escoamento de parte da água para retirar as sobras de ração. Após alimentação e limpeza das 23 horas colocavam-se os tubos tipo *falcon* nas incubadoras e abria-se os registros para coletar as fezes às 4:00 e 8:00 horas, mantendo-se os tubos dentro de isopores com gelo (Anexo 5) para evitar proliferação bacteriana. No momento das coletas, o excesso de água dos tubos era descartado e as fezes despejadas em placas de *petri* devidamente identificadas para secar em estufa com circulação de ar à 50°C por 24 horas.

4.2.3 Análises realizadas

Após a moagem das fezes secas em moinho com arrefecimento, foram analisados o fósforo e o total de minerais. Para a análise de fósforo foram pesados aproximadamente 0,2g de fezes de cada tratamento e colocados em tubos de ensaio de 100 ml adicionando 5 ml de solução nitroperclórica, sendo deixado em repouso, na capela, por 12 horas. Após esse período as amostras foram levadas ao bloco digestor a 50°C por aproximadamente 30 minutos, aumentando 50°C a cada 15 minutos até 200°C, permanecendo 3-4 horas. Após esfriar, completou-se com água destilada até a marcação de 50 ml, agitou-se vigorosamente e retirou-se uma alíquota de 5 ml que foi colocada em tubo de ensaio. O restante da solução foi quantificada em proveta de 50 ml e anotado o valor. A determinação do fósforo foi realizada com kit colorimétrico Doles® seguindo a metodologia descrita para a quantificação do mineral na urina (detalhes Apêndice B). Antes de determinar as cinzas por incineração em mufla a 500°C por 6 horas, verificou-se o teor de matéria

seca colocando-se 0,5g de fezes moída em cadinhos de porcelana e deixando-os por 24 horas em estufa com circulação de ar à 105°C (AOAC, 1995).

4.3 Qualidade da água

Para o acompanhamento e controle da qualidade da água, realizava-se diariamente a aferição da temperatura e oxigênio dissolvido com oxímetro digital (marca YSI, modelo 55A) e semanalmente alcalinidade, dureza, amônia total e nitrito com kit colorimétrico da marca Alfakit® e pH com pHmetro digital. Os parâmetros monitorados tanto da parte de desempenho quanto de coleta de fezes se mantiveram em níveis adequados ao cultivo do jundiá (BALDISSEROTTO; RADÜNZ NETO, 2004) e estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores médios dos parâmetros de qualidade da água durante os 60 dias de avaliação de desempenho e 17 dias de coleta de fezes.

| | Desempenho | Coleta de fezes |
|--------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Temperatura | 26,27 ± 1,73 °C | 23,17 ± 1,65 °C |
| Oxigênio | 6,45 ± 0,76 ppm | 7,33 ± 0,58 ppm |
| Alcalinidade | 24,87 ± 13,56 mg CaCO ₃ /L | 10,50 ± 7,18 mg CaCO ₃ /L |
| Dureza | 16,61 ± 10,07 mg CaCO ₃ /L | 22,47 ± 13,02 mg CaCO ₃ /L |
| Amônia total | 0,15 ± 0,03 ppm | 0,10 ± 0,01 ppm |
| Nitrito | 0,046 ± 0,00 ppm | 0,01 ± 0,00 ppm |
| pH | 7,22 ± 0,32 | 6,81 ± 0,43 |

Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão.

4.4 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan no nível de 5% de significância. Para cada tratamento, os valores menores e maiores que média ± 2dp (outliers) foram excluídos das análises. Para todos esses procedimentos foi utilizado o programa SPSS 8.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento e composição corporal

Os ganhos em peso variaram entre 11,47 e 14,67 g, contudo não foram observadas diferenças significativas para desempenho (Tabela 4). Em estudo prévio Rocha et al. (2008) não verificaram melhora no crescimento de juvenis de jundiá (12,6g) ao incluírem níveis de 0, 500, 1000 e 1500 FTU/kg de ração composta por ingredientes vegetais, obtendo valores de TCE (0,49-0,66%/dia) inferiores ao presente estudo (1,00-1,21%/dia). Lazzari et al. (2006) relataram valores de TCE (2,6%/dia) e conversão alimentar aparente (1,5:1) melhores com juvenis de 15g e ração com a mesma base protéica do presente estudo, no entanto, o rendimento de carcaça desta pesquisa (88,60-89,24%) foi superior aos 80,7% por eles registrados.

Tabela 4 – Desempenho de juvenis de jundiá após 60 dias de alimentação com ração contendo ingredientes convencionais (CONT), farelo de arroz desengordurado (FADE), farelo de arroz desengordurado tratado com fitase (FADFIT) ou farelo de arroz desengordurado ácido fítico extraído (FADEX).

| Variáveis ¹ | Tratamentos | | | | CV |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| | CONT | FADE | FADFIT | FADEX | |
| PF (g) | 24,47 ± 2,83 | 27,40 ± 0,54 | 24,99 ± 2,16 | 27,31 ± 2,14 | 8,67 |
| CT (cm) | 13,82 ± 0,55 | 14,26 ± 0,12 | 13,88 ± 0,51 | 14,33 ± 0,11 | 2,84 |
| GMD (g/dia) | 0,18 ± 0,05 | 0,23 ± 0,01 | 0,19 ± 0,03 | 0,23 ± 0,03 | 17,94 |
| GP (g) | 11,47 ± 2,65 | 14,67 ± 1,33 | 11,85 ± 2,18 | 14,58 ± 1,20 | 17,27 |
| TCE (%/dia) | 1,00 ± 0,19 | 1,21 ± 0,05 | 1,04 ± 0,14 | 1,16 ± 0,12 | 13,25 |
| CAA | 3,99 ± 0,83 | 3,24 ± 0,30 | 3,7 ± 0,65 | 3,20 ± 0,16 | 16,66 |
| RC (%) | 89,24 ± 0,75 | 88,60 ± 0,59 | 89,16 ± 0,18 | 88,79 ± 0,82 | 0,68 |

¹ PF= peso final; CT= comprimento total; GMD= ganho médio diário; GP= ganho em peso; TCE= taxa de crescimento específico; CAA= conversão alimentar aparente; RC= rendimento de carcaça. Não significativo pelo teste de Duncan (P>0,05); Valores apresentados como média ± desvio padrão, n=3.

Pesquisas realizadas com salmão do Atlântico (DENSTADLI et al., 2007) e carpa comum (*Cyprinus carpio*) (NAWANNA; SCHWARZ, 2007, 2008) utilizando a

fitase como forma de desfitinização de ingredientes e rações não mostraram melhoria no desempenho dos animais. No caso do salmão que é carnívoro, 25% da ração era composta por farinha de peixe que por conter altas quantidades de fósforo disponível, elevou os seus níveis acima da exigência da espécie que é em torno de 0,78% (VIELMA; LALL, 1998). Já a carpa comum não obteve melhora no desempenho porque, segundo os autores, a fitase (de *Peniophora lycii*) aplicada na ração já pronta não tem boa atuação, visto que esta espécie não possui estômago, o que não proporciona as condições ideais de pH para sua atuação.

Realizando uma análise geral das pesquisas com inclusão de fitase na dieta dos peixes, verifica-se que somente quando os ingredientes são incubados com a fosfatase e a composição da ração é baseada em ingredientes de origem vegetal, é que são garantidos os seus efeitos sobre o desempenho e diminuição da excreção de fósforo (STOREBAKKEN et al., 1998; VIELMA et al., 2000; VIELMA et al., 2002; DENSTADLI et al., 2007; NAWANNA; SCHWARZ, 2007, 2008; NAWANNA et al., 2008; WANG et al., 2009). Dessa forma, sua atuação não depende da fisiologia da espécie em questão.

No presente estudo verificou-se que o processo utilizado foi altamente eficiente, pois 95% do fósforo do farelo de arroz desengordurado estavam disponibilizados após a incubação com a fitase e apenas 33,21% no farelo sem tratamento (Tabela 2). Conte et al. (2002) realizaram processo semelhante com farelo de soja e chegaram a somente 37% de disponibilidade do fósforo. Denstadli et al. (2007) verificaram redução de 66% no IP6 da ração com concentrado protéico de soja e trigo incubados com fitase contra 2,1% da ração com a enzima aspergida. Além disso, a incubação permite o uso racional da enzima já que menor quantidade é necessária pela maior eficiência na desfitinização (WANG et al., 2009) e pelo tratamento do ingrediente com maior teor de IP6.

As rações do presente estudo foram calculadas para terem o mesmo nível de fósforo disponível, o qual ficou em torno de 1,46%. Isso pode explicar parcialmente porque o desempenho não foi afetado pelas dietas. O jundiá é um peixe onívoro e as farinhas de peixe e carne e ossos são comumente usadas na confecção das rações (LAZZARI et al., 2006; CORRÊIA et al., 2009; MELO et al., 2003), tanto pelo seu perfil de aminoácidos quanto para dar palatabilidade. Assim, cerca de 1% do fósforo disponível das dietas foi fornecido pela farinha de peixe. As pesquisas realizadas com carpa comum (NAWANNA et al., 2008), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*)

(VIELMA et al., 2002), catfish (*Ictalurus punctatus*) (LI; ROBINSON, 1997) e tilápia do Nilo (CAO et al., 2008; FURUYA et al., 2001; LIEBERT; PORTZ, 2005) que mostraram o efeito positivo da fitase sobre o crescimento, tinham as dietas formuladas com base protéica de origem vegetal, fazendo com que o nível de fósforo total ficasse entre 0,4 e 0,7%, de modo que, mesmo com uma total atuação da fitase sobre o ácido fítico da ração, não haveria desperdício desse mineral.

As porcentagens de matéria seca, proteínas e cinzas corporais não foram afetadas pelas dietas, mas o mesmo não ocorreu para a gordura (Tabela 5). Comparando os tratamentos, o FADEX causou maior deposição de gordura corporal em relação ao FADFIT, apesar disso, os valores estão próximos aos 5,76% encontrados por Melo et al. (2003) e 9,3% por Corrêia et al. (2009) com a mesma espécie. Concordando com o presente estudo, Rocha et al. (2007) relataram diminuição na gordura corporal de alevinos de jundiá quando a fitase foi incluída na ração.

Mesmo com maior deposição de gordura corporal nos peixes do tratamento FADEX, isso não se traduziu em menor rendimento de carcaça indicando que essa não estava na cavidade abdominal, mas provavelmente, no filé.

Tabela 5 – Composição corporal de juvenis de jundiá após 60 dias de alimentação com ração contendo ingredientes convencionais (CONT), farelo de arroz desengordurado (FADE), farelo de arroz desengordurado tratado com fitase (FADFIT) ou farelo de arroz desengordurado ácido fítico extraído (FADEX).

| Variáveis ¹ (%) | Tratamentos | | | | CV |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|
| | CONT | FADE | FADFIT | FADEX | |
| MS | 26,29 ± 1,14 | 25,69 ± 0,28 | 25,92 ± 1,43 | 26,31 ± 1,03 | 3,63 |
| PB | 15,34 ± 0,21 | 15,47 ± 0,37 | 14,95 ± 0,46 | 15,77 ± 0,58 | 3,1 |
| LIP | 4,40 ± 0,77 ^c | 6,09 ± 0,58 ^{ab} | 5,5 ± 0,30 ^{bc} | 7,19 ± 0,96 ^a | 21,62 |
| CZ | 3,21 ± 0,25 | 3,46 ± 0,17 | 2,95 ± 0,33 | 3,38 ± 0,58 | 11,56 |

¹ MS= matéria seca; PB= proteína bruta; LIP= lipídeos; CZ= cinzas.

Médias com letras diferentes, na linha, apresentam diferença significativa pelo teste de Duncan a nível de 5% de probabilidade; Valores apresentados como média ± desvio padrão na matéria natural, n =3.

5.2 Metabolismo

Os níveis glicêmicos e de glicogênio hepático verificados nesta pesquisa estão de acordo com os relatados na literatura para jundiás em condições normais de alimentação (BARCELLOS et al., 2001; 2003; 2010; MELO et al. 2006; PEDRON 2010) (Tabela 6 e Tabela 7).

Tabela 6 – Metabólitos e relação cálcio:fósforo sangüíneos de juvenis de jundiá aos 60 dias experimentais 16 horas após a alimentação.

| Variáveis ² (mg/dL) | Tratamentos ¹ | | | | CV |
|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|-------|
| | CONT | FADE | FADFIT | FADEX | |
| PT | 3,93 ± 0,35 ^a | 3,4 ± 0,22 ^{ab} | 3,30 ± 0,77 ^b | 3,72 ± 0,54 ^{ab} | 15,87 |
| COL | 171,66 ± 19,89 | 174,41 ± 41,25 | 191,06 ± 31,41 | 172,25 ± 36,05 | 18,71 |
| TG | 486,87 ± 207,03 | 646,39 ± 300,98 | 564,27 ± 214,47 | 570,81 ± 166,83 | 44,97 |
| Ca:P | 1,44 ± 0,14 | 1,37 ± 0,16 | 1,30 ± 0,03 | 1,32 ± 0,08 | 8,81 |
| GLI | 41,65 ± 6,27 ^b | 60,74 ± 14,02 ^a | 56,46 ± 18,04 ^a | 38,47 ± 7,90 ^b | 30,94 |
| UR | 1,31 ± 1,07 | 0,77 ± 0,55 | 0,74 ± 0,42 | 0,61 ± 0,32 | 78,82 |

¹ CONT= ração com ingredientes convencionais; FADE= ração com inclusão de farelo de arroz desengordurado; FADFIT= ração com farelo de arroz desengordurado tratado com fitase; FADEX= farelo de arroz desengordurado, ácido fítico extraído;

² PT= proteínas totais; COL= colesterol total; TG= triglicerídeos; Ca:P= relação cálcio:fósforo; GLI= glicose; UR= urato;

Médias com letras diferentes, na linha, apresentam diferença significativa pelo teste de Duncan a nível de 5% de probabilidade; Valores apresentados como média ± desvio padrão, n=9.

Os níveis glicêmicos dos peixes alimentados com FADE e FADFIT (60,74 e 56,46 mg/dL) foram mais elevados que CONT e FADEX (41,65 e 38,47 mg/dL). FADEX promoveu maior estoque de glicogênio comparado ao CONT e ambos não diferiram de FADE e FADFIT.

Alterações na glicemia e no estoque de glicogênio hepático ocorrem durante o jejum e no estado pós-prandial promovendo a glicogenólise ou glicogênese, respectivamente (BARCELLOS et al., 2010). No entanto, é a avaliação de um

conjunto de parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo animal que permite verificar qual via metabólica está atuando (MELO et al., 2006).

A proteína corporal está em contínuo processo de síntese e degradação. A concentração de aminoácidos (AA) vindos da alimentação aumenta no sangue de maneira a atender a demanda de síntese protéica dos tecidos (DABROWSKI; GUDERLEY, 2002). Porém, quando é ofertado excesso de proteína ou a energia é insuficiente frente à demanda metabólica, ocorre a desaminação dos AA no fígado. Esse processo é intermediado pelas enzimas alanina-aminotransferase (ALT) e aspartato-aminotransferase (AST), as quais são responsáveis por retirar o grupamento amino dos AA sendo usada a cadeia carbonada para a gliconeogênese (MELO et al. 2006; KUMAR et al., 2010). Em seqüência o nitrogênio é excretado.

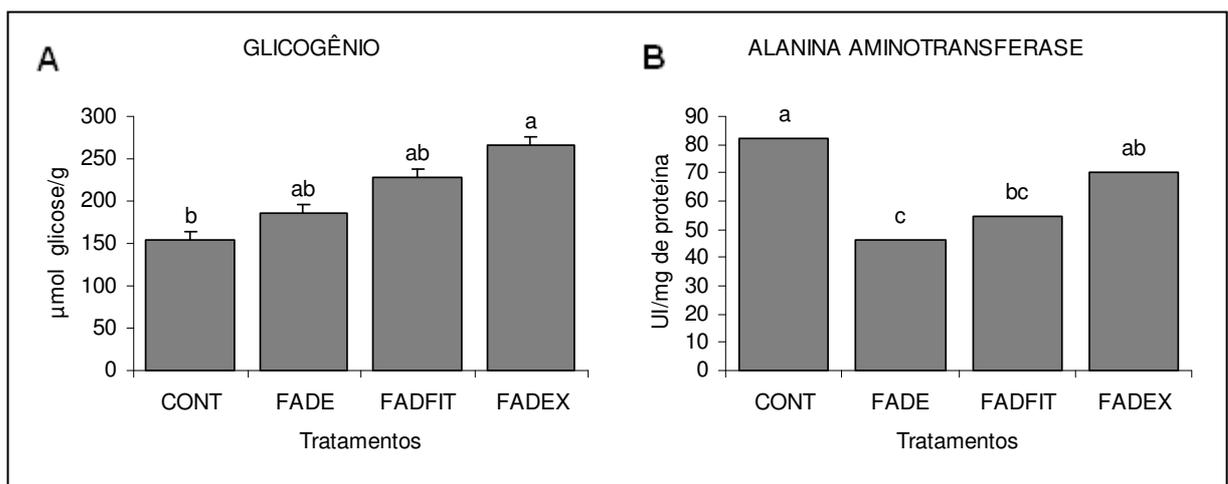


Figura 1 – Glicogênio (A) e atividade de alanina aminotransferase (B) hepáticos dos juvenis de jundiá. CONT= controle, FADE=farelo de arroz desengordurado, FADFIT= farelo de arroz desengordurado tratado com fitase e FADEX= farelo de arroz desengordurado com ácido fítico extraído. Letras diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Duncan a nível de 5% de probabilidade.

Os níveis de proteínas totais no sangue dos peixes do CONT foram mais elevados que do FADFIT, os quais não diferiram do FADE e FADEX (Tabela 6). Dentre as dietas com farelo de arroz, a atividade de ALT foi mais elevada no FADEX que FADE, ambas não diferindo de FADFIT. Já a enzima AST apresentou maior atividade em CONT que FADFIT, sendo que dentre os tratamentos com farelo de arroz não houve diferença (Tabela 7).

Tabela 7 – Proteínas totais no fígado (PTF) e aspartato aminotransferase (AST) hepáticos de juvenis de jundiá aos 60 dias experimentais 16 horas após a alimentação.

| Variáveis | Tratamentos ¹ | | | | CV |
|----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------|
| | CONT | FADE | FADFIT | FADEX | |
| PTF (mg/g) | 55,23 ^a ± 7,55 | 50,97 ^a ± 6,24 | 39,12 ^b ± 3,12 | 51,27 ^a ± 8,87 | 17,67 |
| AST (UI/mg de proteína) | 878,93 ^b ± 424,39 | 1232,20 ^{ab} ± 501,34 | 1472,58 ^a ± 626,64 | 1187,85 ^{ab} ± 514,12 | 44,91 |

¹ CONT= ração com ingredientes convencionais; FADE= ração com inclusão de farelo de arroz desengordurado; FADFIT= ração com farelo de arroz desengordurado tratado com fitase; FADEX= farelo de arroz desengordurado, ácido fítico extraído; Médias com letras diferentes, na linha, apresentam diferença significativa pelo teste de Duncan a nível de 5% de probabilidade; Valores apresentados como média ± desvio padrão, $n=9$.

Como vários processos metabólicos ocorrem no fígado tendo-se aumento da produção de enzimas, a elevação na quantidade de proteína hepática pode indicar o nível de atividade enzimática. A proteína total hepática variou de 55,23 a 39,12 mg/g, sendo que, a menor de todas as quantidades foi causada pelo FADFIT (Tabela 7).

Algumas situações metabólicas podem ser inferidas pela análise das correlações dos metabólitos sangüíneos e hepáticos. O baixo nível de glicose sangüínea, elevado estoque de glicogênio e proteína hepáticos, juntamente com alto nível de proteínas totais no plasma e elevada atividade de ALT no fígado, indicam que os peixes do FADEX não estavam degradando glicogênio, mesmo passadas 16 horas da alimentação, mas sim utilizando proteína como fonte energética. FADE e FADFIT seguem esta mesma tendência, mas já utilizando o glicogênio hepático, uma vez que houve leve diminuição de seus níveis com aumento da glicose plasmática e diminuição das proteínas totais sangüíneas seguidos de diminuição da atividade da ALT no fígado (Figura 2).

Couto et al. (2008) verificaram aumento das reservas de glicogênio hepático de juvenis de “gilthead sea bream” (*Sparus aurata*) em função do aumento da quantidade de carboidratos na dieta. Sardar et al. (2007) relataram menor glicemia e glicogênio hepático em alevinos de carpa comum quando a fitase não era incluída na ração (0,53-0,66% de fósforo total). Dessa forma, estas diferenças no metabolismo energético podem ser em decorrência da influência negativa do IP6 sobre a disponibilidade do amido (YOON et al., 1983).

Levando-se em consideração que a alimentação dos peixes iniciava às 8:30 horas, perfazendo 15,5 horas da alimentação anterior, supõe-se que como os peixes do tratamento FADEX ainda não haviam mobilizado glicogênio, não teriam o gasto energético para repô-lo como nos tratamentos FADE e FADFIT, justificando a maior gordura corporal em relação ao FADFIT. Analisando a seqüência do maior para o menor nível de gordura no peixe inteiro (FADEX, FADE e FADFIT) (Tabela 5) e sabendo que o ácido fítico causa diminuição da glicemia por apresentar interação com o amido (YOON et al., 1983) verifica-se que os peixes do tratamento FADEX não tiveram influência do IP6. Ao contrário, os jundiás tratados com FADE necessitaram utilizar as reservas hepáticas antes dos demais para manter a glicemia, devido ao menor fornecimento da glicose vinda da ração. Já os da dieta FADFIT não foram afetados na digestão e absorção de carboidratos, mas provavelmente no metabolismo dos lipídios (WANG et al., 2009). Assim, o acesso ao glicogênio foi posterior ao FADE.

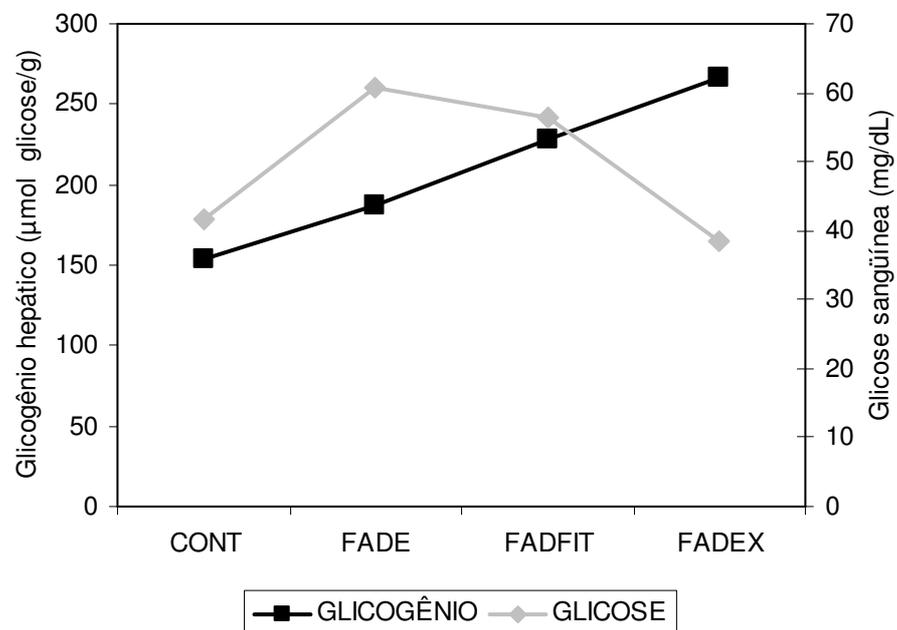


Figura 2 – Níveis de glicogênio hepáticos e glicose sanguínea dos juvenis de jundiá nos diferentes tratamentos. CONT= controle, FADE=farelo de arroz desengordurado, FADFIT= farelo de arroz desengordurado tratado com fitase e FADEX= farelo de arroz desengordurado com ácido fítico extraído.

A digestibilidade dos ingredientes que compõem a ração é outro fator que interfere no metabolismo energético. Os valores diminuídos de glicogênio hepático e glicose, aliados a altas quantidades de proteínas totais sangüíneas, proteína no fígado e atividade de ALT no CONT sugere que os peixes alimentados com esta dieta possuem menor estoque de reserva e, da mesma forma que os do FADEX, ainda não estavam utilizando-a. Este baixo estoque pode ser devido à dieta conter 18% de farelo de trigo, o qual tem apresentado baixa digestibilidade aparente da energia em pesquisas com a tilápia do Nilo, (GUIMARÃES et al., 2008), pacu (*Piaractus brachypomus*), (FERNANDES et al., 2004) truta arco-íris, (GAYLORD et al., 2008) e “sunshine bass” (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) (RAWLES; GATLIN, 2000). Dessa forma, como a energia vinda da alimentação é menor, a síntese de glicogênio também é menor (COUTO et al., 2008).

Devido às células nervosas e vermelhas sangüíneas usarem somente glicose como fonte energética, ela é poupada no estado de jejum, sendo enviados aos demais tecidos lipídios oriundos das reservas corporais. Os triglicerídeos circulantes não apresentaram diferenças entre os tratamentos provavelmente pela sua mobilização ter sido antecipada, de modo que no momento em que foi realizada a coleta já estavam estabilizados (Tabela 6).

5.3 Absorção, deposição e excreção dos minerais

O cálcio e fósforo são de grande importância para os peixes, estando relacionados ao desenvolvimento e manutenção dos ossos e participando de vários processos fisiológicos, incluindo o equilíbrio ácido-base. Sendo a água rica em carbonato de cálcio, a absorção desse mineral se dá pelas brânquias, quando o alimento não dispõe de quantidade suficiente. Visto que o fósforo apresenta-se normalmente indisponível no ambiente aquático, ele é obtido principalmente pelo alimento (LALL, 2002), o qual pode apresentar compostos que interferem a absorção como o ácido fítico.

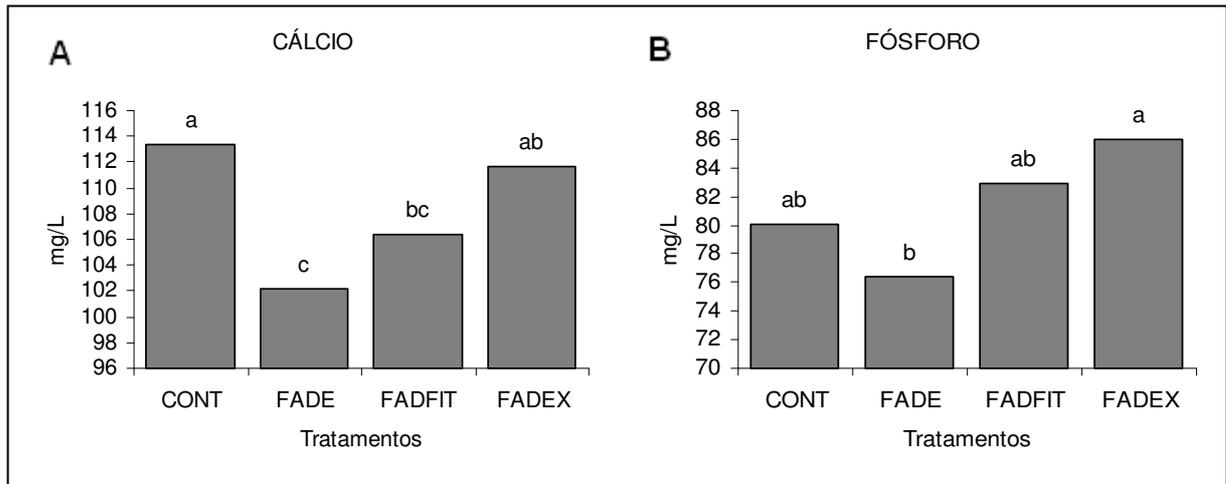


Figura 3 – Teores de cálcio (A) e fósforo (B) no plasma de juvenis de jundiá aos 60 dias experimentais. CONT= controle, FADE=farelo de arroz desengordurado, FADFIT= farelo de arroz desengordurado tratado com fitase e FADEX= farelo de arroz desengordurado com ácido fítico extraído. Letras diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Duncan a nível de 5% de probabilidade.

A relação Ca:P no sangue não apresentaram diferenças entre os tratamentos (Tabela 6). FADEX elevou significativamente os níveis de cálcio e fósforo no plasma dos jundiás em relação aqueles alimentados com FADE, apresentando valores de 111,71 e 85,96 mg/L, respectivamente (Figura 3). Apesar de não haver diferença estatística nos níveis de fósforo sangüíneos dos peixes do tratamento FADEX em relação ao FADFIT, houve maior deposição óssea desse mineral no primeiro em relação às demais dietas (Tabela 8), mesmo com altos níveis de fósforo disponível.

Tabela 8 – Minerais nos ossos de juvenis de jundiá alimentados com ração contendo ingredientes convencionais (CONT), farelo de arroz desengordurado (FADE), farelo de arroz desengordurado tratado com fitase (FADFIT) ou farelo de arroz desengordurado ácido fítico extraído (FADEX).

| Variáveis ¹ (% da matéria seca) | Tratamentos | | | | CV |
|--|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------|
| | CONT | FADE | FADFIT | FADEX | |
| P | 14,09±1,64 ^b | 13,77±0,92 ^b | 13,93± 1,12 ^b | 15,33 ± 0,40 ^a | 8,74 |
| Ca | 28,82 ± 0,84 | 27,42± 1,62 | 26,58± 1,42 | 27,44± 1,68 | 5,37 |
| MM | 52,35±1,63 ^b | 54,17± 0,65 ^{ab} | 54,59 ± 1,7 ^{ab} | 55,17 ± 0,36 ^a | 2,81 |

¹ P= fósforo; Ca= cálcio; MM= matéria mineral; Valores em % da matéria seca apresentados como média ± desvio padrão, n=9. Médias com letras diferentes, na linha, apresentam diferença significativa pelo teste de Duncan a nível de 5% de probabilidade.

Em estudo prévio Sardar et al. (2007) relataram níveis mais elevados de fósforo sanguíneos em alevinos de carpa comum alimentados com ração contendo fitase o que levou a maior deposição desse mineral no peixe inteiro. O mesmo não foi verificado por Forster et al. (1999) que ao avaliarem rações com 2% de fósforo total e níveis de fitase, não observaram diferenças na quantidade de cinzas, cálcio e fósforo na coluna vertebral de truta arco-íris, confirmando que a absorção do fósforo de fonte inorgânica é melhor que de ingredientes vegetais, mesmo com o uso de fitase (EYA; LOVELL, 1997; NAWANNA; SCHWARZ, 2007). Dessa forma, como o fósforo é extraído no processo físico-químico de desfitinização, pode-se adicioná-lo de uma fonte inorgânica de acordo com a exigência da espécie e assim diminuindo sua excreção.

Sendo o IP6 um antinutriente que afeta negativamente a absorção do fósforo, a suplementação desse mineral na dieta torna-se necessária. No entanto, grandes quantidades desse mineral são acumuladas nos tanques durante o período de cultivo (RIES, 2010) causando elevada multiplicação de algas que afetam os parâmetros químicos da água e causam grande mortalidade de peixes.

A maior quantidade de cinzas e fósforo nas fezes dos jundiás do tratamento FADE comparada com FADFIT atestam a atuação da fitase (Tabela 9). Apesar da absorção de fósforo intestinal ser controlada pela sua concentração no sangue (LALL, 2002), a maior quantidade circulante nos peixes do FADEX em relação ao FADE e maior nível de fósforo depositado em relação ao FADFIT, não refletiu em menor excreção desse mineral. Nawanna e Schwarz (2007) verificaram a mesma situação ao avaliarem a digestibilidade, deposição óssea e excreção do fósforo em juvenis de carpa comum que receberam ração com suplementação de fósforo inorgânico ou fitase. Eles relataram maior digestibilidade e deposição óssea causada pela dieta com suplementação de P mineral em relação à com fitase. Contudo, o inverso foi verificado em relação à excreção via fezes.

Tabela 9 – Fósforo (P) e matéria mineral (MM) nas fezes de juvenis de jundiá alimentados com ração contendo ingredientes convencionais (CONT), farelo de arroz desengordurado (FADE), farelo de arroz desengordurado tratado com fitase (FADFIT) ou farelo de arroz desengordurado ácido fítico extraído (FADEX).

| | Tratamentos | | | | CV |
|----|---------------|--------------|--------------|---------------|------|
| | CONT | FADE | FADFIT | FADEX | |
| P | 5,62±0,13 ab | 6,30±0,96 a | 5,17±0,24 b | 5,38±0,32 ab | 11,2 |
| MM | 32,61±1,58 ab | 34,32±1,33 a | 31,39±0,92 b | 32,04±1,62 ab | 4,84 |

Valores em % da matéria seca apresentados como média \pm desvio padrão, $n=3$. Médias com letras diferentes, na linha, apresentam diferença significativa pelo teste de Duncan a nível de 5% de probabilidade;

Com relação às formas de aplicação da fitase Wang et al. (2009) demonstraram que o pré-tratamento do farelo de soja com 500 FTU/kg aumenta a digestibilidade aparente (de 77 para 90,6%) e diminui significativamente a excreção de fósforo em comparação ao uso de 3000 FTU/kg aspergido na ração pronta.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando-se em consideração as condições experimentais e os resultados obtidos, sugere-se a condução de experimentos com rações de base protéica vegetal e baixos níveis de fósforo total para melhor avaliar as formas de farelos de arroz desengordurado, tratado com fitase e com ácido fítico extraído.

7 CONCLUSÕES

Os farelos de arroz desengordurado, tratado com fitase ou com ácido fítico extraído não influenciam o crescimento de juvenis de jundiá no período avaliado, sob condições de alto nível de fósforo disponível na ração.

O farelo de arroz desengordurado com ácido fítico extraído promove maior deposição de gordura no peixe inteiro comparado ao degradado com fitase.

Os dois farelos desfitinizados não diferem entre si quanto aos níveis de cálcio e fósforo circulantes, mas o FADEX promoveu melhor manutenção da glicemia e deposição de fósforo nos ossos que FADFIT.

A excreção de fósforo não difere entre os farelos desfitinizados testados nas condições deste experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração protéica e da energia de alimentos para pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.5, p.1101-1109, 2004.

ADEBIYI, A. P. et al. Isolation and characterization of protein fractions from deoiled rice bran. **European Food Research and Technology**, v.228, p.391-401, 2009.

AMISSAH, J. G. N. et al. Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. **Food Control**, v.14, p.21-24, 2003.

ANGEL, R. et al. Phytic acid chemistry: Influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficacy. **Journal of Applied Poultry Research**, n.11, p.471-480, 2002.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 16th ed. Supplement 1998. Washington: AOAC, 1018p., 1995.

AZEKE, M. A. et al. The effect of germination on the phytase activity, phytate and total phosphorus contents of some Nigerian-grown grain legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p.75-79, 2011.

BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Criação de jundiá** – Santa Maria: Ed. UFSM, 2004. 232p.

BARCELLOS, L. J. G. et al. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 121-123, 2001.

BARCELLOS L. J. G. et al. Haematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. **Aquaculture Research**, v.34, p.1465-1469, 2003.

BARCELLOS, L. J. G. et al. The effects of fasting on cortisol, blood glucose and liver and muscle glycogen in adult jundiá *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v.300, p.231-236, 2010.

BIDINOTTO, P. M.; SOUZA, R. H. S.; MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of microsamples. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, n.10, p.53-60, 1998.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

CAO, L. et al. Effects of pretreatment with microbial phytase on phosphorus utilization and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, v.14, p.99-109, 2008.

CAO, X. et al. Differences in functional properties and biochemical characteristics of congenetic rice proteins. **Journal of Cereal Science**, v.50, p.184-189, 2009.

CARNEIRO, P.; MIKOS, D.; BENDHACK, F. Processamento: O jundiá como matéria prima. **Panorama da Aqüicultura**, nº 78, 2003.

CHANPUT, W.; THEERAKULKAIT, C.; NAKAI, S. Antioxidant properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. **Journal of Cereal Science**, v.49, p.422-428, 2009.

CHITRA, U.; SINGH, U.; RAO, P.V. Phytic acid, in vitro protein digestibility, dietary fiber, and minerals of pulses as influence by processing methods. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.49, p.307-316, 1996.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10_11_10_11_28_48_boletim_portugues_-_nov_de_2010..pdf>. Acesso em: 30 nov. 2010.

CONTE, A. J. et al. Efeito da fitase na biodisponibilidade do fósforo do farelo de arroz em frango de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.547-552, 2002.

CORRÊIA V. et al. Crescimento de jundiá e carpa húngara criados em sistema de recirculação de água. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.5, p.1533-1539, 2009.

COLDEBELLA, I. J.; RADÜNZ NETO, J. Farelo de soja na alimentação de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.3, p.499-503, 2002.

COUTO, A. et al. Effect of water temperature and dietary starch on growth and metabolic utilization of diets in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, Part A, v.151, n.1, p.45-50, 2008.

CUNHA, M. A. et al. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.10, p.2107-2114, 2010.

DABROWSKI, K.; GUDERLEY, H. Intermediary metabolism. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Ed.). **Fish Nutrition**. 3rd ed., 2002. p.309-365,.

DENDOUGUI, F.; SCHWEDT, G. In vitro analysis of binding capacities of calcium to phytic acid in different food samples. **European Food Research and Technology**, v.219, p.409-415, 2004.

DENSTADLI, V. et al. Feed intake, growth, feed conversion, digestibility, enzymes activities and intestinal structure in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed graded levels of phytic acid. **Aquaculture**, v. 256, p.365-376, 2006.

DENSTADLI, V. et al. A comparison of online phytase pre-treatment of vegetable feed ingredients and phytase coating in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared cold water. **Aquaculture**, v.269, p.414-426, 2007.

ELLESTAD, L. E.; ANGEL, R.; SOARES JR., J. H. Intestinal phytase I: Detection and preliminary characterization of activity in the intestinal brush border membrane of hybrid striped bass *Morone saxatilis* x *M. chrysops*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.26, 249-258, 2002a.

ELLESTAD, L. E.; ANGEL, R.; SOARES JR., J. H. Intestinal phytase II: A comparison of activity and in vitro phytate hydrolysis in three teleost species with differing digestive strategies. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.26, p.259-273, 2002b.

EYA, J. C.; LOVELL, R. T. Net absorption of dietary phosphorus from various inorganic sources and effect of fungal phytase on net absorption of plant phosphorus by channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.28, n.4, p.385-391, 1997.

FACCIN, G. L. et al. Chemical, sensorial and rheological properties of a new organic rice bran beverage. **Rice Science**, v.16, n.3, p.226-234, 2009.

FERNANDES, J. B. K.; LOCHMANN, R.; BOCANEGRA, F. A. Apparent digestible energy and nutrient digestibility coefficients of diet ingredients for pacu *Piaractus brachypomus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 35, n. 2, 2004.

FORSTER, I. et al. Potential for dietary phytase to improve the nutritive value of canola protein concentrate and decrease phosphorus output in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) held in 11°C fresh water. **Aquaculture**, v.179, p.109-125, 1999.

FRACALOSI 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 Science**, v.26, n.3, p.345-352, 2004.

FUH, W. S.; CHIANG, B. H. Dephytinisation of rice bran and manufacturing a new food ingredient. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.81, p.1419-1425, 2001.

FURUYA, W. M. et al. Fitase na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Desempenho e digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.924-929, 2001.

GARRET, J. B. et al. Enhancing the thermal tolerance and gastric performance of a microbial phytase for use as a phosphate-mobilizing monogastric-feed supplement. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.5, p.3041-3046, 2004.

GAYLORD, T. G.; BARROWS, F. T.; RAWLES, S. D. Apparent digestibility of Gross nutrients from feedstuffs in extruded feeds for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, n. 6, 2008.

GOMIERO, L. M.; SOUZA, U. P.; BRAGA, F. M. S. Reprodução e alimentação de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) em rios do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, SP. **Biota Neotropica**, vol. 7, no.3, 2007. Disponível em: < <http://www.biotaneotropica.org.br/v7n3/pt/fullpaper?bn01907032007+pt>>. Acesso em: 26 jan. 2011.

GUALBERTO, D. G. et al. Effect of extrusion processing on the soluble and insoluble fiber, and phytic acid contents of cereal brans. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.51, p.187-198, 1997.

GUIMARÃES, I. G. et al. Nutrient digestibility of cereal grain products and by-products in extruded diets for Nile tilapia. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, n. 6, p. 781-789, 2008.

HAN, Y.; LEI, X. G. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.364, n.1, p. 83-90, 1999.

HERNÁNDEZ-UNZÓN, H. Y.; ORTEGA-DELGADO, M. L. Phytic acid in stored common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Foods for Human Nutrition**, v.39, p.209-221, 1989.

HUANG, H. et al. Diversity of beta-propeller phytase genes in the intestinal contents of grass carp provides insight into the release of major phosphorus from phytate in nature. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.6, p.1508-1516, 2009.

IMOROU TOKO, I.; FIOGBE, E. D.; KESTEMONT, P. Mineral status of African catfish (*Clarias gariepinus*) fed diets containing graded levels of soybean or cottonseed meals. **Aquaculture**, n. 275, p. 298-305, 2008.

KIES, A. K. et al. Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. *In vitro* studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p.1753-1758, 2006.

KOHLMEIER, M. Water-soluble vitamins and non-nutrients: Inositol. In: **Nutrient Metabolism**, 1.ed., 2003. p.634-642.

KUMAR, V. et al. Modulation of key enzymes of glycolysis, gluconeogenesis, amino acid catabolism, and TCA cycle of tropical freshwater fish *Labeo rohita* fed gelatinized and non-gelatinized starch diet. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.36, n.3, p.491-499, 2010.

LAI, P. et al. Phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from japonica rice bran. **Food Chemistry**, v.117, p.538-544, 2009.

LAINING, A. et al. Influence dietary phytic acid on growth, feed intake, and nutrient utilization in juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41, n. 5, p.746-754, 2010.

LALL, S.P. The minerals. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Ed.). **Fish Nutrition**. 3rd ed., 2002. p.259-308.

LAZZARI, R. et al. Diferentes fontes protéicas para a alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p. 240-246, jan./fev. 2006.

LAZZARI, R. et al. Protein sources and digestive enzyme activities in jundiá (*Rhamdia quelen*). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.67, n.3, p.259-266, 2010.

LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Microbial phytase can replace inorganic phosphorus supplements in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.28, n.4, p.402-406, 1997.

LIEBERT, F.; PORTZ, L. Nutrient utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. **Aquaculture**, v.248, p.111-119, 2005.

LOEWUS, F. A.; MURTHY, P. P. N. Myo-inositol metabolism in plants. **Plant Science**, v.150, p.1-19, 2000.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **The Journal of Biological Chemistry**. v.193 p.265-275, 1951.

LOSEKANN, M. E. et al. Alimentação do jundiá com dietas contendo óleos de arroz, canola ou soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, p.255-230, 2008.

LUO, Y. et al. Impact of soaking and phytase treatments on phytic acid, calcium, iron and zinc in faba bean fractions. **International Journal of Food Science e Technology**, v.44, p. 2590-2597, 2009.

MAENZ, D. D.; CLASSEN, H. L. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. **Poultry Science**, v.77, p.557-563, 1998.

MELO, J. F. B.; BOIJINK, C. L.; RADÜNZ NETO, J. Efeito da alimentação na composição química da carcaça do jundiá *Rhamdia quelen*. **Biodiversidade Pampeana**, v.1, n. 1, p.12-23, 2003.

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, v.145, p.181-187, 2006.

MEYER, G.; FRACALOSSO, D. M. Protein requirement of jundia fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. **Aquaculture**, v.240, p.331-343, 2004.

MEYER, G.;FRACALOSSO, D. M. Estimation of jundia (*Rhamdia quelen*) dietary amino acid requirements based on muscle amino acid composition. **Scientia Agricola**. v.62, n.4, p.401-405, 2005.

MEYER, G.; FRACALOSSO, D. M.; BORBA, M. R. A importância da quantidade de energia na ração de peixes. **Panorama da Aqüicultura**, v. 14, pg. 53-57, 2004.

MITCHELL, D. B. et al. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. **Microbiology**, v.143, p.245-252, 1997.

MORO, G. V. et al. Dietary non-protein energy sources : growth, digestive enzyme activities and nutrient utilization by the catfish jundiá, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture Research**, v.41, p.394-400, 2010.

MUJAHID, A. et al. Effect of various processing techniques and different levels of antioxidant on stability of rice bran during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p. 847-852, 2005.

MPA, 2007. Ministério da Pesca e Aqüicultura: **Participação da aqüicultura no setor pesqueiro nacional**. Disponível em <http://www.mpa.gov.br/#imprensa/2010/AGOSTO/nt_AGO_19-08-Producao-de-pescado-aumenta>. Acesso em: 11 jan. 2011.

NAWANNA, L. C.; SCHWARZ, F. J. Effect on supplemental phytase on growth, phosphorus digestibility and bone mineralization of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture Research**, v.38, p.1037-1044, 2007.

NAWANNA, L. C.; SCHWARZ, F. J. Effect os different levels of phytase on growth and mineral deposition im commom carp. (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Applied Ichthyology**, v.24, p.574-580, 2008.

NAWANNA, L. C. et al. Pre-treatment of dietary plant feedstuffs with phytase and its effect on growth and mineral concentration in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, p. 677-682, 2008.

OLIVEIRA-FILHO, P. R. C.; FRACALOSSO, D. M. Coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1581-1587 (suplemento), 2006.

PEDRON, F. **Composição e gelatinização do amido na resposta biológica do jundiá (*Rhamdia quelen*)**. 2010. 111f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

PENCI, M. C.; CONSTENLA, D. T.; CARELLI, A. A. Free-fatty acid profile obtained by enzymatic solvent-free hydrolysis of sunflower and soybean lecithins. **Food Chemistry**, v.120, p.332-338, 2010.

QURESHI, A. A.; SAMI, S. A.; KHAN, F. A. Effects of stabilized rice bran, its soluble and fiber fractions on blood glucose levels and serum lipid parameters in humans with diabetes mellitus types I and II. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v.13, p.175-187, 2002.

RAWLESS, S. D.; GATLIN, D. M. Nutrient digestibility of common feedstuffs in extruded diets for sunshine bass *Morone chrysops* ♀ x *M. saxatilis* ♂. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.31, n. 4, 2000.

RICHE, M.; GARLING JR. D. L. Effect of phytic acid on growth and nitrogen retention in tilapia *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture Nutrition**, v.10, p.389-400, 2004.

RIES, E. F. **Estudo da produção, caracterização e aplicações de nova fitase de *Saccharomyces cerevisiae***. 2010. 125f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

ROCHA, C. B. et al. Suplementação de fitase microbiana na dieta de alevinos de jundiá: efeito sobre o desempenho produtivo e as características de carcaça. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.6, p.1772-1778, nov./dez. 2007.

ROCHA, C. B. et al. Suplementação da enzima fitase e o desempenho e retenção mineral em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 151-157, 2008.

RODRIGUEZ, E.; MULLANEY, E. J.; LEI, X. G. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.268, p.373-378, 2000.

ROY, T.; MONDAL, S.; RAY, A. K. Phytase-producing bacteria in the digestive tracts of some freshwater fish. **Aquaculture Research**, v.40, p. 344-353, 2009.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas Brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2005. 186 p.

SAJJADI, M.; CARTER, C. G. Effect of phytic acid and phytase on feed intake, growth, digestibility and trypsin activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). **Aquaculture Nutrition**, v.10, p.135-142, 2004.

SARDAR, P.; RANDHAWA, H.S.; PRABHAKAR, S.K. Effect of dietary microbial phytase supplementation on growth performance, nutrient utilization, body compositions and haemato-biochemical profiles of *Cyprinus carpio* (L.) fingerlings fed soyprotein-based diet. **Aquaculture Nutrition**, v.13, p.444-456, 2007.

SATOH, S. et al. Effect of extrusion processing on the nutritive value of canola meal for chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in seawater. **Aquaculture Nutrition**, v.4, 115-122, 1998.

SILVA, M. A.; SANCHES, C.; AMANTE, E. R. Prevention of hydrolytic rancidity in rice bran, **Journal of Food Engineering**, v.75, p. 487-491, 2006.

STOREBAKKEN, T.; SHEARER, K. D.; ROEM, A. J. Availability of protein, phosphorus and other elements in fish meal, soy-protein concentrate and phytase-treated soy-protein-concentrate-based diets to Atlantic salmon, *Salmo salar*. **Aquaculture**, v.161, p.365-379, 1998.

TESKEREDŽIĆ, Z. et al. Assessment of undephytinized and dephytinized rapeseed protein concentrate as sources of dietary protein for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.131, p.261-277, 1995.

TOCHER, D. R. et al. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. **Aquaculture**, v.280, p.21-34, 2008.

USMANI, N.; JAFRI, A. K. Influence of dietary phytic acid on the growth, conversion efficiency, and carcass composition of mrigal *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) fry. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.33, n.2, p.199-204, 2002.

VIELMA, J.; LALL, S. P. Phosphorus utilization by Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in freshwater is not influenced by higher dietary calcium intake. **Aquaculture**, v.160, p.117-128, 1998.

VIELMA, J. et al. Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. **Aquaculture**, v.183, p.349-362, 2000.

VIELMA, J.; RUOHONEN, K.; PEISKER, M. Dephytinization of two soy proteins increases phosphorus and protein utilization by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, n.204, p.145-156, 2002.

WALKER, K. A. Changes in phytic acid and phytase during early development of *Phaseolus vulgaris* L. **Planta**, v.116, n.2, p.91-98, 1974.

WANG, F. et al. Effects of phytase pretreatment of soybean meal and phytase-sprayed in diets on growth, apparent digestibility coefficient and nutrient excretion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Aquaculture International**, v. 17, p.143-157, 2009.

WYSS, M. et al. Biochemical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): catalytic properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.2, p.367-373, 1999.

YOON, J. H.; THOMPSON, L. U., JENKINS, D. J. A. The effect of phytic acid on in vitro rate of starch digestibility and blood glucose response. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.38, p.385-842, 1983.

ZHANG, W; MULLANEY, E. J.; LEI, X. G. Adopting selected hydrogen bonding and ionic interactions from *Aspergillus fumigatus* phytase structure improves the thermostability of *Aspergillus niger* phyA phytase. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.9, p. 3069-3076, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise de cálcio e fósforo nos ossos

Reagentes

- ácido nítrico P.A.
- ácido perclórico P.A.
- Kit Doles de análise de cálcio
- Kit Doles de análise de fósforo

Solução para limpeza da vidraria

- ácido nítrico 30% (300 ml de ácido nítrico + 700 ml de água destilada)

Solução nitroperclórica

- misturar 5 partes de ácido nítrico P.A. com 1 parte de ácido perclórico P.A.

Procedimento para limpeza da vidraria

- deixar de molho todo o material que será utilizado por, pelo menos, 15 minutos e enxaguar bem com água destilada;
- As luvas também devem ser lavadas, pois possuem um pó que pode contaminar os tubos e as ponteiros ao pegá-las. Para isso, vista as luvas nas mãos, mergulhe os dedos na solução por alguns segundos e enxágüe com água destilada.

Procedimento de digestão

- pesar os ossos em balança analítica com, no mínimo, 3 casas decimais, colocar em tubo de microKjeldahl e adicionar 2 ml da solução nitroperclórica. 0,1g de osso é o suficiente, pois com uma quantidade maior necessitará de maior diluição para a leitura com os kits colorimétricos.
- levar ao bloco digestor deixando 30 minutos a 80°C e cerca de 3 horas a 200°C. A digestão está pronta quando o líquido fica transparente e sem sedimento no fundo do tubo indicando que os minerais estão totalmente dissolvidos no líquido. Deve-se cuidar para que o ácido não evapore todo, repondo-o, se necessário;
- após esfriar, completar o volume de líquido para 50 ml com água destilada e agitar bem, de preferência com vórtex.

- retirar uma alíquota de 5 ml, que será usada para as análises, e colocar em tubo de ensaio. Essa amostra deve ser armazenada em freezer até o momento da análise para evitar volatilização dos ácidos e concentração de minerais.

- o restante de amostra que fica nos tubos de microKjeldahl devem se quantificados com proveta graduada para se fazer os cálculos de diluição.

Tendo-se a amostra digerida, faz-se a análise de cálcio e fósforo de acordo com a metodologia descrita nos kits Doles® para urina, mas sem necessitar acidificar a amostra, como é indicado, pois já está ácida. Antes de pipetar a amostra para misturar com os reagentes, deve-se agitar bem o tubo de ensaio.

APÊNDICE B – Determinação de fósforo nas fezes e ingredientes

Os reagentes, soluções e procedimentos de limpeza são os mesmos do Apêndice A.

Procedimento de digestão

- pesar 0,5g de amostra em balança analítica com, no mínimo, 3 casas decimais, colocar em tubo de microKjeldahl, adicional 5 ml da solução nitroperclórica e agitar para misturar a amostra com o ácido cuidando para que não respingue;

- deixar em repouso por 12 horas para que, quando for aquecida, a amostra não suba e transborde;

- levar ao bloco digestor a 50°C, sempre observando se a amostra não irá subir. Caso isso aconteça, levante o tubo e agite-o. Fazer esse procedimento de levantar e agitar até que a amostra não suba mais. Se a amostra não subir quando chegar a 100°C, deixando de formar bolhas, pode elevar a temperatura para 200°C e então se passa a cuidar para não secar o ácido, adicionando-o quando necessário. A digestão está pronta quando o líquido ficar transparente e sem sedimento indicando que os minerais estão totalmente dissolvidos no líquido.

- após esfriar, completar o volume de líquido para 20 ou 50 ml com água destilada, de acordo com a concentração estimada dos minerais, e agitar bem.

- retirar uma alíquota de 5 ml, que será usada para as análises, e colocar em tubo de ensaio. Essa amostra deve ser armazenada em freezer até o momento da análise para evitar volatilização dos ácidos e concentração de minerais.

- o restante de amostra que fica nos tubos de microKjeldahl devem se quantificados com proveta graduada para se fazer os cálculos de diluição.

Tendo-se a amostra digerida, faz-se a análise de cálcio e fósforo de acordo com a metodologia descrita nos kits Doles® para urina, mas sem necessitar acidificar a amostra, como é indicado, pois já está ácida. Antes de pipetar a amostra para misturar com os reagentes, deve-se agitar bem o tubo de ensaio.

ANEXOS

ANEXO 1 – Detalhe das placas ósseas do crânio utilizadas nas análises de minerais.



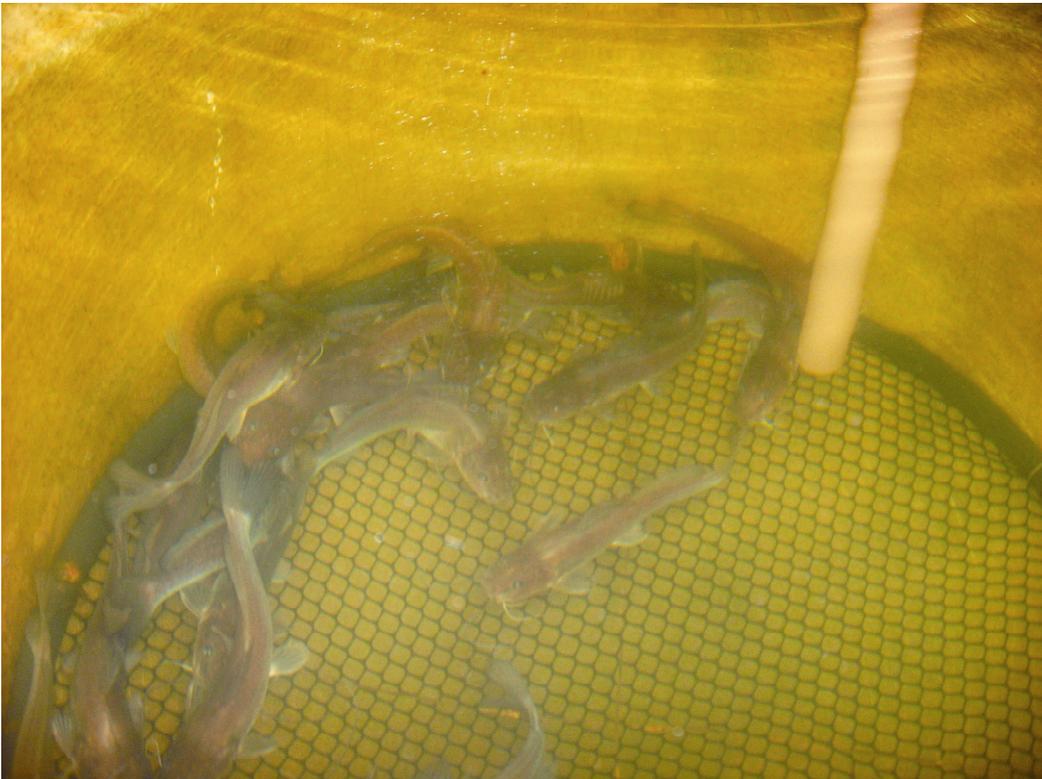
ANEXO 2 – Registro com tubo de falcon acoplado na parte inferior da incubadora



ANEXO 3 – Incubadoras de fibra de vidro e tanques de polipropileno utilizados para a pesquisa.



ANEXO 4 – Jundiás dentro da incubadora sobre a tela impedindo o contato e revolvimento das fezes.



ANEXO 5 – Isopores com gelo para evitar a proliferação bacteriana.

