

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

**Suplementação de amilase e solubilidade de amido na
digestibilidade da ração para pirarucu (*Arapaima gigas*)**

André Moreira Bordinhon

BIBLIOTECA DO INPA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

MANAUS-AM

2004

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

**Suplementação de amilase e solubilidade de amido na
digestibilidade da ração para pirarucu *Arapaima gigas***

BIBLIOTECA DO INPA

André Moreira Bordinhon

Orientador: Dr. Manoel Pereira Filho

Co-Orientador: Dr. Rodrigo Roubach

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Financiamento:

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

FAPEAM – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

MANAUS-AM

2004

T
597.550413
B729p

BORDINHON, ANDRÉ MOREIRA.

Suplementação de amilase e solubilidade de amido na digestibilidade da ração para pirarucu (*Arapaima gigas*)/ André Moreira Bordinhon.- Manaus: INPA/UFAM, 2004.

42p.: il

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

Orientador: Pereira Filho, Manoel

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

1. Piscicultura 2. *Arapaima gigas* 3. Nutrição de peixes carnívoros 4. Amilase exógena 5.

Solubilidade de amido 6.Pirarucu

CDD 19ªed. 597.550413

SINOPSE

Avaliou-se a digestibilidade de quatro rações experimentais para pirarucu: (T1) ração sem amilase exógena e farinha de trigo crua, (T2) ração sem amilase exógena e farinha de trigo cozida, (T3) ração com amilase exógena e farinha de trigo crua, (T4) ração com amilase exógena e farinha de trigo cozida por duas metodologias de coleta de fezes: em água e por dissecação. Os valores baixos dos coeficientes de digestibilidade indicam que o pirarucu possui reduzida capacidade para aproveitar a fração de carboidratos dos ingredientes. Contudo, os resultados em ambos os métodos de coleta apontam para uma melhoria da digestibilidade com a solubilização do amido da farinha de trigo cozida e maximização deste efeito com a suplementação com amilase exógena.

Palavras-chave: 1. Piscicultura 2. *Arapaima gigas* 3. Nutrição de peixes carnívoros 4. Amilase exógena 5. Solubilidade de amido 6.Pirarucu

À minha mãe, Terezinha de Jesus Moreira,
pessoa que guiou todos os meus passos até hoje.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Manoel Pereira Filho e Dr. Rodrigo Roubach, pela orientação, apoio, ensinamentos e amizade, fundamentais nesta jornada.

Aos amigos da sala dos alunos de pós-graduação da CPAQ: Bruno A. Sagratzki Cavero, Daniel P. Ituassú e Flávio A. L. Fonseca. Obrigado pelo apoio e orientações na execução deste trabalho.

Ao Dr. Jorge Antônio Moreira da Silva pelas valiosas orientações na montagem do projeto deste estudo e pela amizade.

À Sra. Maria Inês Oliveira Pereira pela amizade, atenção e dedicação na análises bromatológicas.

À Sra. Suzana Kawashima pela amizade e carinho que tem com todos da CPAQ além da inestimável ajuda na execução dos experimentos.

Ao Sr. Atilio, Sr. Marcos, Sr. Osvaldino, Sr. Olegário e todos os outros funcionários da CPAQ pela ajuda prestada na execução dos experimentos e pela amizade.

Ao Dr. Edson Lessi pelas orientações quanto aos procedimentos de análise e a todos os funcionários da Coordenação de Pesquisas em Tecnologia de Alimentos (CPTA) – INPA, pelo apoio operacional na execução do experimento.

Ao Dr. Carlos Edwar pelas orientações para montagem do desenho experimental e esclarecimento das dúvidas de estatística.

À amiga Kedma Yamamoto por todo apoio nesta jornada, pela amizade e compreensão.

À “gang das macrófitas aquáticas”: Alzira Miranda, Ana Cristina Menezes e Káren Prado, pela amizade, apoio e pelas festas.

À minha irmã Tida Maia e seu esposo Luciano Maia que abriram as portas de sua casa em Manaus, por todo seu apoio e carinho.

À Terezinha Moreira e seu esposo João B. Souza por terem vindo tantas vezes à Manaus e seu apoio e carinho.

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

Ao CNPq e à FAPEAM pela bolsa concedida e financiamento.

Agradeço também a todas as outras pessoas que contribuíram para esta realização e que pela ineficácia da memória humana foram omitidas neste texto. OBRIGADO!

RESUMO

O pirarucu (*Arapaima gigas*), peixe carnívoro amazônico, possui características de rusticidade e desempenho que o torna uma espécie promissora para aqüicultura. Contudo, peixes carnívoros necessitam de uma alimentação com alto teor de proteínas que desempenham importante papel no fornecimento de energia nestes animais. Otimizar a utilização de proteínas – direcionando-as principalmente para síntese de tecidos - através da melhoria da digestibilidade de carboidratos, uma fonte potencial de energia, apresenta-se com uma alternativa para diminuição dos custos de produção e diminuição de danos ambientais. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da utilização de amilase exógena e do cozimento da farinha de trigo sobre a digestibilidade da ração para o pirarucu, obtida através da coleta de fezes na água e por dissecação. O experimento foi conduzido em um delineamento fatorial de duas entradas (Two-way) com quatro rações experimentais: (T1) ração sem amilase exógena e farinha de trigo crua, (T2) ração sem amilase exógena e farinha de trigo cozida, (T3) ração com amilase exógena e farinha de trigo crua, (T4) ração com amilase exógena e farinha de trigo cozida. No método de coleta de fezes por dissecação, o tratamento T3 apresentou o menor coeficiente de digestibilidade, e entre os outros tratamentos não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$). Com as fezes coletadas na água, o tratamento T4 apresentou digestibilidade superior, e os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística entre si. Contudo, em ambos os métodos de coleta de fezes a discriminação das médias apresentou-se igual, indicando que o método de coleta de fezes não se apresentou como fonte de erro significativa a ponto de levar a conclusões discrepantes. Os valores baixos dos coeficientes de digestibilidade indicam que o pirarucu possui reduzida capacidade para aproveitar os carboidratos dos ingredientes. A

solubilização do amido da farinha de trigo cozida melhorou a digestibilidade da ração. Este efeito é maximizado com acréscimo de amilase exógena.

ABSTRACT

Pirarucu (*Arapaima gigas*), an Amazonian carnivorous fish, has rusticity and performance which make it a high potential specie to aquaculture activity. However, carnivorous fishes need a high protein concentration food. This protein is also an important source of energy to this fishes. Optimize the protein utilization, leading it to tissues building, through the improvement of carbohydrates digestibility can be an alternative to get a low cost production and cut down the environment damage. This work aims to evaluate the effect of exogenous amylase and cooking of wheat flour in the digestibility of rations to pirarucu. The feces were collected by methods: dissection and in the water. The experiment was conducted in a two-way factorial design, with four experimental ration: (T1) feed without amylase and raw wheat flour, (T2) feed without amylase and cooked wheat flour, (T3) feed with amylase and raw wheat flour, (T4) feed with amylase and cooked wheat flour. The T3 treatment showed the lowest digestibility (feces collected by dissection). The T4 treatment showed the best digestibility (feces collected in the water). Although in both feces collection methods the ranking of rates was the same, indicating that the methods of obtain feces did not lead to very different conclusions. The low rates of digestibility indicate that pirarucu has a reduced ability to use the carbohydrates of the diet. The wheat flour starch solubilization improved the digestibility of ration. This effect is maximized with amylase supplementation.

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	III
SINOPSE	III
DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS	6
1.1.1. Geral	6
1.1.2. Específicos	6
2. MATERIAL E MÉTODOS:	7
2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	7
2.2. PREPARO DAS RAÇÕES	8
2.3. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	10
2.4. COLETA DAS FEZES	10
2.4.1. Coleta de Fezes na água:	11
2.4.2. Coleta de fezes por dissecação	11
2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS	12
2.5.1. Umidade	12
2.5.2. Proteína bruta (PB)	12

2.5.3. Extrato etéreo (EE)-----	13
2.5.4. Energia bruta (EB)-----	13
2.6. DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE DAS DIETAS -----	13
2.7. PREPARO DOS EXTRATOS -----	14
2.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA AMILASE NO CONTEÚDO INTESTINAL-----	14
2.10. TRATAMENTO ESTATÍSTICO-----	15
3. RESULTADOS -----	16
4. DISCUSSÃO-----	18
4.1. AVALIAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE-----	18
4.2. EFEITO DA GELATINIZAÇÃO DO AMIDO ATRAVÉS DO COZIMENTO DA FARINHA DE TRIGO ASSOCIADO À SUPLEMENTAÇÃO COM AMILASE EXÓGENA. -----	20
4.3. ATIVIDADE DE AMILASE NO CONTEÚDO INTESTINAL.-----	23
5. CONCLUSÕES -----	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	25

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. FORMULAÇÃO DAS DIETAS EXPERIMENTAIS	9
TABELA 2. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS RAÇÕES.....	10
TABELA 3. COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL (CDA TOTAL) E DE ENERGIA BRUTA (CDA EB) – ESTIMADA A PARTIR DE FEZES DE PIRARUCU COLETADAS POR DISSECAÇÃO.	16
TABELA 4. COEFICIENTES DE DIGESTIBILIDADE APARENTE (CDA) – ESTIMADA A PARTIR DE FEZES DE PIRARUCU COLETADAS EM ÁGUA.	17

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DISTRIBUIÇÃO DAS UNIDADES EXPERIMENTAIS.	8
FIGURA 2. COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL (CDA TOTAL) ESTIMADA POR FEZES DE PIRARUCU COLETADAS EM ÁGUA E POR DISSECAÇÃO.....	17
FIGURA 3. COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE APARENTE DE ENERGIA BRUTA (CDA EB) ESTIMADA POR FEZES DE PIRARUCU COLETADAS EM ÁGUA E POR DISSECAÇÃO.....	18

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. DESENHO EXPERIMENTAL.	7
QUADRO 2. DISTRIBUIÇÃO DAS RAÇÕES NOS TRATAMENTOS.....	9

1. Introdução

O Pirarucu (*Arapaima gigas*), peixe amazônico pertencente à família Osteoglossidae (Nelson, 1994; Li e Wilson, 1996), de hábito alimentar carnívoro, apresenta-se como uma das espécies da região mais promissoras para aqüicultura. Sua alta velocidade de crescimento, podendo chegar a 10kg no primeiro ano de criação, rusticidade no manuseio (Carvalho & Nascimento, 1992; Imbiriba, 2001) e respiração aérea (Fontenele, 1955) o conferem grande potencial para criação intensiva. Entretanto, conhecimentos sobre sua nutrição ainda são escassos.

Espécies de peixes carnívoras exigem altos níveis de proteína na sua dieta (N.R.C., 1993). Ituassú (2001) sugeriu que a quantidade de proteína bruta necessária na alimentação de juvenis de pirarucu seria acima de 48%. Isto acarreta em um alto custo com sua alimentação artificial, uma vez que a proteína é o componente mais dispendioso da formulação da ração. O alto nível de proteína está associado à utilização deste nutriente como fonte de energia pelos peixes carnívoros. Busca-se então a otimização da fração protéica da ração, utilizando-a para síntese de tecido ao invés de fonte de energia (Shiau & Lan, 1996).

Os carboidratos poderiam ser utilizados como uma alternativa, porém o metabolismo de espécies carnívoras de peixes está adaptado para utilizar proteínas como principal fonte energética (Peres & Oliva-Teles, 2002). Isto se deve ao metabolismo mais eficiente de aminoácidos em relação à glicose na obtenção de energia. Este fato está associado a pouca disponibilidade de carboidratos de origem vegetal, principalmente amido, em ambiente natural e talvez também à habilidade de excretar nitrogênio sob forma de amônia, já que dispensam gasto de energia na formação de uréia ou ácido úrico, como no caso de mamíferos e aves, respectivamente (Smith, 1980; Chow e Halver, 1980). A taxa

ótima de proteína/energia pode ser reduzida se uma fonte de energia complementar (carboidrato) é fornecida permitindo economia de proteínas (Álvarez, 1999).

Os carboidratos são absorvidos sob forma de monossacarídeos (Baldisserotto, 2002). A utilização de amido pelos animais como fonte de carboidratos depende diretamente da sua capacidade de sintetizar amilases.

Chakrabarti *et al.* (1995) questionaram a dependência da atividade da amilase em relação à dieta fornecida atribuindo a habilidade de digestão de amido a características específicas da família à qual a espécie pertence. A digestão de amido em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, outra espécie carnívora, decresce progressivamente quando o nível de carboidrato aumenta além de 20% na dieta (Chow e Halver, 1980). Podoskina *et al.* (1997) concluíram que a utilização de amido pela truta arco-íris foi limitada apenas pela sua baixa digestibilidade, não por parâmetros metabólicos, como por exemplo, a concentração de glicose no plasma.

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

Segundo Hidalgo *et al.* (1999), a atividade de amilase é baixa em espécies carnívoras como a enguia *Anguilla anguilla*, truta *Oncorhynchus mykiss* e “seabream” *Spaurus aurata*. Os resultados deste estudo postulam que a atividade desta enzima depende diretamente da sua dieta natural. Os autores também sugerem que a habilidade dos animais de metabolizar carboidratos depende diretamente da sua capacidade de sintetizar amilase, já que os monossacarídeos são completamente absorvidos no trato digestório destas espécies.

Contudo, mesmo com as diferenças interespecíficas sobre a tolerância a amido na dieta, de forma geral os monossacarídeos, principalmente a glicose, são os produtos finais da digestão de amido. Apesar da glicose não aparentar ser a principal fonte de energia para peixes carnívoros em relação a proteínas e gorduras, esta prevalece como a forma de carboidratos mais metabolizada nas células. Sua molécula proporciona a liberação de energia necessária à manutenção das funções básicas do organismo (Walton & Cowey, 1982).

Chow & Halver (1980) afirmaram que a truta arco-íris pode utilizar acima de 60% da glicose, sacarose ou lactose fornecida na dieta, desde que a proporção de amido fornecido no alimento não ultrapasse 20%. Isto demonstra que contrariamente ao que se acreditava, este animal pode utilizar carboidratos como fonte primária de energia. Acredita-se que sua absorção ocorra na superfície do epitélio intestinal. Contudo as taxas de absorção de carboidratos ainda não estão disponíveis.

O arranjo cristalino do amido pode influenciar sua digestão. Amido cozido ou gelatinizado são mais tolerados na dieta fornecida a espécies carnívoras. A digestibilidade de carboidratos varia inversamente com o conteúdo de amido cru presente na dieta. Este fato se aplica principalmente em peixes carnívoros. O amido adsorve moléculas de amilase, e isso se torna mais evidente no seu estado cru. Provavelmente esta seja uma das principais razões da maior digestibilidade de amido solubilizado (Spannhof & Plantikow, 1982).

Quando os salmonídeos são submetidos a uma dieta rica em amido gelatinizado, seu nível de glicose plasmática aumenta rapidamente, levando horas para voltar aos níveis normais. Comportam-se como mamíferos diabéticos devido ao pobre controle de glicose em seu organismo (Walton & Cowey, 1982). Shiau (1997) afirma ainda que os níveis de

insulina em peixes são equivalentes ao encontrados em mamíferos, não esclarecendo o metabolismo de carboidratos.

Para Corrêa *et al.* (1998) a atividade de amilase varia de acordo com a quantidade de amido solúvel na dieta, de maneira não diretamente proporcional, mas com um nível intermediário otimizando a síntese de amilase. Neste mesmo trabalho realizado com pacu, *Piaractus mesopotamicus*, e tambacu, *Colossoma macropomum* x *P. mesopotamicus*, os níveis de glicose e glicogênio muscular respondem diretamente aos níveis intestinais de amilase.

Num estudo realizado com sea bass, *Dicentrarchus labrax*, por Peres & Oliva-Teles (2002), os autores também encontraram um maior coeficiente de digestibilidade para energia e amido com o aumento do nível de amido gelatinizado. Entretanto, o consumo foi reduzido ao aumentar o nível de amido na dieta. A incorporação parcial de amido gelatinizado aumenta significativamente a eficiência alimentar, mas a substituição total do amido cru acarreta em perdas na taxa de crescimento. Neste estudo, a performance dos animais foi reduzida a partir de níveis superiores a 25% de amido gelatinizado na dieta.

Shiau & Lan (1996) não encontraram mudança na taxa de crescimento da garoupa, *Epinephelus malabaricus*, ao diminuir o conteúdo de proteína na dieta e aumentar o nível energético com lipídeos. Isto sugere que a proteína pode ter o seu uso otimizado quando os requerimentos calóricos são alcançados.

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

dieta, menor a carga poluente na água e mais eficiente a produção de peixes (Kubitza, 1998; Lovell, 1989a).

A utilização de enzimas exógenas nas dietas de suínos e aves reduz a síntese de enzimas endógenas, disponibilizando mais aminoácidos para a síntese protéica (Yin *et al*, 2001). Em situações normais, cerca de 25% das necessidades diárias de proteína são destinadas para síntese de enzimas endógenas, em aves. Estes animais suplementados com amilase numa ração à base de milho reduziram a síntese desta enzima em 23,4% (Fischer *et al.*, 2002). Contudo estes estudos em peixes ainda são escassos.

Enzimas também têm sido utilizadas com o objetivo de incorporar matérias primas de menor qualidade às rações de animais domésticos (Nery *et al.*, 2000) e peixes (Ng *et al.*, 2002), propiciando menor impacto causado por dejetos e aproveitamento de ingredientes disponíveis à cada região.

Para fomento da atividade aquícola com o pirarucu é necessário obter conhecimentos mais aprofundados sobre sua nutrição, proporcionando redução no custo de sua alimentação artificial e diminuindo o impacto causado pela excreção de nitrogênio nos efluentes. A melhoria da capacidade de utilizar amido pode se apresentar como uma alternativa na tentativa de minimizar danos ambientais e minimizar custos de produção desta espécie, seja pela adição de amilase ou pela melhoria da solubilidade do amido fornecido.

1.1.Objetivos

1.1.1. Geral

- Avaliação do efeito da utilização de amilase exógena sobre a digestibilidade de rações para pirarucu, *Arapaima gigas*.

1.1.2. Específicos

- Comparar a influência da incorporação do amido gelatinizado e da suplementação enzimática na digestibilidade da ração;
- Comparar o efeito da incorporação de amido gelatinizado e da suplementação enzimática sobre a atividade de amilase no bolo alimentar presente no intestino do pirarucu, na faixa de peso entre 2,0 –3,0 kg;
- Comparar os métodos de avaliação da digestibilidade por coleta de fezes na água e por dissecação.

2. Material e métodos:

Os experimentos foram realizados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, nas dependências da Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura – CPAQ, Manaus, Amazonas.

Foram utilizados juvenis de pirarucu, com peso médio de 2,36 kg ($\pm 0,44$ kg), adquiridos em 2001, procedentes do município de Coari, Estado do Amazonas.

A enzima amilase utilizada neste estudo foi doada pela empresa Alltech do Brasil S.A.

2.1 Delineamento experimental

A digestibilidade aparente das rações, determinada *in vivo*, foi avaliada por meio de um experimento composto por quatro tratamentos distribuídos segundo um esquema fatorial 2x2 (ANOVA two –way):

Quadro 1. Desenho experimental.

Sem amilase		Com amilase	
0% de amido cozido	13% de amido cozido	0% de amido cozido	13% de amido cozido
T1	T2	T3	T4

Quatro tratamentos (T1, T2, T3, T4) foram avaliados em três repetições, totalizando 12 unidades experimentais. Cada unidade experimental era composta por um tanque-rede de 1m³ (1m x 1m x 1m), cada um com seis animais. Tais unidades foram distribuídas aleatoriamente (Figura 1) em um tanque escavado com paredes de alvenaria e fundo de

argila com 19m x 12m x 1,5 m. A homogeneidade dos animais em relação ao peso e comprimento foi avaliada através do teste de Cochran a 5% de significância. O valor não significativo ($p>0,05$), indicou a homogeneidade dos animais experimentais distribuídos dentre os tratamentos.

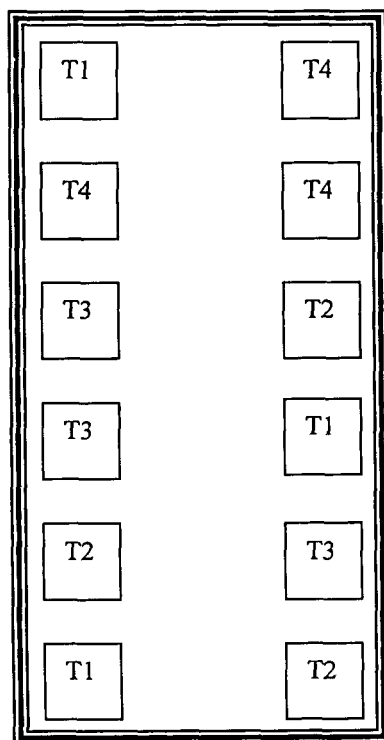


Figura 1. Distribuição aleatória das unidades experimentais (tanques-rede) no tanque escavado.

2.2 . Preparo das rações

As rações correspondentes aos tratamentos T1, T2, T3, T4 foram manufaturadas com a formulação e composição centesimal descritas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Na elaboração das rações dos tratamentos T2 e T4 a farinha de trigo utilizada foi cozida antes de ser adicionada aos outros ingredientes. A farinha de trigo foi cozida após pesagem ainda seca, adicionando-se 300mL de água, até à temperatura de 70°C por 7 minutos, com constante homogeneização. Este processo confere gelatinização e

consequentemente maior solubilidade à fração de amido contida neste ingrediente (Singh *et al*, 2003).

A adição de amilase exógena e o estado físico da farinha de trigo estão descritos no

Quadro 2.

Tabela 1. Formulação das dietas experimentais correspondentes aos tratamentos para avaliação do efeito da adição de amilase exógena e da solubilidade de amido na digestibilidade da ração para pirarucu *Arapaima gigas*.

INGREDIENTES *	QUANTIDADE (%)			
	T1	T2	T3	T4
Farinha de Peixe	10,0	10,0	10,0	10,0
Farelo de Soja	28,5	28,5	28,5	28,5
Fubá de milho	16,0	16,0	16,0	16,0
Farinha de trigo crua	13,0	13,0	0,0	0,0
Farinha de trigo cozida	0,0	0,0	13,0	13,0
P. Vitamínico	1,0	1,0	1,0	1,0
Protenose	25,0	25,0	25,0	25,0
Óleo de soja	6,0	6,0	6,0	6,0
Amilase	0,0	0,0	0,5	0,5
Óxido de cromo	0,5	0,5	0,5	0,5
Total	100,0	100,0	100,0	100,0

Quadro 2. Distribuição das rações nos tratamentos para avaliação do efeito da adição de amilase exógena e da solubilidade de amido na digestibilidade da ração para pirarucu *Arapaima gigas*.

Ração 1 (T1):	Ração sem cozimento de nenhum ingrediente e sem adição de amilase.
Ração 2 (T2)	Ração com farinha de trigo cozida e sem amilase.
Ração 3 (T3)	Ração sem cozimento de nenhum ingrediente com adição de amilase.
Ração 4 (T4)	Ração com farinha de trigo cozida e sem adição de amilase.

Tabela 2. Composição centesimal das rações experimentais correspondentes aos tratamentos para avaliação do efeito da adição de amilase exógena e da solubilidade de amido na digestibilidade da ração para pirarucu *Arapaima gigas*.

Ração	MS%	PB%	EE%	Cinzas %	FB %	EEN %	Energia Bruta (Kcal/Kg)
Tratamento 1	92,2	36,7	10,8	5,0	2,2	45,3	4426,06
Tratamento 2	93,9	37,7	10,3	5,3	3,8	42,9	4467,96
Tratamento 3	90,6	39,0	11,2	5,3	2,4	42,1	4624,81
Tratamento 4	89,5	40,0	10,1	5,2	2,7	42	4659,90

(PB: proteína bruta; EE: extrato etéreo; FB: fibra bruta; MS: matéria seca; EEN: extrativo não nitrogenado).

*Obtida segundo o método descrito no item 2.5

As rações foram preparadas contendo 0,5% de óxido de cromo, utilizado como marcador inerte para análise de digestibilidade aparente por via indireta. Os animais foram previamente adaptados com rações peletizadas, manufaturadas com a formulação correspondente ao tratamento ao qual pertenciam, exceto pela ausência do óxido de cromo.

2.3. Condições experimentais

A adaptação dos peixes às condições experimentais (adaptação à ração experimental e aos tanques rede) foi feita durante quatro semanas (28 dias). Os animais foram alimentados duas vezes ao dia (às 8:30 e às 17:00 horas), até a saciedade aparente, com as rações de adaptação correspondentes aos seus respectivos tratamentos.

2.4. Coleta das fezes

As fezes foram coletadas por dois métodos, um por dissecação e outro pela coleta de fezes excretadas na água.

2.4.1. Coleta de Fezes na água:

Após a fase de adaptação à nova ração e aos tanques-rede, foram coletadas amostras de fezes de todos os animais. Os indivíduos foram retirados individualmente do tanque rede e colocados em câmaras coletoras de fezes. Estas câmaras consistiam de tanques de fibra de vidro com volume total de 1200 litros de água, suspensos por armações de ferro. Ao fundo da parte interna destes tanques foi adaptada uma tela de PVC com malha de 5 cm, com objetivo de impedir a movimentação dos peixes junto às fezes precipitadas e sua conseqüente quebra (lixiviação). Na parte inferior dos tanques foram adaptados dois registros. No processo de coleta das fezes o registro superior permanecia aberto enquanto o inferior permanecia fechado. No momento da retirada das fezes fechava-se o registro superior e abria-se o inferior sendo coletadas as fezes por ação da gravidade e armazenadas em frascos coletores para posterior análise de sua composição centesimal, energia e percentagem de óxido de cromo.

2.4.2. Coleta de fezes por dissecação

Seis indivíduos de cada tratamento (dois de cada unidade experimental) sorteados aleatoriamente, num total de vinte e quatro peixes, foram sacrificados por hipotermia, em banho de água e gelo. Os animais foram pesados, medidos e a coleta de fezes foi realizada no terço posterior (fezes contidas na porção posterior correspondente a 1/3 do comprimento intestinal). Após a coleta as fezes eram congeladas e posteriormente liofilizadas. Em seguida, foram analisados seus teores de energia bruta, percentagem de Cr_2O_3 , e matéria seca.

O conteúdo intestinal do trato digestório foi coletado e liofilizado para posterior análise das enzimas.

2.5. Métodos analíticos

A análise da composição centesimal das amostras de cada uma das rações experimentais e das fezes coletadas correspondentes aos quatro tratamentos foi realizada segundo a metodologia descrita pela *Association of Official Agricultural Chemists / A. O. A. C.* (1995). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição de Peixes/ CPAQ /INPA.

2.5.1. Umidade

A determinação de umidade foi realizada em duas etapas:

Pré-secagem: realizou-se a liofilização das amostras por sublimação do gelo a -40°C e posterior equilíbrio com a umidade ambiente.

Matéria seca (MS) – foi baseada na determinação da perda de peso das amostras submetidas a aquecimento em estufa a 105°C até atingir peso constante.

A umidade total foi obtida através da somatória da umidade resultante na liofilização e na estufa a 105°C .

2.5.2. Proteína bruta (PB)

Foi calculada a quantidade de proteína presente nas amostras através da determinação do nitrogênio total, pelo método de micro-Kjeldahl. As concentrações de proteína bruta das amostras foram obtidas multiplicando-se os valores de nitrogênio total pelo fator de conversão desses valores em proteína bruta ($\times 6,25$), expressos em base seca.

2.5.3. Extrato etéreo (EE)

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

2.5.4. Energia bruta (EB)

A energia bruta (kcal/kg) de todas as amostras de rações e fezes foi obtida através de bomba calorimétrica, modelo Parr 1271. As amostras com aproximadamente 1g, foram prensadas formando pastilhas e colocadas para queima em bomba adiabática. A correção para as substâncias formadas durante a combustão das amostras foi feita utilizando-se titulação com solução de carbonato de sódio (1ml da solução = 1cal/g).

2.6. Determinação da digestibilidade das dietas

A digestibilidade foi estimada pelo método indireto através de digestão ácida úmida, segundo o método proposto por Furukawa e Tsukahara (1966) utilizando-se como marcador inerte o óxido de cromo (Cr_2O_3) nas fezes e na ração.

O cálculo do valor do coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) foi determinado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{CDA (\%)} = 100 - \left\{ \left[\frac{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ na ração}}{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ nas fezes}} \right] \times \left[\frac{\% \text{nutriente nas fezes}}{\% \text{nutriente na ração}} \right] \right\}$$

(Shipton & Britz, 2001; Fernandes *et al*, 1998; Cho; 1985)

Nas fezes obtidas por dissecação foram determinados somente os valores de digestibilidade total (CDA total) e de energia bruta (CDA EB), devido à reduzida quantidade de material fecal obtido por este método.

2.7. Preparo dos extratos enzimáticos

Dos indivíduos dos quais foram coletadas fezes por dissecação (item 2.4.2), também se coletou o conteúdo intestinal (porção anterior e média do intestino: 2/3 anteriores do comprimento do intestino). Este material depois de liofilizado sofreu homogeneização, em banho de gelo, com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 em solução de glicerina 50%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, durante 3 minutos. O sobrenadante obtido foi usado nas determinações da amilase. Todos os procedimentos foram realizados mantendo-se a temperatura da amostra a 4°C (Worthington Enzyme Manual, 1983).

2.8. Determinação da atividade da amilase no conteúdo intestinal

A atividade da amilase foi determinada utilizando o método de Bernfeld (1955), modificado. Em 1,0 ml de solução de amido em tampão Tris 0,1M pH 7,0 contendo NaCl 0,02M foi adicionado volume adequado do conteúdo intestinal, previamente liofilizado, sendo a mistura da reação foi incubada por 15 minutos a 37°C. Decorrido o tempo de reação, foi adicionado 100µl de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) a 5% e hidróxido de bário ($Ba(OH)_2$) a 0,3N, sendo a mistura da reação centrifugada a 3000 gravidades por 2 minutos. Para determinar a atividade enzimática foi utilizada a digestão de amido como padrão. O material sobrenadante obtido e os açúcares redutores (glicose), antes e após a incubação, foram determinados utilizando-se o método enzimático da glicose oxidase (Kit Doles®),

considerando que uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de 1 μ g de glicose por minuto (Worthington Enzyme Manual, 1983).

2.10. Tratamento estatístico

Os valores dos coeficientes de digestibilidade aparente: total (CDA total) e energia bruta (CDA EB) de cada tratamento realizados pelos dois métodos de coleta, foram analisados através de análise variância "two way" para delineamento inteiramente casualizado (nível de 5% de significância). Os valores percentuais dos coeficientes de digestibilidade foram ajustados pela transformação arco-seno. Para a separação das médias foi empregado o teste de Tukey ($P < 0,05$) (Zar, 1984).

3. Resultados

Nos resultados apresentados pelo método de coleta por dissecação, o tratamento T3 apresentou menor média no CDA total e CDA-EB (Tabela 3). Apesar do tratamento T4 ter os maiores valores de CDA-total e CDA EB, este não possui diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os coeficientes das rações correspondentes aos tratamentos T1 e T2.

Resultados semelhantes foram encontrados no método de coleta na água, com o tratamento T4 com valores mais elevados de CDA (total e EB) e os outros tratamentos com digestibilidade inferior, sem diferença estatística entre si ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 3. Coeficiente de Digestibilidade Aparente total (CDA total) e de energia bruta (CDA EB) – estimada a partir de fezes de pirarucu (*Arapaima gigas*) coletadas por dissecação.

	T1	T2	T3	T4
CDA total	41,67 ab	41,21 ab	32,15 b	46,70 a
CDA energia	56,65 ab	53,50 ab	49,06 b	60,24 a

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

Tabela 4. Coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) – estimada a partir de fezes de pirarucu (*Arapaima gigas*) coletadas na água.

	T1	T2	T3	T4
CDA Total	36,78b	34,56 b	30,64 b	50,96 a
CDA Energia	41,15 ab	37,74 b	36,57 b	57,15 a

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

As Figuras 2 e 3 apresentam os valores do coeficiente de digestibilidade total (CDA total) e de energia (CDA EB) nos dois métodos de coleta de fezes. Tais coeficientes apresentaram uma variação reduzida entre os métodos de coleta de fezes na água e por dissecação. Em ambos os métodos, a discriminação das médias de CDA total e EB apresentam-se iguais. Os valores encontrados pelo método de coleta de fezes na água possuem valores de digestibilidade inferiores.

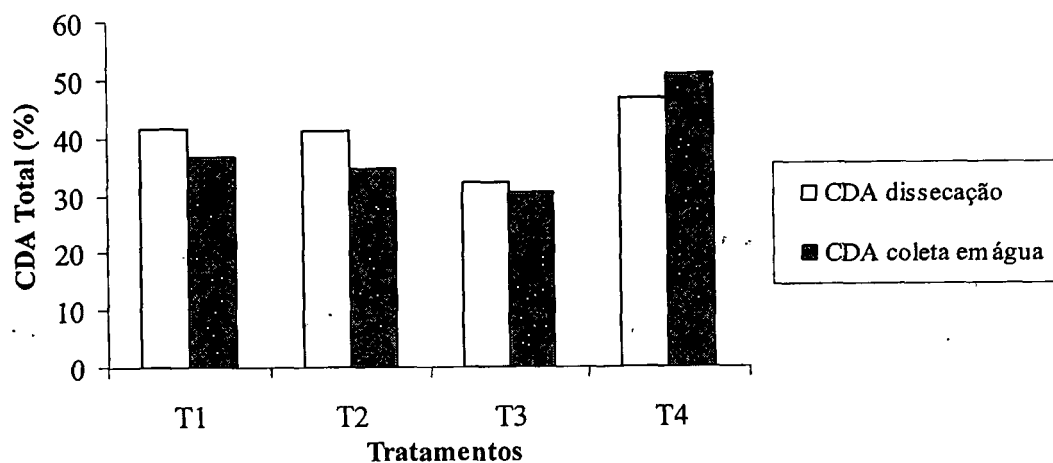


Figura 2. Coeficiente de digestibilidade aparente total (CDA total) estimada a partir de fezes de pirarucu *Arapaima gigas* coletadas na água e por dissecação

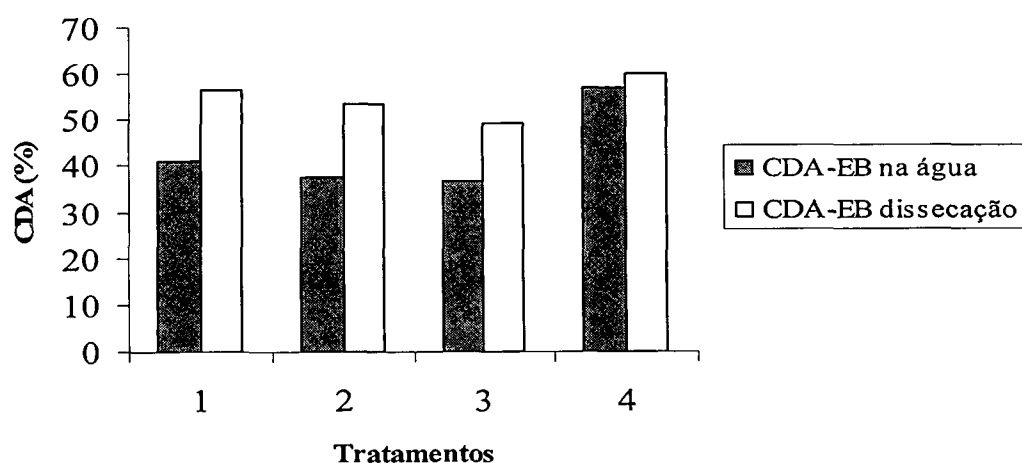


Figura 3. Coeficiente de digestibilidade Aparente (CDA EB) estimada a partir de fezes de pirarucu *Arapaima gigas* coletadas na água e por dissecação.

4. Discussão

4.1. Avaliação da digestibilidade

Mensurar digestibilidade aparente pelo método indireto através da utilização de um marcador inerte (Cr_2O_3), requer apenas uma coleta parcial das fezes, dispensando o inconveniente e complexo trabalho de uma coleta total de fezes, necessário numa avaliação pelo método direto (Cho, 1985).

Shipton & Britz (2001) concluíram que o óxido de cromo (Cr_2O_3) apresenta-se como um eficiente marcador inerte, se acrescentado a uma taxa de 0,5%, pois não interfere no processo de digestão, não é absorvido pelo animal e move-se no intestino numa taxa similar aos outros nutrientes.

Ensaio de digestibilidade em peixes trazem consigo a dificuldade operacional de separar as fezes da água. Diversos autores testaram estratégias para contornar este

problema. Uma câmara de metabolismo criada por Smith (1971) mantinha o animal confinado em um cilindro que possibilitava uma coleta de urina, fezes e excreção branquial separadamente. Contudo tal estratégia promove uma alta carga de estresse que poderia levar à obtenção de erros nos resultados.

Outras técnicas foram desenvolvidas para coleta de fezes na água buscando a minimização dos efeitos da lixiviação de nutrientes nas fezes Cho (1985) desenvolveu uma metodologia de coleta através de uma coluna de dissecação (Sistema Ghelph). Choubert *et al* (1982) testaram um método automático de coleta de fezes por filtragem. Spyridarkis *et al* (1989) descreveram métodos de coleta de fezes usando diversas estratégias: retirada das fezes imediatamente da água através de pipetagem, extrusão manual através de pressão abdominal, dissecação do trato digestório, filtração, decantação e sucção de fezes pelo ânus.

Os métodos utilizados no presente estudo apresentaram prováveis desvantagens, tais como: contaminação das amostras com componente endógeno ainda não reabsorvido e sacrifício do animal (dissecação) e os efeitos da lixiviação na coleta de fezes na água.

Cho (1985) numa análise comparativa de métodos de obtenção de coeficientes de digestibilidade total, de proteínas e de gorduras obtidos por meio de dissecação intestinal, sucção anal e coleta na água através de uma coluna para sedimentação (Sistema Guelph), concluiu que a lixiviação não se apresentou como uma significativa fonte de erro desde que a quebra dos "pellets" fecais durante a coleta fosse mínima.

Neste trabalho, CDA total e CDA EB mostraram que os resultados em ambos os métodos de coleta de fezes foram semelhantes. Isto significa que o efeito da lixiviação (coleta na água) e a fração endógena das fezes (dissecação) não comprometeram a confiabilidade dos resultados obtidos independentemente do método utilizado.

McGoogan & Reigh (1993) compararam a digestibilidade da matéria seca e energia de diferentes ingredientes na alimentação do peixe carnívoro *Sciaenops ocellatus* e encontraram digestibilidades superiores em alimentos de origem animal quando comparados a alimentos de origem vegetal. No mesmo estudo os autores concluíram que esta espécie utiliza maior quantidade de energia contida nos lipídeos e proteínas se comparado com os carboidratos.

Os resultados obtidos aqui se assemelham aos encontrados por McCoogan & Reigh (1993), em que as rações dos tratamentos possuem coeficientes de digestibilidade inferiores a 60%, corroborando a afirmação de que os carboidratos são as frações responsáveis pela baixa digestibilidade total e de EB das rações.

A reduzida influência do método de coleta nos resultados de digestibilidade deste trabalho corroboraram aos encontrados num estudo da digestibilidade aparente de fezes coletadas na água e por dissecação realizado por Silva (1997) e estão de acordo com as conclusões do estudo realizado por Cho (1985).

4.2. Efeito da gelatinização do amido através do cozimento da farinha de trigo associado à suplementação com amilase exógena.

A farinha de trigo apresenta-se como a fonte de amido com melhor digestibilidade, quando comparada ao amido de milho e a fécula de batata (Stone *et al*, 2003a). Isto se deve principalmente ao menor tamanho dos grãos de amido de cereais quando comparado a raízes tuberosas, proporcionando uma maior superfície de contato facilitando o ataque enzimático (Gallego *et al*. 1994).

Hidalgo *et al* (1993), num estudo com enguia européia *Anguilla anguilla*, obteve melhor desempenho e otimizou a utilização de proteína ao aumentar o nível de carboidrato

na dieta. Entretanto, Arnensen e Krogdahl (1993) num estudo com salmão do Atlântico *Salmo salar*, outra espécie carnívora, encontraram menores coeficientes de digestibilidade ao aumentarem o nível de inclusão de farinha de trigo na ração. Resultados semelhantes a estes também foram obtidos no estudo de outras espécies, como bacalhau *Godus morhua* (Hemre *et al.*1989) e bagre do canal *Ictalurus punctatus* (Lovell, 1989a). Esta redução da digestibilidade provavelmente foi influenciada pela saturação da capacidade das carboidrases de degradar amido.

Para estes mesmos autores, um efeito positivo na digestibilidade foi obtido quando usaram amido gelatinizado, pois neste estado o amido possui melhor solubilização em água (Peres & Oliva-Teles, 2002).

Segundo Stone *et al* (2003b) a digestibilidade inferior do amido cru, quando comparada ao amido gelatinizado, deve-se à reduzida solubilidade e conseqüentemente o impedimento da ação da enzima alfa-amilase.

As rações utilizadas eram ricas em carboidratos devido à utilização de ingredientes vegetais como fonte de energia (farinha de trigo e fubá de milho) e de proteína (protenose e farelo de soja). Estes carboidratos insolúveis levaram aos valores relativamente baixos de CDA total e EB se comparados aos valores de digestibilidade de outros trabalhos que utilizaram fonte protéica animal em maior quantidade, ração extrusada ou cozimento dos ingredientes em maior proporção que os utilizados neste trabalho.

Todavia, o cozimento da farinha de trigo alterou positivamente a digestibilidade total e de EB. Este resultado corrobora com os obtidos para truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Pfeffer, 1991; Lovell, 1989a; Lovell, 1989b) e perca prateada *Bidyanus bidyanus* (Stone, 2003a) em que os processos de melhoria da solubilidade do amido dos ingredientes

da ração, gelatinizando-o através do cozimento ou extrusão, resultaram em melhor aproveitamento desta fonte de carboidratos.

Em estudos realizados com juvenis de pirarucu, Caveró (2004) concluiu que esta espécie possui uma atividade endógena de amilase reduzida e a suplementação de amilase exógena não resulta em melhorias no desempenho zootécnico destes animais.

Entretanto, a utilização de suplementação enzimática tem se mostrado efetiva em diversas atividades da produção animal. Classen (1996) afirmou que a suplementação com amilase exógena é efetiva sob condições específicas relacionadas à origem do amido fornecido, apontando o trigo como uma fonte de amido que apresenta melhor resposta à suplementação enzimática. Yin *et al* (2001) encontraram melhores valores de digestibilidade total e energia bruta, em dietas fornecidas a suínos, com a inclusão de um coquetel de enzimas, entre elas a amilase.

No presente estudo, o efeito da adição de amilase e do cozimento da farinha de trigo nas rações experimentais, apontou para uma otimização da utilização do carboidrato gelatinizado pela suplementação com amilase exógena. Ou seja, o efeito da gelatinização na digestibilidade foi maximizado pela adição de amilase exógena, pois a baixa atividade endógena desta enzima digestiva no trato digestório do pirarucu compromete a degradabilidade do amido quando a suplementação de enzima exógena não é feita.

Apesar da digestibilidade do amido ser vinculado à sua solubilidade e à atividade amilohidrolítica no trato digestório (Corrêa *et al.*, 1998), o aumento da quantidade deste composto na dieta pode interferir nos resultados de desempenho dos peixes, por duas razões principais: redução de consumo (Peres & Oliva-Teles, 2002) e capacidade reduzida de metabolização de monossacarídeos circulantes no plasma (Walton & Cowey, 1982). Isto

leva a crer que uma maior digestibilidade de carboidratos pode aumentar a digestibilidade da dieta sem, necessariamente, melhorar o desempenho zootécnico dos animais.

Contudo, se fazem necessários mais estudos de consumo e desempenho relacionados à inclusão de amido na dieta de pirarucu, já que a gelatinização do amido por meio do cozimento, aliado à inclusão de amilase, otimizou a digestão do amido incorporado à dieta.

4.3. Atividade de amilase no conteúdo intestinal.

Hidalgo *et al* (1999) citaram a existência de dois grupos definidos de peixes relacionados à atividade de amilase: carnívoros com baixa ou nenhuma atividade desta enzima e peixes onívoros como atividade amilohidrolítica relativamente mais alta.

Sabapathy & Teo (1992), ao estudarem a espécie de peixe carnívora *Lates calcarife*, encontraram uma baixa atividade de amilase para a espécie. A presença desta enzima no trato digestório desta espécie provavelmente está relacionada à necessidade da digestão do glicogênio encontrado nos tecidos musculares de suas presas.

Cavero (2004) ao analisar a atividade de enzimas digestivas endógenas de pirarucu não encontrou atividade significativa de amilase no tecido do trato digestivo desta espécie.

Encontrar atividade de amilase no conteúdo intestinal significaria que a amilase exógena suplementada às rações chegara ao intestino ainda em condições de catalisar a degradação do amido. Contudo, os valores em mg glicose/ mg proteína obtidos através do método aplicado foram relativamente altos, não indicaram maior atividade de amilase nos tratamentos suplementados (T2 e T4). Este resultado se deve à fração indesejável de glicose já existente na ração fornecida. Portanto, este parâmetro não responde satisfatoriamente se a amilase exógena utilizada possui atividade no intestino do pirarucu.

5. Conclusões

O efeito da lixiviação de nutrientes ao se coletar fezes na água e da fração de material endógeno na coleta por dissecação, não foram fontes significativas de erro, a ponto de encaminhar a conclusões discrepantes.

As rações fornecidas apresentaram digestibilidade reduzida se comparadas às rações em que a principal fonte protéica é de origem animal. O pirarucu possui reduzida capacidade para aproveitar a fração de carboidratos dos ingredientes utilizados.

A solubilização do amido da farinha de trigo cozida melhorou a digestibilidade da ração. Este efeito foi maximizado com acréscimo de amilase exógena.

O método utilizado para avaliação da atividade de amilase (endógena e exógena) não apresentou dados conclusivos quanto à atividade desta enzima no conteúdo intestinal do pirarucu.

Referências Bibliográficas

- Álvarez, M.J. 1999. The partial substitution of digestible protein with gelatinized starch as an energy source reduces susceptibility to lipid oxidation in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and Sea Bass *Dicentrarchus labrax* muscle. *Journal of Animal Science*, (77) 3322-3329.
- A.O.A.C.1995. Association of official analytical chemists. *Official methods of analysis*. 12th Edition. George Banta Co. Inc. Manasha, Winsconsin, USA. 937p.
- Arnensen P. & Krogdahl, A. 1993. Crude and pre-extrude products of wheat as nutrient sources in extruded diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) grown in sea water. *Aquaculture*, 118. 105-117p.
- Baldisserotto, B. 2002. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Editora UFMS. 92p.
- Bedford, M.R. 2000. Exogenous enzymes in monogastric nutrition - their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology*, (86) 1-2:1-13.
- Bernfeld, P. 1955. Amylase a and b: calorimetric assay methods. In: *Methods in enzymology*. Ed. Colowich, S.P. & Kaplan. Vol. 1 New York. Academic Press Inc.
- Carvalho, L.O.D.M. & Nascimento, C.N.B. *Engorda de pirarucus (Arapaima gigas) em associação com búfalos e suínos*. Embrapa – CPATU, 1992. 21p. (Circular técnica 65)
- Cavero, B.A.S. 2004. Uso de enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier, 1982). *Tese de doutorado* – INPA/ UFAM – Manaus-AM. 75p.
- Chakrabarti, I; Gani, M.A.; Chaki, K.K.; Sur, R.; Misra, K.K. 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation.

Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, (112) 167-177.

Cho, C.Y., 1985. Measurement of feed ingredient digestibility in: *Finfish nutrition in asia: Metodological approaches to research and development*. Ottawa, Canada. 154p.

Choubert, G.; De La Noüe, J.; Luquet, P. 1982. Digestibility in fish: improved device for the automatic collection of feces. *Aquaculture* (29): 185-189p.

Chow, K.W. & Halver, J.E. 1980. Chapter 5:Carbohydrates. *Fish feed formulation and production* - FAO. p.United Nations Development Programme Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO.Rome, 1980. Acessado em 22/01/2003. Endereço eletrônico: <<http://www.fao.gov/decrep>>.

Classen, H.L. 1996. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. *Animal feed science technology*, (62). 21-27.

Corrêa, C.F., Bidinotto, P.M.; Moraes, G. 1998. Comparison of the amilohydrolytic activity in the gut of the neotropical teleost species pacu *Piaractus mesopotamicus* and tambacu hybrid *Colossoma macropomum* tambaqui x *P. mesopotamicus* pacu, submitted to different contents of soluble carbohydrate. *Proceedings of fish feeding ecology and digestion.*, (Gut shop'98.) 87-97.

Fernández, F.; Miquel A.G.; Guinea, J.; Martinez, R. 1998. Digestion and digestibility in gilthead sea bream *Sparus aurata*: the effect of diet composition and ration size: *Aquaculture*, (166) 67-84.

Fischer, G.; Maier, J.C.; Rutz, F.; Bermudez, V.L. Desempenho de frangos de corte alimentados com dieta à base de milho e farelo de soja, com ou sem adição de enzimas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, (31) 402-410.

- Fontenele, O. Contribuição ao conhecimento do pirarucu *Arapaima gigas* em cativeiro (Actinopterygii, Osteoglossidae). Fortaleza: Departamento Nacional de Obras contra as secas, 1955.(Publicação 166) 235- 250.
- Furukawa, A.; Tsukahara, H. 1966. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index in the study of digestibility of fish feed. Bulletin of the *Japanese Society Science Fisheries*, (32) 502-506.
- Gallego, M.G.; Bazoco, J.; Akharbach, H; Suárez, M.D.; Sáenz, A. 1994. Utilization of different carbohydrates by the european eel (*Anguilla anguilla*).*Aquaculture*, (124) 99-128.
- Hemre, G.I.; Lied, L.L.; Lambertsen G.1989. Starch as energy source in feed for cod (*Gadus morhua*): digestibility and retention. *Aquaculture*, (80) 261-270.
- Hidalgo, M.C., Urea, E; Sanz, A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*. (170) 267-283.
- Hidalgo, M.C.; Sanz A.; Gallego, G.M; Suarez, M.D. Higuera, M. 1993. Feeding of the European eel *Anguilla anguilla*. 1. Influence of dietary carbohydrate level. *Comparative Biochemistry and Physiology*, (105A) 165-169.
- Imbiriba, E.P. 2001. Potencial da criação de pirarucu *Arapaima gigas* em cativeiro. *Acta Amazonica*, (31) 2:299-316.
- Ituassú, D.R. 2001. Exigência protéica de juvenis de Pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829). *Dissertação de mestrado* – INPA/UA. Manaus – AM. 28 p.
- Kubitza, F.1998. *Nutrição e alimentação dos peixes Cultivados*. Campo Grande. MS.44p.

- Li, G.Q. & Wilson, M.V.H. 1996. Phylogeny of Osteoglossomorpha. In: Stianassy, M.L.J.; Parenti, L.R.; Johnson, G.D. (Eds) *Interrelationships of fishes*. Academic Press, London UK. 163-174.
- Lovell, T. 1989 a. *Nutrition and feeding of fish*. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. 260 p.
- Lovell, T. 1989 b. Reevaluation of carbohydrates in fish feeds. *Aquaculture Magazine* (15), 62-64.
- McGoogan, B.B. & Reigh, C.R. 1996. Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Aquaculture*, (141) 233-244.
- Nelson, J.S. 1994. *Fishes of the world*. J. Wiley, New York. 600p.
- Nery, V.L.H.; Lima, J.A.F.; Melo, R.C.A., Fialho, E.T. 2000. Adição de enzimas exógenas para leitões dos 10 aos 30 Kg de peso. *Revista Brasileira de Zootecnia*, (29) 3:794-802.
- Ng, W.K.; Lim H.A.; Lim S.L.; Ibrahim, C.O. 2002. Nutritive value of palme kernel meal pretreated with enzyme or fermented with *Trichoderma koningii* as an dietary ingredient for red hybrid tilapia *Oreochromis* sp. *Aquaculture Research*, (33) 1199-1207.
- N. R. C. 1993. Nutrient Requirement of fish / Committee on animal nutrition, Board on agriculture. *National Research Council*. 115p.
- Peres, H. & Óliva-Teles, A. 2002. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles. *Aquaculture*, (205) 287-299.
- Pfeffer E.; Beckmann-Toussaint, J. Henrichfreise, B.; Jansen, H.D. 1991. Effect of extrusion on efficiency of utilization of maize starch by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, (96). 293-303.
- Podoskina, T.A., et al. 1997. Efficiency of utilization of some potato starch modifications by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, (152) 235-248.

- Sapabathy, U. & Teo, L.H. 1992. A kinetic study of the α -amylase from the digestive gland of *perna viridis* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, (101B) 73-77.
- Shiau, S.Y. & Lan, C.W. 1996. Optimum dietary protein level and protein to energy ratio for growth in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, (145) 256-266.
- Shiau, S.Y. 1997. Utilization of carbohydrates in warmwater fish - with particular refence to tilapia, *Oreochromis niloticus x O. aureus*. *Aquaculture*, (151) 79-96.
- Shipton, T.A. & Britz, P.J. 2001. An assessment of the use of chromic oxide as a marker in protein digestibility studies with *Haliots midae* L. *Aquaculture*, (203) 69-83.
- Silva, J.M. 1997. Nutrientes, energia e digestibilidade aparente de frutos e sementes consumidos pelo tambaqui (*Colossoma macropomum*) nas florestas inundáveis da Amazônia central. *Tese de doutorado* – INPA/UA. Manaus – AM. 142p.
- Singh, N.; Singh J.; Kaur, L.; Sodhi, N.S.; Gill, B.S. 2003. Morphological, thermal and rheological properties of starch from different botanical sources. *Food Chemistry* (81). 219-231.
- Smith, L.S. 1980. *Digestion in teleost fishes*. Fish Feed technology. p.United Nations Development Programme Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO.Rome, 1980. Acesso em <<http://www.fao.gov/decrep>>.
- Smith, R. R. 1971. A method for measuring digestibility and metabolizable energy of fish feeds. *The Propg. Fish-culturist*, 33 (3): 132-134.
- Spannhof, L. & Plantikow, H. 1982. Studies on Carbohydrate digestion in rainbow trout. *Aquaculture*, (30) 95 - 108.
- Spyridarkis, P.; Metailler, R; Gabaudam, J.; Riaza, A.1989. Studies on nutrient digestibility in European se bass (*Discentrarchus labrax*) 1. Methodological aspects concerning feces collection. *Aquaculture*, (77) 61-70p.