

RAFAEL TSUYOSHI INOE COELHO

Desenvolvendo a aquicultura de espécies de peixes e camarões marinhos no Brasil: alguns aspectos práticos e mais urgentes da alimentação e nutrição durante a engorda do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) e da garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*)

São Paulo
2021

RAFAEL TSUYOSHI INOE COELHO

Desenvolvendo a aquicultura de espécies de peixes e camarões marinhos no Brasil: alguns aspectos práticos e mais urgentes da alimentação e nutrição durante a engorda do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) e da garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*)

Tese apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Eduardo Lavanholi de Lemos

São Paulo
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Coelho, Rafael Tsuyoshi Inoe, Desenvolvendo a aquicultura de espécies de peixes e camarões marinhos no Brasil: alguns aspectos práticos e mais urgentes da alimentação e nutrição durante a engorda do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) e da garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*) / Rafael Tsuyoshi Inoe Coelho; Orientador Daniel Eduardo Lavanholi de Lemos – São Paulo, 2021.

154 f.

Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação do Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

1. Camarão – 2. Fosfatos -3. Enzimas. - 4. Fitase. – 5. Garoupa -6. Taurina – 7. Aminoácidos

COELHO, Rafael Tsuyoshi Inoe. **Desenvolvendo a aquicultura de espécies de peixes e camarões marinhos no Brasil:** alguns aspectos práticos e mais urgentes da alimentação e nutrição durante a engorda do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) e da garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*). Tese (Doutorado) apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Aprovado em: ___/___/_____

Versão Corrigida

Banca Examinadora

Prof. Dr. Daniel Eduardo Lavanholi de Lemos Instituição: Instituto Oceanográfico

Presidente

Assinatura _____

Prof. Dr. Vicente Gomes Instituição Instituto Oceanográfico

Conceito _____ Assinatura _____

Prof. Dr. Renata Guimarães Moreira Whitton Instituição Instituto de Biologia

Conceito _____ Assinatura _____

Prof. Dr. Fanny Ayumi Yasumaru Instituição Temasek Polytechnic

Conceito _____ Assinatura _____

AGRADECIMENTOS

Esta tese é o resultado de muito trabalho e dedicação, principalmente no contexto atualmente vivido por todos nós, e não seria possível sem o apoio de muitos.

Agradeço à minha família por todo o suporte, fundamental para a realização deste e muitos outros desafios. Em especial aos meus pais, Orpheu e Edna, e irmãos, Leandro e Bruno. À minha esposa Sandra que sempre me incentivou, e compreendeu os percalços dos trabalhos experimentais. Ao pequeno Davi, filho amado, que me motiva a seguir cada vez mais adiante.

Agradecimento especial ao Prof. Daniel Eduardo Lavanholi de Lemos por confiar e contribuir para o meu empenho, sempre me incentivando a produzir e gerando condições para que este trabalho acontecesse.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos e auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.

À equipe do Laboratório de Aquicultura (LAM), em especial ao Ricardo Ota e à Fanny Yasumaru, mentores que estiveram e estão sempre disponíveis a ajudar, resolver problemas e criar soluções.

Ao Prof. Vicente Gomes e à Zezé por todo o suporte e auxílio desde a graduação.

Ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, Base Clarimundo de Jesus, Ubatuba -SP, por colocar à disposição a infraestrutura necessária à realização de todos os experimentos e análises laboratoriais.

À equipe de vigilância da base, que me “incomodava” nas horas mais inoportunas, e que permitiu que nenhum experimento fosse prejudicado por falta de luz ou outras intercorrências.

À DSM pelo fornecimento de enzimas, e auxílio nas análises, em especial ao Eduardo Yamashita.

À Guabi pelo fornecimento de ingredientes e rações, em especial ao João Manoel Cordeiro.

À Polinutri pelo fornecimento de ingredientes e rações, em especial ao André Viana.

À RedeMar alevinos por acompanhamento em visita técnica ao laboratório de reprodução, e ensino sobre o manejo da garoupa, em especial à Cláudia Kerber e Pedro Antônio.

RESUMO

COELHO, Rafael Tsuyoshi Inoe. **Desenvolvendo a aquicultura de espécies de peixes e camarões marinhos no Brasil:** alguns aspectos práticos e mais urgentes da alimentação e nutrição durante a engorda do camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*) e da garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*). 2021. 154f. Tese (Doutorado) Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Os objetivos desta tese foram a avaliação de aspectos de alimentação, manejo de cultivo e nutrição de peixes e camarões marinhos tropicais cultivados no Brasil, em temas relevantes à aplicação na aquicultura nacional. Foram conduzidos três experimentos de alimentação com juvenis do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei*: (1) experimento realizado com dietas pobres em fósforo suplementadas com três diferentes formas de fosfatos inorgânicos, o bicálcico (DCP), monocálcico (MCP) e o monoamônico (MAP), o resultado em todos os parâmetros testados foram superiores para os tratamentos MCP e MAP, com melhor desempenho, digestibilidade e retenção de nutrientes quando comparado a um controle negativo ou ao tratamento DCP. A adição DCP não produziu efeitos positivos no desempenho e disponibilidade do fósforo quando comparado ao controle pobre em fósforo. Os dois experimentos seguintes (2), (3) com o *L. vannamei* abordaram a suplementação de enzimas exógenas em dietas com restrição de fósforo, resultados obtidos em ambos os experimentos demonstraram um efeito positivo da adição de fitase à ração, com melhora em desempenho, digestibilidade e retenção de nutrientes em relação ao controle sem suplementação, embora não tenham atingido o mesmo desempenho dos tratamentos com fosfatos inorgânicos (MCP). Foi testada ainda a adição da enzima protease às dietas, porém não foram observados ganhos significativos ao utilizar essa enzima para juvenis de *L. vannamei*. Além disso, foram conduzidos dois experimentos com juvenis de garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* em sistemas de recirculação de água salgada: (1) experimento realizado para verificar a influência de diferentes manejos, sendo testados três diferentes frequências alimentares (1x ao dia, 2x ao dia e alimentação contínua) e duas densidades de estocagem (40 e 95 peixes/m³). A frequência alimentar não produziu efeito significativo sobre o desempenho, enquanto a densidade de estocagem mais elevada foi responsável por ganhos no crescimento, produtividade, aproveitamento de ração, entre outros. No experimento seguinte (2) foram testadas quatro dietas práticas na alimentação da garoupa (dieta seca com sem adição de taurina, preparado semiúmido e peixe fresco), com resultados superiores no uso de dietas secas suplementadas de taurina em detrimento ao uso de peixe fresco. A partir dos resultados obtidos a taurina foi considerada um aminoácido condicionalmente essencial para juvenis da espécie, e indica-se a suplementação desse aditivo para satisfazer níveis próximos de 1,0% de taurina nas dietas. Foram estimados ainda as exigências de aminoácidos essenciais para juvenis de *E. marginatus* a partir do método da composição corporal da carcaça, os quais foram considerados razoáveis quando contrapostos à literatura existente para espécies próximas, e podem ser recomendados como ponto de partida para formulações de rações para a espécie.

Palavras-chave: Camarão. Fosfatos. Enzimas. Fitase. Garoupa. Taurina. Aminoácidos.

ABSTRACT

COELHO, Rafael Tsuyoshi Inoe. **Developing aquaculture of fish and marine shrimp species in Brazil:** some practical and more urgent aspects of feeding and nutrition during grow-out of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and dusky grouper (*Epinephelus marginatus*). 2021. 154 f. Tese (Doutorado) Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The objectives of this thesis were to evaluate aspects of feeding, management and nutrition of tropical marine fish and shrimp farmed in Brazil on topics relevant to the application to national aquaculture. Three feeding trials were conducted with juveniles of white shrimp *Litopenaeus vannamei*: (1) experiment carried out with low phosphorus diets supplemented with three different forms of inorganic phosphates, dicalcium (DCP), monocalcium (MCP) and monoammonium (MAP), the results in all tested parameters were superior for the MCP and MAP treatments, with better performance, nutrient digestibility and retention when compared to a negative control or to the DCP treatment. The DCP addition did not produce positive effects on phosphorus and growth performance when compared to the low phosphorus control. The following two experiments (2), (3) with *L. vannamei* addressed the supplementation of exogenous enzymes in low phosphorus diets, the results showed a positive effect of the addition of phytase to the diet, with improvement in performance, digestibility and retention of nutrients compared to control without supplementation, although they did not achieve the same performance as treatments with inorganic phosphates (MCP). The addition of protease into the diets was also tested, but no significant gains were observed when using this enzyme for juvenile *L. vannamei*. Furthermore, two experiments were conducted with juvenile dusky grouper *Epinephelus marginatus* in indoor water-recirculated tanks: (1) experiment carried out to verify the influence of different managements, testing three different feeding frequencies (once daily, twice daily and continuous feeding) and two stocking densities (40 and 95 fish/m³), feeding frequency did not have a significant effect on performance, while the higher stocking density was responsible for gains in growth, productivity, feed use, among others. In the other experiment (2), practical diets were tested for feeding grouper, with superior results in the use of in-house prepared diets supplemented with taurine in detriment to the use of fresh fish. Taurine was considered a conditionally essential amino acid for juveniles of the species, and this additive should be supplemented to satisfy the minimum level of 1.0% of taurine in the diets. The essential amino acid requirements for juveniles of *E. marginatus* were also estimated from the method of whole-body composition, which were considered very reasonable when compared to the existing literature for closely related species, and can be recommended as a guide for feed formulations for dusky grouper.

Keywords: Shrimp. Phosphates. Enzymes. Phytase. Grouper. Taurine. Amino acids.

LISTA DE FIGURAS

Introdução geral

- Figura 01 - Evolução da produção mundial de pescados* por meio da captura pela pesca e cultivo pela aquicultura, de 1950 a 2018 (FAO, 2020)15

Capítulo 1

- Figura 1.1 - Declínio, evolução e projeção da produção de camarão marinho cultivado no Brasil: panorama de 2003 a 2022 (ROCHA, 2020)23
- Figura 1.2 - Sistema de cultivo em meio heterotrófico (bioflocos) para manutenção e crescimento dos camarões até atingir tamanho experimental (>3,0 g).....28
- Figura 1.3 - Sistema experimental de cultivo recirculante de água marinha, adaptado para experimentos de desempenho e digestibilidade.....29
- Figura 1.4 - Vista inferior dos tanques de cultivo de camarões marinhos, com tubos do sistema de decantação utilizados nos experimentos de digestibilidade nas laterais da imagem.....30
- Figura 1.5 - Amostra de dieta experimental fabricadas no Laboratório de Aquicultura (LAM) do Instituto Oceanográfico da USP, com tamanho de pélete de 2,0 a 4,0 mm, e diâmetro de 2,0 mm.....33
- Figura 1.6 - Aparato de equipamentos e processo de análise de amostras: pesagem das amostras de ração e estabilização de temperatura do equipamento (A), imersão das amostras em água salgada em banho-maria com agitação, simulando condições de cultivo (B), amostra após 30 minutos imersa em água, pré-filtragem (C), amostras de ração após filtragens prontas para serem secas em estufa e analisados os teores de nutrientes após processo de lixiviação (D).....44
- Figura 1.7 - Gráfico comparativo de perda de matéria seca e fósforo nas dietas experimentais submetidos a 30 minutos de processo de lixiviação; valores de solubilidade dos fosfatos inorgânicos, e digestibilidade encontrada de acordo com a fonte inorgânica do fósforo.....50

Capítulo 2

- Figura 2.1 - Soltura de alevinos de garoupa (peso médio 2,0 g) em tanque berçário (A); transfish utilizado no traslado de Ilhabela-Ubatuba, com suporte de oxigenação constante (B).....99
- Figura 2.2 - Sistema de berçário para garoupa-verdadeira, em tanque circular e volume útil de 9000 L, sistema em fluxo aberto, com troca de água de 100% ao dia.....100
- Figura 2.3 - Sistema recirculante de água marinha, adaptado para experimentos de desempenho para peixes marinhos: sistema composto por 32 tanques réplicas (A), com volume útil de 400L (B).....101
- Figura 2.4 - Processo de preparação das dietas secas: ingredientes previamente homogeneizados em batedeira industrial (A); peletizados a frio em péletes de 10 mm de diâmetro (B); seguido por processo de secagem em câmara adaptada durante 18h.....107
- Figura 2.5 - Variação de temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido medidos durante 60 dias de período experimental com juvenis de garoupa-verdadeira em sistema recirculante de água salgada.....113
- Figura 2.6 - Variação de temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido medidos diariamente, durante 100 dias de período experimental com juvenis de garoupa-verdadeira em sistema recirculante de água salgada.....117
- Figura 2.7 - Consumo individual de alimento de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, alimentado com as dietas AquaMar (A), AquaMar-T (B), semiúmido (C) e peixe fresco (D), durante 100 dias em sistema de recirculação de água salgada.....118
- Figura 2.8 - Eficiência de retenção corporal para matéria seca, proteína bruta e gordura bruta em juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, alimentados com 4 dietas experimentais, durante o período de 100 dias. Dados são apresentados em média e barras de desvio padrão (n=4). Diferentes letras sobrescritas sobre o mesmo nutriente indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P<0,05$).....121
- Figura 2.9 - Eficiência de retenção de aminoácidos (%) em juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, alimentados com as dietas AquaMar

e peixe fresco, durante o período de 100 dias de experimento em sistema recirculante de água salgada.....124

Figura 2.10 - Gráfico de radar com a comparação de métodos do presente estudo e com a literatura para espécies de garoupa, para a estimativa de exigência de aminoácidos essenciais na dieta (% matéria seca). Método 1, baseado no teor corporal e nas necessidades de lisina (KAUSHIK, 1998), método 2, baseado na soma de aminoácidos corporal e na exigência de proteína bruta (TACON, 1989), *Epinephelus* spp. Baseado em Cai-Juan, Ramli e Rahman, 2016.....126

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1.1 - Composição centesimal e mineral dos ingredientes utilizados nas fabricações de dietas experimentais para o camarão branco, *Litopenaeus vannamei*.....32
- Tabela 1.2 - Formulação, composição centesimal e mineral das dietas experimentais (matéria úmida) utilizadas em teste de suplementação com diferentes formas de fosfatos inorgânicos, para verificação de desempenho e digestibilidade do camarão marinho *L. vannamei*. Dados expressos em média para composição centesimal (n=3) e teor mineral (n=2). DCP fosfato bicálcico, MCP fosfato monocálcico e MAP fosfato monoamônico.....34
- Tabela 1.3 - Formulação, composição centesimal e mineral das dietas experimentais (matéria úmida) utilizadas em teste de suplementação com protease e dois níveis diferentes de fitase, para verificação de desempenho e digestibilidade do camarão marinho *L. vannamei*. Dados expressos em média para composição centesimal (n=3) e teor mineral (n=2).....36
- Tabela 1.4 - Formulação, composição centesimal e mineral das dietas experimentais (matéria úmida) utilizadas em teste de suplementação com diferentes níveis de fitase, para verificação de desempenho e digestibilidade do camarão marinho *L. vannamei*. Dados expressos em média para composição centesimal (n=3) e teor mineral (n=2).....38
- Tabela 1.5 - Determinação de taxa de arraçoamento utilizado para camarões baseados no peso e temperatura, usado como referência nos experimentos.....39
- Tabela 1.6 - Qualidade da água monitorado durante 52 dias de experimento com juvenis de *L. vannamei* em sistema de recirculação de água salgada. Valores expressos como média (DP).....46
- Tabela 1.7 - Desempenho de juvenis de camarão (*L. vannamei*) após 52 dias de experimento. Valores expressos em média (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas (P<0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).....47
- Tabela 1.8 - Digestibilidade aparente das dietas, por fontes de fosfatos e fósforo digestível nas dietas teste. Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma coluna com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).....49

Tabela 1.9 - Composição de matéria fecal de camarões (matéria seca). Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).....	50
Tabela 1.10 - Composição corporal e do exoesqueleto de juvenis de camarões (matéria seca, exceto para umidade); ao início e após 52 dias de experimento. Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).....	51
Tabela 1.11 - Eficiência de retenção de nutrientes (%) para juvenis de camarão (<i>L. vannamei</i>). Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).....	52
Tabela 1.12 - Qualidade da água monitorado durante 50 dias de experimento com juvenis de <i>L. vannamei</i> em sistema de recirculação de água salgada. Valores expressos como média (DP).....	53
Tabela 1.13 - Desempenho de juvenis de camarão (<i>L. vannamei</i>) após 50 dias de experimento. Valores expressos em média (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).....	54
Tabela 1.14 - Digestibilidade aparente nas dietas teste. Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma coluna com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).....	55
Tabela 1.15 - Composição corporal e do exoesqueleto de juvenis de camarões (matéria seca, exceto para umidade); após 50 dias de experimento. Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).....	56
Tabela 1.16 - Eficiência de retenção de nutrientes (%) para juvenis de camarão (<i>L. vannamei</i>). Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma coluna com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).....	57

Tabela 1.17 - Qualidade da água monitorado durante 42 dias de experimento com juvenis de <i>L. vannamei</i> em sistema de recirculação de água salgada. Valores expressos como média (DP).....	57
Tabela 1.18 - Desempenho de juvenis de camarão (<i>L. vannamei</i>) após 42 dias de experimento. Valores expressos em média (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).....	59
Tabela 1.19 - Digestibilidade aparente das dietas. Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).....	60
Tabela 1.20 - Composição corporal e do exoesqueleto de juvenis de camarões (matéria seca, exceto para umidade); ao início e após 42 dias de experimento. Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).....	61
Tabela 1.21 - Eficiência de retenção de nutrientes (%) para juvenis de camarão (<i>L. vannamei</i>). Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma coluna com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).....	62

Capítulo 2

Tabela 2.1- Desenho experimental, densidade de estocagem inicial, biomassa inicial e frequência alimentar em experimento realizado com juvenis de <i>Epinephelus marginatus</i>	102
Tabela 2.2 - Composição centesimal e de aminoácidos dos principais ingredientes utilizados na fabricação de dietas experimentais para garoupa-verdadeira <i>Epinephelus marginatus</i> (% matéria úmida).....	104
Tabela 2.3 - Formulação e composição centesimal (% matéria úmida) das dietas experimentais utilizadas na alimentação de juvenis de garoupa-verdadeira. Dados de composição centesimal expressos em média (DP), n=3.....	105
Tabela 2.4 - Composição de aminoácidos (% dieta seca) das dietas experimentais para juvenis de garoupa-verdadeira, <i>Epinephelus marginatus</i>	107
Tabela 2.5 - Desempenho de crescimento e alimentar de juvenis de garoupa-verdadeira, <i>Epinephelus marginatus</i> , estocados em duas diferentes	

densidades (Alta densidade: 95 ind/m³ Baixa densidade: 40 ind/m³) e três diferentes regimes alimentares (uma vez ao dia, 1x/dia; Duas vezes ao dia, 2x/dia; contínuo, 24h) após 60 dias de período experimental, utilizando dieta seca AquaMar.....115

- Tabela 2.6 - Crescimento e desempenho alimentar de juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, alimentados com diferentes dietas; duas dietas secas (AQ e AQ-T); semiúmido e peixe fresco, após o período de 100 dias de experimento em sistema de recirculação de água salgada.....119
- Tabela 2.7 - Composição centesimal corporal (% matéria seca, exceto umidade) de juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, ao início e após 100 dias de experimento alimentados com 4 dietas teste. Composição centesimal apresentada pela média (DP), n=4.....120
- Tabela 2.8 - Composição de aminoácidos corporal (% matéria seca) de juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, ao início e após 100 dias de experimento alimentados com as dietas AQ e PF.....122
- Tabela 2.9 - Composição de aminoácidos corporal de juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, e outras espécies de peixes marinhos (expresso em % da soma dos aminoácidos).....123
- Tabela 2.10 - Estimativa de exigências de aminoácidos em dietas (% de matéria seca) para juvenis de garoupa, *Epinephelus marginatus*, e selecionado de espécies cultivadas.....125

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

GERAL.....	14
Referências.....	18

CAPÍTULO 1 –Desempenho de juvenis de camarão marinho, *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas baseadas em ingredientes vegetais pobres em fósforo: avaliação da suplementação de dietas com diferentes formas de fosfatos inorgânicos e enzimas exógenas.....20

RESUMO	21
---------------------	----

INTRODUÇÃO	22
Suplementação de dietas.....	25

OBJETIVOS DETALHADOS	26
-----------------------------------	----

MATERIAIS E MÉTODOS	27
----------------------------------	----

Animais experimentais.....	27
----------------------------	----

Sistema experimental de cultivo	28
---------------------------------------	----

Protocolo de preparação das dietas experimentais.....	30
---	----

Ingredientes.....	30
-------------------	----

Preparo das dietas.....	32
-------------------------	----

Experimento 1 – Fosfatos inorgânicos.....	34
---	----

Experimento 2 – Suplementação de enzimas exógenas.....	35
--	----

Experimento 3 – Níveis de inclusão de fitase	37
--	----

Estocagem de camarões e manejo alimentar	39
--	----

Coleta de amostras de fezes para análises de digestibilidade.....	40
---	----

Finalização dos experimentos, amostragem e cálculos de desempenho.....	40
--	----

Análises químicas.....	41
------------------------	----

Composição centesimal e mineral, retenção de nutrientes.....	43
--	----

Estabilidade do pélete na água.....	43
-------------------------------------	----

Controle de parâmetros e qualidade da água.....	44
---	----

Análises estatísticas.....	45
----------------------------	----

RESULTADOS

Experimento 1 – Fosfatos inorgânicos.....	46
---	----

Experimento 2 – Suplementação de enzimas exógenas.....	53
--	----

Experimento 3 – Níveis de inclusão de fitase.....	57
---	----

DISCUSSÃO

Experimento 1 – Fosfatos inorgânicos.....	63
---	----

Experimentos 2 e 3	68
--------------------------	----

Suplementação de fitase.....	69
------------------------------	----

Suplementação de protease.....	72
--------------------------------	----

Suplementação combinada de fitase e protease.....	73
---	----

CONCLUSÕES	74
-------------------------	----

Produção científica realizada e potencial	76
--	----

REFERÊNCIAS	77
--------------------------	----

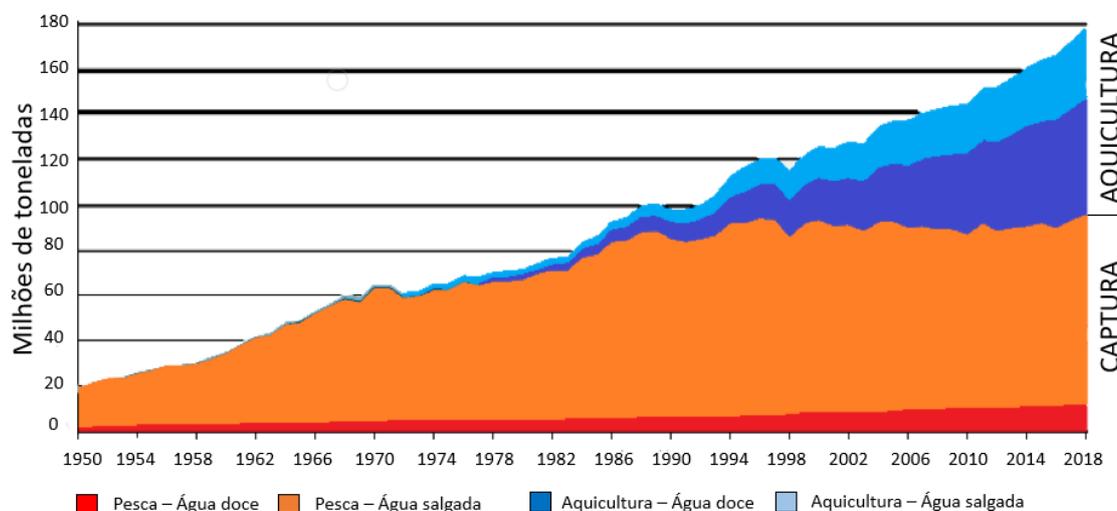
CAPÍTULO 2 - Desempenho de juvenis de garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*: Estabelecimento de protocolos de manejo alimentar e densidade de

estocagem, avaliação de dietas práticas, e estimativa de exigências de aminoácidos para a espécie.....	89
RESUMO.....	90
INTRODUÇÃO.....	91
Garoupa-verdadeira.....	93
OBJETIVOS DETALHADOS.....	96
MATERIAL E MÉTODOS.....	97
Contexto	97
Animais experimentais.....	97
Sistema experimental de cultivo.....	99
Desenho experimental: Experimento 1 -frequência alimentar e densidade de estocagem para juvenis de garoupa.....	100
Desenho experimental: Experimento 2 - dietas práticas.....	103
Preparação das dietas experimentais.....	105
Cálculos de desempenho.....	108
Composição centesimal corporal e de aminoácidos em juvenis de garoupa-verdadeira, e cálculos de retenção de nutrientes	109
Estimativa de exigência para os aminoácidos essenciais.....	109
Análises químicas.....	110
Análises estatísticos.....	111
RESULTADOS	
Experimento 1 - manejo e densidade de estocagem.....	112
Experimento 2 – dietas práticas.....	115
DISCUSSÃO.....	126
Densidade de estocagem.....	126
Frequência alimentar.....	139
Experimento 2 – Dietas práticas.....	133
Suplementação de taurina.....	134
Estimativa de aminoácidos essenciais.....	136
CONCLUSÕES.....	138
Produção científica realizada e potencial.....	140
REFÊRENCIAS.....	141

INTRODUÇÃO GERAL

Há anos a aquicultura é o setor de produção de alimentos que mais cresce no mundo e seu papel é considerado indispensável para a alimentação humana, como fonte de proteína animal de alta qualidade. Sua contribuição para a alimentação humana se igualou à produção por meio da pesca no ano de 2014 (FAO, 2016). O setor de produção de pescado (pesca mais aquicultura) vem crescendo continuamente, assim como a demanda mundial por proteína do pescado também se eleva a cada ano, seja pelo simples incremento da população mundial, seja pela exigência cada vez maior do consumidor por alimentos saudáveis (BRABO et al., 2016). A produtividade de pescado por meio da pesca extrativa está praticamente estagnada há pelo menos duas décadas (PAULY; ZELLER, 2016), em decorrência da diminuição e depleção dos estoques pesqueiros mundiais (FROESE; ZELLER; KLEISNER, 2012), devido a esses e outros fatores, o aumento na produção de pescado nas últimas décadas deve-se quase que totalmente ao também aumento da produção por meio da aquicultura (FAO, 2016). Dados da FAO (2020) indicam que o consumo do pescado mais que dobrou nos últimos 50 anos, um salto de 9,0 kg para 20,3 kg por habitante em 2017. Esse aumento é justificado por diversos fatores, podendo se destacar o aumento de renda e urbanização, canais logísticos de distribuição e técnicas de armazenamento mais eficientes, e principalmente pelo significativo aumento de produção pela aquicultura (FAO, 2020). Dados mais recentes indicam uma produção global de pescados (excluídos mamíferos aquáticos, crocodilos, jacarés, algas marinhas e plantas aquáticas) próximo a 180 milhões de toneladas, dos quais, 82 milhões de toneladas são supridos pela aquicultura, sendo essa produção anual avaliada em mais de 250 bilhões de dólares (FAO, 2020, Figura 01).

Figura 01 – Evolução da produção mundial de pescados* por meio da captura pela pesca e cultivo na aquicultura, de 1950 a 2018 (FAO, 2020).



Fonte: Adaptado de FAO (2020). *Dados não incluem mamíferos aquático, crocodilos, jacarés, plantas aquáticas e algas marinhas.

No Brasil, o panorama se repete, com a aquicultura crescendo de forma contínua nos últimos anos, os indicadores apontam para um grande salto na produção nos próximos anos. A FAO (2016) considera o Brasil como o país de maior potencial de crescimento na atividade para os próximos anos, muito disso devido às suas condições singulares, com grandes áreas propícias ao cultivo, tanto em ambientes continentais, tanques, lagos, reservatórios e rios, como em ambientes de transição e marinhos como estuários, baías, ilhas e regiões de mar aberto. Além disso, o país possui também condições climáticas adequadas a criações de uma grande gama de espécies com potencial para o cultivo, um grande setor agropecuário produtor de grãos e insumos necessários às rações, assim como também possui um grande leque de espécies marinhas e de água doce aptas a serem utilizadas na aquicultura (BRASIL, 2014).

Os primórdios da aquicultura no Brasil datam do século 17, mas sua profissionalização tardou a acontecer, apenas na década de 1970. Isso denota a jovialidade da aquicultura comercial no país, com cerca de meio século de existência, mas, de grandes avanços nesse período (VALENTI et al., 2021). Apesar disso, o consumo per capita brasileiro é ainda muito inferior à média mundial, sendo próximo a 10 kg/ano, metade do consumo per capita global (PEIXE BR, 2020). Uma avaliação recente do cenário brasileiro mostrou que a produção de pesca em 2009 era de aproximadamente

800 mil toneladas anuais, enquanto a produção de aquicultura de 400 mil toneladas, em 2018, menos de 10 anos depois, a produção de aquicultura dobrou, e atingiu valores próximos a 800 mil toneladas anuais, atingindo a mesma produção da pesca, que se manteve no mesmo valor, com uma produção total de pescado nacional próximo a 1,6 milhões de toneladas anuais (SEAFOOD BRASIL, 2019)

No Brasil a produção comercial é dominada por espécies de água doce como a tilápia e os chamados peixes redondos, tambaqui, pacu e seus híbridos (VALENTI et al., 2021). Na produção marinha, atualmente se destacam principalmente o camarão *Litopenaeus vannamei*, e o cultivo de moluscos bivalves (mexilhões, ostras), sendo o cultivo de peixes marinhos uma grande aposta para o futuro, e a garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus* uma candidata de forte potencial (CAVALLI; HAMILTON, 2007; SANCHES; OLIVEIRA; SERRALHEIRO, 2009; VALENTI et al., 2021). Para que as expectativas se concretizem, e o potencial brasileiro para aquicultura seja finalmente alcançado, é necessário cada vez mais estudos na área, que hoje se concentram principalmente em espécies de água doce, e nos camarões marinhos, enquanto a produção e a pesquisa de espécies de peixes marinhos são limitadas a poucos criadores e centros de pesquisas no Brasil, o que está aquém de todo o potencial a ser explorado nessa área.

Em meio ao crescimento da aquicultura, o cultivo de espécies de alto valor agregado como camarões e peixes marinhos, é ainda hoje altamente dependente da captura por pesca, que fornece o abastecimento de sua principal e mais importante fonte de proteínas e gordura nas rações, a farinha e o óleo de peixe. É crucial que as iniciativas de pesquisa busquem encontrar soluções para substituição desses ingredientes (TACON; HASAN; METIAN, 2011), que, além de consideradas pouco sustentáveis, o seu uso gera competição com a alimentação humana por essa fonte de proteína (TACON; METIAN, 2009). Visando a sustentabilidade do setor e o aumento do desempenho dos animais, o uso de ingredientes alternativos deve ser estudado e maximizado (TACON; HASAN; METIAN, 2011). Entretanto, a adição de ingredientes alternativos, em especial os de origem vegetal, nem sempre são totalmente aceitos ou completos nutricionalmente para as espécies cultivadas, e uma solução a esses problemas tem sido a utilização de suplementações, que podem ter natureza mineral, enzimática, de

aminoácidos, vitaminas, entre outros, visando a manutenção do desempenho dos animais. Além disso, é fundamental para o desenvolvimento da aquicultura o conhecimento do correto manejo e também das necessidades nutricionais de cada espécie cultivada, uma vez que a maior parte dos gastos do setor envolvem custos com a alimentação dos animais (LOVELL, 1998; TACON et al., 2002), sendo de extrema importância a correta aplicação do conhecimento para maximizar o desempenho e os lucros com a atividade.

Portanto, os objetivos principais desta tese foram avaliar a alimentação, nutrição e manejo de peixes e camarões marinhos, visando sobretudo a sua aplicabilidade na aquicultura de espécies de interesse comercial do país. Mais especificamente, no **Capítulo 1**, é abordado a suplementação de aditivos em dietas pobres em fósforo disponível, livres de farinha de peixe, e baseadas em ingredientes vegetais, para alimentação de juvenis do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. Para isto, foram utilizados como suplementos, aditivos de origem mineral na forma de fosfatos inorgânicos, e de origem enzimáticas, a fitase e protease. A eficiência dessas suplementações foi atestada pelo desempenho, digestibilidade, composição corporal, retenção de nutrientes entre outros parâmetros sobre o desenvolvimento do camarão. No **Capítulo 2** foram desenvolvidos experimentos para avaliação da aceitação de juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, em sistema recirculante de água salgada, bem como a aceitação a alimentação artificial. Foram desenvolvidos e testados protocolos de manejo alimentar e densidade de estocagem mais viáveis a essa fase de cultivo, baseado no desempenho e bem estar do animal. Além disso, em um segundo experimento foi analisado o desempenho da garoupa com 4 dietas práticas; analisando a composição centesimal e de aminoácidos dos animais; influência da adição da taurina em dietas secas sobre o desempenho zootécnico da espécie; além da estimativa de exigência de aminoácidos essenciais em dietas para juvenis de garoupa.

Esta tese foi realizada com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sob orientação do professor Dr. Daniel Lemos. A tese foi redigida seguindo as diretrizes para teses e dissertações da Universidade de São Paulo, baseadas nas Normas Brasileiras (ABNT, 2006) descritas em:

“Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP; documento eletrônico ou impresso – Parte I (ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas)”.

O estudo com a garoupa-verdadeira foi realizado em concordância com a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, sob o número 001Pesq2018.

REFERÊNCIAS

BRABO, M. F.; PEREIRA, L. F. S.; SANTANA, J. V. M.; CAMPELO, D. A. V.; VERAS, G. C. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.4, n. 2, p. 50-58, 2016.

BRASIL, **Primeiro Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura**, p. 136, 2014.

CAVALLI, R.O.; HAMILTON, S. “A piscicultura marinha no Brasil. Afinal, quais as espécies boas para cultivar”, **Panorama da Aquicultura**, v. 17, n. 104, nov./dez. 2017.

FAO. Food and Aquaculture Organization of the United Nation. The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security nutrition for all. Rome, p. 200, 2016.

FAO. Food and Aquaculture Organization of the United Nation. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. p. 224, 2020.

FROESE, R.; ZELLER, D.; KLEISNER, K. What catch data can tell us about the status of global fisheries. **Marine Biology**, v. 159, n. 6, p 1283-1292, 2012.

LOVELL, R.T. Nutrition and feeding of fish. 2.ed. Boston: **Kluwer Academic Publishers**, 1998.

PAULY, D.; ZELLER, D. Catch reconstructions reveal that global marine fisheries catches are higher than reported and declining. **Nature Communications**, v.7, n.10244, p. 1-9, 2016.

PEIXEBR. Anuário Peixe BR da Piscicultura 2020. Associação Brasileira da Piscicultura, São Paulo, p. 136, 2020. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2020>

SANCHES, E. G.; OLIVEIRA, I. R.; SERRALHEIRO, P. C. S. Inversão sexual da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, p. 198-209, 2009.

SEAFOOD BRASIL. V Anuário Seafood Brasil #30. n.30 p. 100, 2019. Disponível em: <http://www.seafoodbrasil.com.br/revista/seafood-brasil-30-5h-yearbook-5-anuario>, 2019.

VALENTI, W.C.; BARROS, H.P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G.W.; CAVALLI, R.O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, n.100611, p. 1-18, 2021.

TACON, A.G.J.; CODY, J.J.; CONQUEST, L.D.; DIVAKARAN, S.; FORSTER, I.P.; DECAMP, O.E. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. **Aquaculture Nutrition**. v. 8, p. 121-137, 2002.

TACON, A.G.J.; METIAN, M. Fishing for aquaculture: non-food use of small pelagic forage fish – a global perspective. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 17, n. 3, p. 305–317, 2009.

TACON, A. G. J.; HASAN, M. R.; METIAN, M. Demand and Supply of Feed Ingredients for Farmed Fish and Crustaceans: Trends and Prospects. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, n. 564. FAO, Rome, p. 87. 2011.

CAPÍTULO 1

Desempenho de juvenis de camarão marinho, *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas baseadas em ingredientes vegetais, pobres em fósforo disponível: avaliação da suplementação de dietas com diferentes formas de fosfatos inorgânicos e enzimas exógenas

Resumo

Foram conduzidos três experimentos de alimentação, crescimento e digestibilidade com juvenis de camarão-branco *Litopenaeus vannamei*, em sistema de recirculação de água salgada, abordando a suplementação de dietas deficientes em fósforo por meio de fontes de fosfatos inorgânicos, e enzimas exógenas (fitase e protease). O primeiro experimento com duração de 52 dias (peso individual de 5,5 a 16-20 g) realizado com dietas pobres em fósforo, suplementadas com três diferentes formas de fosfatos inorgânicos, o bicálcico (DCP), monocálcico (MCP) e o monoamônico (MAP), além de uma dieta controle, deficiente em fósforo. Os resultados em todos os parâmetros testados foram superiores nos tratamentos MCP e MAP, com melhor desempenho, digestibilidade e retenção de nutrientes quando comparado a um controle negativo ou ao tratamento DCP. A adição de DCP não produziu efeitos positivos no desempenho e disponibilidade do fósforo quando comparado ao controle, sendo esse fosfato pouco ou nada disponível ao camarão. Entre os tratamentos MCP e MAP houve poucas diferenças, sendo ambos considerados muito satisfatórios para utilização como fonte suplementar de fósforo para os camarões. O fosfato MAP produziu um valor reduzido de fósforo nas fezes ($P < 0,05$), sendo este um ponto em que foi superior à dieta MCP. Nos dois experimentos seguintes, foram abordadas suplementações de dietas com enzimas exógenas fitase e protease (experimento 2), e níveis progressivos de inclusão de fitase (experimento 3). Os resultados demonstraram efeitos positivos da adição de fitase ($P < 0,05$) a partir de níveis de 4000 FYT/kg sobre o desempenho, digestibilidade e retenção de nutrientes, sendo que ao nível de 6000 FYT/kg os ganhos de performance foram ainda mais superiores, e após esse nível o efeito da enzima parece se estabilizar. A adição de protease às dietas não produziu efeitos significativos sobre o desempenho dos camarões nas condições testadas. A partir dos resultados obtidos nesse estudo, podem ser recomendados os fosfatos inorgânicos MCP e MAP como fontes de fósforo para juvenis de camarão, enquanto a utilização de DCP não é indicada. São indicadas também suplementações de fitase em dietas ricas em ingredientes vegetais em níveis entre 4000 e 6000 FYT/kg para a melhora do aproveitamento dos nutrientes dietéticos.

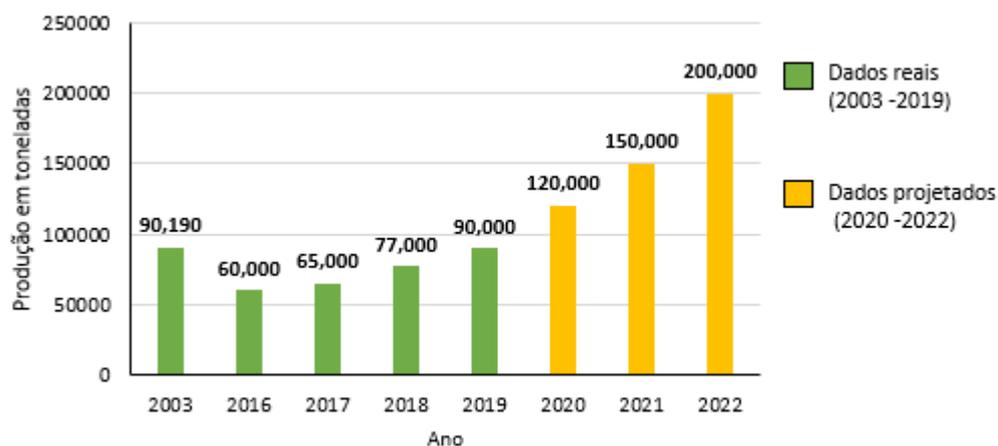
INTRODUÇÃO

No Brasil, a carcinicultura marinha teve o seu início em meados da década de 1970, a partir de tecnologias importadas que permitiram a definição de um pacote próprio, adequado à realidade nacional (MOLES; BUNGE, 2002). Nos primeiros anos da atividade no Brasil, a espécie *Marsupenaeus japonicus* foi a principal aposta, devido ao conhecimento mais avançado sobre as técnicas reprodutivas e de cultivo importadas, já com alguma produção de pós-larvas em laboratório nacional (ABCC, 2011). Porém, passado algum tempo, o cultivo da espécie foi praticamente abandonado, devido às dificuldades na aceitação da espécie às condições nacionais, além da falta de conhecimento e tecnologia para a continuidade da produção da espécie em solo nacional (MOLES; BUNGE, 2002). Na década seguinte, foi introduzido no Brasil os primeiros exemplares do camarão-branco-do-pacífico, ou simplesmente, camarão-branco (*Litopenaeus vannamei*), e que depois demonstraria grande adaptação ao clima e condições naturais do país, aliando resistência e desempenho (AMARAL; ROCHA; LIRA JR., 2003; ORMOND et al., 2004), já indicando que poderia ser uma espécie promissora para o cultivo.

No início, as criações de camarões no Brasil foram baseadas em cultivos extensivos de baixa densidade, com alimentação natural produzida nos próprios viveiros, a partir de fertilizações orgânicas e inorgânicas (AMARAL; ROCHA; LIRA JR., 2003). Ainda na década de 1980, a tentativa de introdução de rações artificiais se mostrou um fracasso, devido entre outros fatores, ao baixo desempenho e aos altos custos, o que impossibilitou a sua adoção efetiva (AMARAL; ROCHA; LIRA JR., 2003). Já na década de 1990 os laboratórios nacionais adquiriram a expertise e o domínio das tecnologias e metodologias relacionadas à reprodução e produção de pós-larvas do *L. vannamei*. Aliado aos avanços da larvicultura do camarão, o avanço e evolução das rações balanceadas permitiram ganhos de produtividade, em paralelo a melhores taxas de conversão alimentar (CARVALHO, 2011). A produção da espécie no Brasil se manteve em crescimento constante na década de 1990, com um salto substancial no período de 1998, quando eram produzidas cerca de 7 mil toneladas, para mais de 90 mil toneladas 5 anos depois, em 2003 (ORMOND et al., 2004), com uma produtividade média de 6,728 ton/ha/ano. Entretanto, diferente das expectativas do setor, o volume produzido

começou a decair nos anos seguintes, devido a fatores extra cultivo como adversidades climáticas, flutuações no câmbio do dólar, queda de valor de mercado, aumento da competitividade no mercado externo, e principalmente pelas instalações de doenças infecciosas devastadoras, como a mionecrose infecciosa (IMNV); mancha branca (WSSV) e a síndrome da mortalidade precoce (EMS) (SUSSEL; VIEGAS; PARISI, 2010; ROCHA; 2008; ROCHA, 2011). Após o pico de produção em 2003, os valores foram decaindo até chegar ao menor valor da série, no ano de 2007 com cerca de 60 mil toneladas produzidas (ROCHA, 2011). Nos anos seguintes a produção se manteve estável, com volumes de produção dentro desse patamar de 60 a 70 mil toneladas por ano (ROCHA, 2020). Depois de um grande vazio de crescimento, a Associação Brasileira de Camarões (ABCC) divulgou em seus números mais recentes, a retomada ao patamar de 90 mil toneladas anuais de camarões produzidos (ROCHA, 2020), no ano de 2019, e projeta um aumento para mais de 200 mil toneladas já no ano de 2022 (Figura 1.1, números pré-pandemia Covid-19).

Figura 1.1 – Declínio, evolução e projeção da produção de camarão marinho cultivado no Brasil: panorama de 2003 a 2022 (ROCHA, 2020).



Fonte: Adaptado de ROCHA, 2020.

No Brasil, a carcinicultura se concentra principalmente nos estados da região Nordeste, com destaque para o Rio Grande do Norte e Ceará, e foi responsável pela produção de 8% do volume total de pescados da aquicultura nacional em 2018, porém, com um valor de mercado correspondente a cerca de 25% do setor, e uma receita anual de mais de 1,1 bilhão de reais (SEAFOOD BRASIL, 2020). No mercado da carcinicultura nacional o *L. vannamei* é de longe a principal espécie cultivada, seguido do camarão-da-

Malásia (*Macrobrachium rosenbergii*), com números bem mais modestos, que beiram volumes de 150 toneladas anuais (VALENTI et al., 2021). Globalmente a produção do *L. vannamei* é responsável por 53% do volume total de crustáceos produzidos na aquicultura, o que corresponde a 70% de toda a produção de camarões, com uma produção de quase 5 milhões de toneladas no ano de 2018 (FAO, 2020). Os números deixam claro a importância do cultivo da espécie no Brasil e no mundo, e estes justificam os estudos que buscam o aumento da eficiência e da sustentabilidade das dietas utilizadas.

Devido aos riscos biológicos que já afetaram e com os quais a cadeia do camarão atualmente convive, as criações tendem a migrar para cultivos intensivos e superintensivos com troca de água limitada ou zero, visando a biossegurança dos mesmos (BROWDY et al., 2009; RAY et al., 2010). A mudança para sistemas intensivos torna ainda mais importante a utilização de rações artificiais, sendo o desempenho e a correta gestão destas fundamentais, uma vez que representam a maior parte dos custos (LOVELL, 1998; TACON et al., 2002; CUZON et al., 2004), além de serem responsáveis ainda por grande parte do aporte de poluentes nos cultivos (AKIYAMA, 1992).

Ao mesmo tempo que cresce a importância da alimentação artificial, as dietas sem farinha de peixe estão se tornando uma realidade necessária na indústria do camarão (CARVALHO et al., 2016), o que era antes um ingrediente de alta inclusão por seu perfil nutricional adequado às espécies marinhas (WILSON, 1989; CARVALHO, 2011), vem rapidamente sendo substituído por subprodutos animais e ingredientes vegetais. Entretanto, todas as demais fontes de proteína possuem algum fator que as torna inferiores nutricionalmente em comparação à farinha de peixe, seja pela falta, indisponibilidade ou desbalanceamento de nutrientes e minerais (HARDY, 2006), sendo necessárias algumas precauções quando utilizadas. No Brasil, os ingredientes vegetais já têm o seu uso consolidado na aquicultura, podendo porventura substituir totalmente o uso da farinha de peixe nas rações. Esses ingredientes por sua vez, comumente apresentam menor digestibilidade, são deficientes em minerais, aminoácidos como, lisina, metionina, e principalmente, apresentam fatores antinutricionais que podem afetar a digestão, palatabilidade e a disponibilidade de nutrientes e minerais, devido a compostos como fitatos (ácido fítico), gossipol e outros (CYRINO et al., 2010). Logo, a

inclusão de elevados níveis de ingredientes vegetais necessita de algumas soluções para evitar a perda de desempenho nas criações, algumas dessas soluções passam pela suplementação com aditivos, para suprir os déficits com aminoácidos e minerais, ou mesmo com suplementos que potencializem a disponibilidade e a digestibilidade dos nutrientes já presentes nas dietas (CROMWELL, 1991) como a adição de enzimas.

Suplementação de dietas

Além da diversificação do uso de ingredientes nas dietas, a redução da descarga de fósforo na água pelos cultivos é um ponto chave para a manutenção das criações e da sustentabilidade do setor, sendo esse objetivo perseguido pela indústrias de rações aquícolas (MORALES et al., 2018). Por muitos anos, os valores de eficiência de retenção do fósforo dietéticos foram baixíssimos, alinhado ao uso de dietas ricas em farinha de peixe, principal fonte de proteína para aquicultura e rico em minerais (YE et al., 2011). Devido ao uso de ingredientes ricos em minerais, comumente os níveis desses nutrientes são supridos, entre eles o fósforo, que muitas vezes está presente em níveis acima do necessário para suprir as necessidades das espécies cultivadas, resultando em dietas com níveis de fósforo que extrapolam o exigido, e invariavelmente se perdem na água de cultivo.

A substituição da farinha de peixe é um dos temas mais abordados e pesquisado na aquicultura (HUA et al., 2019). Indústrias buscam e muitas já se utilizam de formulações com uso dessa farinha restringido ou totalmente substituído, no caminho de um setor mais sustentável (BARUAH et al., 2004). Rações com ingredientes vegetais como principal fonte de proteínas já são uma realidade, no entanto, o uso desses ingredientes que frequentemente apresentam teores de fósforo reduzidos, e em sua maior parte indisponível na forma de fitatos, pode resultar em dietas deficientes nesse mineral, que é um nutriente dietético essencial aos camarões (DAVIS; LAWRENCE 1997; NRC, 2011). A deficiência do fósforo nas dietas animais pode ser minimizada a partir da adição de suplementos, como as fitases, enzimas exógenas que não ocorrem naturalmente em animais monogástricos como o camarão, e que atuam auxiliando parcialmente sobre a biodisponibilidade de fósforo das dietas. Outra estratégia é a

adição de formas de fósforos digeríveis as dietas, como os fosfatos inorgânicos, essas adições, porém, devem ser realizadas a níveis adequados e calculados para cada espécie, a fim de evitar a volta ao problema inicial, que seria o descarte indesejável de fósforo nas águas de cultivo (XIE; YU; REM, 2004; NRC, 2011).

Visto isso, o presente estudo buscou se aprofundar sobre o tema de dietas baseadas prioritariamente em ingredientes vegetais, livres de farinha de peixe, e por sua vez, deficientes em fósforo para o camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, a partir de duas abordagens distintas: a suplementação de fosfatos inorgânicos, nas formas de fosfato bicálcico (DCP), fosfato monocálcico (MCP) e fosfato monoamônico (MAP); e a suplementação de dietas deficientes em fósforo disponível com enzimas exógenas, com enfoque principal sobre a fitase, e a verificação do aumento da biodisponibilidade desse mineral. Para verificação da eficácia das abordagens foram utilizados parâmetros de cultivo dos animais, que envolvem o desempenho de crescimento e alimentar, digestibilidade aparente, composição corporal, e retenção de nutrientes.

OBJETIVOS DETALHADOS

Realização de três experimentos distintos com juvenis de camarão-branco, utilizando diferentes aditivos e abordagens nas formulações, visando suprir a deficiência do fósforo nas dietas.

1 – Experimento 1: Fosfatos inorgânicos - Comparar a eficiência de três diferentes formas de fosfatos inorgânicos: fosfato bicálcico (DCP), fosfato monocálcico (MCP) e monoamônico fosfato (MAP), suplementados em dietas a base de plantas.

2 – Experimento 2: Enzimas exógenas, fitase e protease - Avaliar a eficiência de baixas inclusões de enzimas exógenas (fitase e protease) em dietas baseadas em proteína vegetal sobre o desempenho de camarões.

3 – Experimento 3 – Níveis de fitase - Avaliar níveis progressivos de inclusão de fitase em dietas baseadas em proteína vegetal sobre o desempenho de camarões.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais experimentais, sistema de cultivo, metodologias de análises, cálculos de desempenho, digestibilidade, entre outros, são análogos para os três experimentos realizados com camarões marinhos, portanto, cada um desses tópicos será descrito uma única vez neste capítulo.

Animais experimentais

Pós-larvas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (PL 15, linhagem Speedline) foram obtidas de um produtor comercial do Nordeste do Brasil (via aérea, Aquatec Aquacultura Ltda, Barra do Cunhaú, Brasil) e mantidos em caixa d'água (1000L) com limpeza diária e renovação parcial da água até atingir cerca de 1 g (cerca de 25 dias), nesse período foram alimentados com ração comercial farelada (FlashShrimp, Polinutri, Brasil) em período integral, utilizando-se de alimentadores automáticos de correia (24 horas Pentair, Brookfield, EUA). Água do mar (34 ppt) foi diariamente bombeada da enseada em frente ao laboratório, passando por filtros de cartucho de 25 μm e 5 μm , em trocas diárias de 70% do volume total. Após o período inicial, camarões com 1 g foram estocados em tanque de 7,500 L em sistema heterotrófico (bioflocos, troca zero de água, Figura 1.2) e alimentados com ração comercial (Policamarão, Polinutri, Brasil) até atingir tamanho de estocagem em sistema experimental de testes, com tamanho já acima de 3 g. Os parâmetros de qualidade da água foram controlados no sistema de bioflocos: oxigênio dissolvido (> 70% de saturação), amônia-N total (<0,05 mg/L), nitrito (<0,1 mg/L), pH (7,5-8,2), e alcalinidade (> 120 mg CaCO_3 /L).

Todo o processo de cultivo, desde a fase de pós-larvas, até atingir o peso de estocagem em sistema experimental, foi realizado em três diferentes lotes de camarões, para utilização em cada um dos três experimentos propostos no presente trabalho.

Figura 1.2 – Sistema de cultivo em meio heterotrófico (bioflocos) para manutenção e crescimento dos camarões até atingir tamanho experimental (>3,0 g).



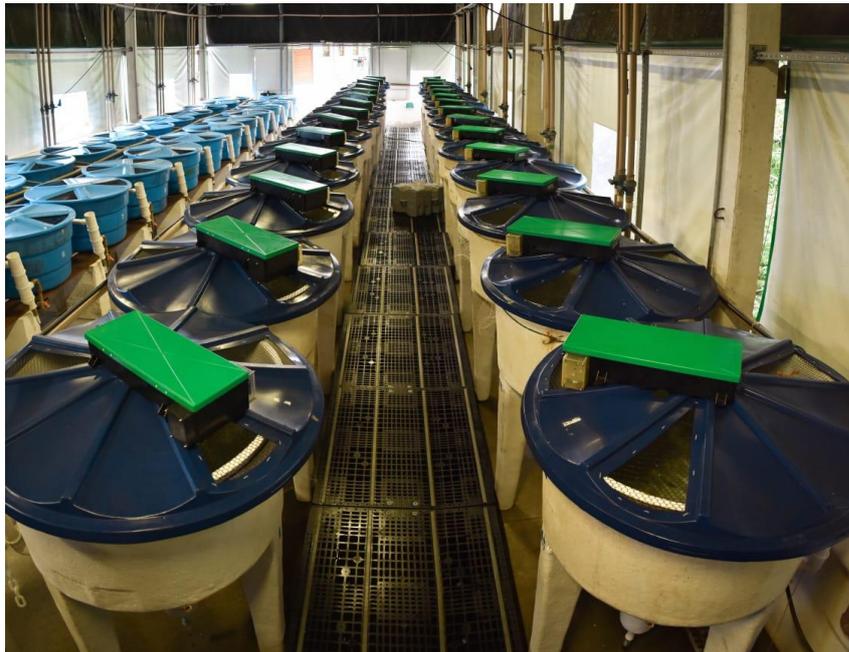
Fonte: Reprodução acervo pessoal

Sistema experimental de cultivo

O sistema experimental recirculante (RAS) de água marinha (água clara, Figura 1.3) foi composto por 28 tanques semicônicos de 500 L (volume útil de aproximadamente 400 L). O sistema estava conectado em recirculação, a tanques que incluíam processos de filtração mecânica, biológica (Sweetwater Bead Filter, Pentair, Brookfield, EUA) e também por meio de luz UV-C (150 W). O volume total do sistema, incluindo os reservatórios de tratamento e estoque possuiu cerca de 17000 L de água marinha, bombeada da enseada em frente ao laboratório, filtrada por filtros de cartucho com 25 e 5 μm e previamente desinfetadas por luz UV-C, o sistema funcionou sem grandes trocas de água (< 5% ao dia), com adições apenas para reposição de perdas devido a evaporação, limpeza e de coletas de amostras.

Todo o sistema foi aquecido por meio de aquecedor de fluxo (10 kW, Globalmar, São Paulo, Brasil), o que proporcionava um ambiente ideal para o máximo desempenho da espécie, com temperatura média de 30 °C. Os tanques possuíam tampa com pequena abertura teladas que permitia a alimentação e observação dos animais, e garantiam ainda a minimização do estresse, a dosagem da entrada de luz do ambiente, além de evitar perdas de animais experimentais (saltos).

Figura 1.3 – Sistema experimental de cultivo recirculante de água marinha, adaptado para experimentos de desempenho e digestibilidade.



Fonte – Reprodução acervo pessoal

Os tanques eram dotados de colunas de decantação individuais para coleta de fezes e remoção de sólidos. Esse sistema de coleta era composto por um tubo tipo Falcon, translúcido, encaixado ao final da coluna de decantação, que acumulava todos os sólidos do tanque, além disso, o design do fundo dos tanques, com caimento em direção ao centro, auxiliava nesse processo de captura de sólidos pela coluna de decantação. Por meio desses tubos era possível realizar a coleta de fezes para amostragem, verificação de mudas e também de possíveis sobras de ração (Figura 1.4). Cada tanque continha ainda um sistema de aeração, capaz de sustentar bons níveis de oxigenação, promovido por pequenas pedras porosas localizadas a 30 cm do fundo, essas ligadas a um sistema central de ar, provido por compressor de ar radial externo ao galpão de experimentos. A renovação de água dos tanques era promovida por “esguichos” a um fluxo de 4 L/min para cada tanque, que promovia a formação de um vórtice, que também auxiliava na concentração de sólidos para o sistema de decantação.

Figura 1.4 – Vista inferior dos tanques de cultivo de camarões marinhos, com tubos do sistema de decantação utilizados nos experimentos de digestibilidade nas laterais da imagem.



Fonte: Reprodução acervo pessoal

O sistema foi desenvolvido e controlado durante os experimentos de modo a minimizar o estresse dos animais, promover a manutenção da qualidade da água a níveis compatíveis com a melhor performance da espécie, bem como, otimizar o desempenho dos animais e a coleta de amostras representativas.

Protocolo de preparação das dietas experimentais

Ingredientes

Para a escolha dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais (Tabela 1.1), foi adotado o critério de que os mesmos devessem estar disponíveis no mercado nacional, e serem comumente empregados na fabricação de rações para camarões marinhos no Brasil, sendo estes obtidos a partir de fornecedores locais. Foram utilizados no preparo das dietas, ingredientes em sua maioria de origem vegetal, sendo eles: farinha de trigo, farelo de soja, glúten de trigo, concentrado protéico de soja, levedura seca e lecitina de soja. Além dos ingredientes vegetais, foram utilizados alguns ingredientes marinhos, principalmente pelo teor palatabilizante e balanceamento de

aminoácidos dos mesmos, que foram a farinha de lula, hidrolisado de peixe e o óleo de peixe, além disso foram utilizadas duas farinhas de subprodutos da indústria animal, a farinha de penas e a farinha de sangue. Além desses ingredientes foram utilizados na composição das dietas a inclusão de aminoácidos purificados para o balanceamento e atendimento das exigências da espécie, preparado vitamínico e mineral próprio para camarões (Premix), óxido de cromo III (Cr_2O_3) como marcador inerte para estudo de digestibilidade, e também os suplementos testados, que foram os fosfatos inorgânicos, fosfato bicálcico (DCP, Aliphos, Holanda), fosfato monocálcico (MCP, Aliphos, Holanda) e fosfato monoamônico (MAP, Aliphos, Holanda), e as enzimas exógenas, fitase (RONOZYME® HiPhos, DSM, Brasil) e protease (RONOZYME® ProAct, DSM, Brasil). Antes da preparação das dietas, os ingredientes foram previamente moídos até tamanho de partícula inferior à 250 μm em moinho de martelo (MCS 350 Moinhos Vieira, Tatuí, SP-Brasil), tamanho de partícula indicada para a preparação de dietas para camarões. Os ingredientes apresentados foram utilizados para os 3 experimentos realizados com juvenis de *L. vannamei*.

Tabela 1.1 – Composição centesimal e mineral (% em matéria úmida, analisado) dos ingredientes utilizados nas fabricações de dietas experimentais para o camarão branco, *Litopenaeus vannamei*.

Ingredientes (%)	Umidade	Proteína bruta	Gordura	Matéria mineral	Ca	P	Mg
Farinha de trigo ¹	13,1	12,6	1,40	0,78	0,04	0,18	0,05
Farelo de soja ²	12,1	45,0	1,86	6,03	0,29	0,55	0,28
Glúten de trigo ³	7,43	76,3	0,94	1,19	0,07	0,22	0,04
Farinha de lula ⁴	5,02	84,4	3,21	3,17	1,45	1,28	0,17
Hidrolisado de peixe ⁵	65,6	10,8	5,50	6,07	0,96	1,76	0,11
Farinha de sangue ⁶	7,92	88,8	0,90	1,78	0,03	0,08	0,01
Concentrado protéico de soja ⁷	8,98	59,2	0,44	6,20	0,34	0,75	0,35
Farinha de penas ²	5,74	82,2	7,16	1,84	0,26	0,28	0,04
Levedura seca ⁷	4,68	30,4	0,05	7,74	0,11	0,67	0,14
Óleo de peixe ²	0,16	0,01	99,3	0,06	0,02	0,01	0,004
Lecitina de soja ²	1,02	0,85	90,8	9,27	0,14	1,83	0,21

¹ Coamo, Campo Mourão, PR - Brasil

² Guabi, Campinas, SP - Brasil

³ Syral, Aaslt, Bélgica

⁴ Polinutri, Osasco, SP - Brasil

⁵ Aquativ, Elven, França

⁶ A&R, Maringá, PR - Brasil

⁷ CJ Selecta, Araguari, MG - Brasil

Preparo das dietas

O laboratório de aquicultura (LAM) do Instituto Oceanográfico da USP em sua base na cidade de Ubatuba (SP), é dotado de uma minifábrica de rações experimentais. O laboratório é equipado com uma batadeira industrial (Modelo ES-600, Hobart, Ohio, EUA) utilizada na mistura dos ingredientes e também no processo de fabricação de péletes, cabine de secagem de dietas, com capacidade de secagem para 25 kg simultâneos, freezers e geladeiras para estocagem das dietas prontas.

Para o preparo das dietas, os ingredientes foram pesados individualmente em balança semianalítica, sendo primeiro misturados os ingredientes de menor inclusão

(<5%), juntamente a uma pequena porção de farinha de trigo, para homogeneização dos mesmos. Em seguida foram adicionados os ingredientes de maior inclusão (>5%) juntamente aos demais ingredientes secos na batedeira industrial, onde foram misturados por 10 minutos. Após a completa mistura, foram adicionados os ingredientes líquidos (óleo e hidrolisado de peixe e lecitina de soja), e após foi adicionado água destilada (aproximadamente 20% do peso total da dieta), misturado por mais 10 minutos e retirado para verificação. Constatado a homogeneidade da mistura e o “ponto” para peletização, a dieta foi prensada a frio (45 °C) utilizando matriz da peletizadora de 2,0 mm, produzindo péletes de 2,0 mm de diâmetro (2,0 a 4,0 mm de comprimento, Figura 1.5), estes foram secos na cabine de secagem por uma noite (temperatura de 35 a 45 °C, por 18h).

Após a secagem os péletes foram retirados da cabine de secagem, e ao atingir temperatura ambiente foram embalados em sacos herméticos para freezer, tipo “zip”, e armazenados congelados a -15 °C até o seu uso.

Figura 1.5 – Amostra de dieta experimental fabricadas no Laboratório de Aquicultura (LAM) do Instituto Oceanográfico da USP, com tamanho de pélete de 2,0 a 4,0 mm, e diâmetro de 2,0 mm.



Fonte – Reprodução acervo pessoal

Experimento 1 – Fosfatos inorgânicos

As dietas foram preparadas conforme anteriormente descrito. Para esse experimento foram utilizadas três diferentes dietas, de formulações semelhantes, diferenciando-se pela suplementação de diferentes fosfatos inorgânicos, além de uma dieta controle, sem a suplementação mineral.

Para o experimento, foi formulada uma dieta base para camarão marinho com baixa inclusão de ingredientes animais, sendo teoricamente deficiente no teor de fósforo para a espécie. Foram utilizados o fosfato bicálcico, fosfato monocálcico e o fosfato monoamônico, como forma de fósforo suplementar nas dietas. A formulação e composição centesimal das dietas são apresentadas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Formulação, composição centesimal e mineral das dietas experimentais (matéria úmida) utilizadas em teste de suplementação com diferentes formas de fosfatos inorgânicos, para verificação de desempenho e digestibilidade do camarão marinho *L. vannamei*. Dados expressos em média para composição centesimal (n=3) e teor mineral (n=2). DCP fosfato bicálcico, MCP fosfato monocálcico e MAP fosfato monoamônico.

Ingredientes (%)	Ctrl -	DCP	MCP	MAP
Farinha de trigo	37,15	35,80	36,08	36,23
Farinha de soja	18,00	18,00	18,00	18,00
Farinha de sangue	3,50	3,50	3,50	3,50
Glúten de trigo	10,00	10,00	10,00	10,00
Farinha de lula	7,50	7,50	7,50	7,50
Concentrado protéico de soja	4,00	4,00	4,00	4,00
Farinha de penas	4,00	4,00	4,00	4,00
Levedura seca	3,00	3,00	3,00	3,00
Óleo de peixe	4,10	4,10	4,10	4,10
Hidrolisado de peixe	5,00	5,00	5,00	5,00
Lecitina de soja	1,00	1,00	1,00	1,00
Premix ¹	1,00	1,00	1,00	1,00
Óxido de cromo ²	0,50	0,50	0,50	0,50
Metionina ³	0,45	0,45	0,45	0,45
Lisina ⁴	0,80	0,80	0,80	0,80
DCP ⁵	-	1,35	-	-
MCP ⁵	-	-	1,07	-
MAP ⁵	-	-	-	0,925
Composição centesimal				
Umidade (%)	5,36 (0,14)	4,70 (0,17)	4,51 (0,25)	5,29 (0,38)
Proteína bruta (%)	39,7 (0,40)	39,8 (0,09)	39,8 (0,05)	40,1 (0,10)
Gordura bruta (%)	7,25 (0,03)	6,63 (0,01)	7,09 (0,06)	7,39 (0,02)
Matéria mineral (%)	4,03 (0,11)	5,03 (0,01)	4,66 (0,10)	4,14 (0,13)
Cr ₂ O ₃ (%)	0,47 (0,02)	0,49 (0,01)	0,40 (0,02)	0,39 (0,01)
Fósforo (g/kg)	5,07 (0,61)	7,41 (0,52)	7,90 (0,51)	8,03 (0,05)
Magnésio (g/kg)	1,19 (0,11)	1,26 (0,06)	1,28 (0,11)	1,28 (0,03)
Cálcio (g/kg)	2,52 (0,07)	6,68 (0,01)	4,62 (0,08)	2,55 (0,40)
Potássio (g/kg)	6,58 (0,84)	6,78 (0,40)	6,69 (0,65)	6,75 (0,38)

Ca/P	0,50	0,90	0,58	0,32
¹ DSM, Mairinque, São Paulo				
² Dinâmica, Indaiatuba, Brasil				
³ Evonik Industries, Hanau, Alemanha				
⁴ Evonik-Degussa, Castro, Brasil				
⁵ Aliphos, Rotterdam, Holanda				

Experimento 2 – Suplementação de enzimas exógenas

No segundo experimento foram testadas sete diferentes dietas, todas de formulação similar, focadas na substituição de ingredientes marinhos e animais por ingredientes vegetais (Tabela 1.3). Para o teste foi fabricada uma dieta denominada controle positivo (Ctrl +) que recebeu a suplementação com fosfato inorgânico (MCP), visando atingir as necessidades de fósforo exigidas para a espécie, um controle negativo (Ctrl -), deficiente neste mineral. As demais dietas, de mesma formulação receberam adições de fitase a níveis de 2000 e 4000 FYT/kg (Phy2000 e Phy4000), outras duas com adição de fitase nos mesmos níveis além da adição de protease a 400 ppm por dieta (Phy2000+Prot e Phy4000+Prot), além de uma dieta que recebeu a protease e o fosfato inorgânico (MCP+Prot), totalizando sete dietas teste. As dietas foram preparadas como descrito anteriormente e foram testadas com 4 réplicas/tanques por tratamento, durante o período de 50 dias.

Tabela 1.3 – Formulação, composição centesimal e mineral das dietas experimentais (matéria úmida) utilizadas em teste de suplementação com protease e dois níveis diferentes de fitase, para verificação de desempenho e digestibilidade do camarão marinho *L. vannamei*. Dados expressos em média para composição centesimal (n=3) e teor mineral (n=2).

Ingredientes (%)	Ctrl (+)	Ctrl (-)	Phy2000	Phy4000	MCP+Prot	Phy2000 + Prot	Phy4000 + Prot
Farinha de trigo	34,90	35,95	35,95	35,95	34,90	3,95	35,95
Farelo de soja	26,70	26,70	26,70	26,70	26,70	26,70	26,70
Farinha de sangue	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Glúten de trigo	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Farinha de lula	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Concentrado protéico de soja	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Farinha de penas	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Levedura seca	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Óleo de peixe	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Hidrolisado de peixe	4,30	4,30	4,30	4,30	4,30	4,30	4,30
Lecitina de soja	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Premix ¹	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Óxido de cromo ²	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Metionina ³	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Lisina ⁴	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
MCP ⁵	1,05	-	-	-	1,05	-	-
Phytase ¹ FYT/kg	-	-	2000	4000	-	2000	4000
Protease ¹ (ppm)	-	-	-	-	400	400	400
Composição centesimal							
Umidade (%)	5.51 (0.07)	5.15 (0.44)	5.58 (0.44)	5.27 (0.12)	5.46 (0.38)	5.52 (0.31)	5.38 (0.09)
Proteína bruta (%)	39.0 (0.51)	39.8 (0.06)	40.3 (0.59)	40.0 (0.85)	40.2 (0.22)	40.6 (0.27)	40.6 (0.10)
Gordura bruta (%)	7.23 (0.08)	7.41 (0.06)	7.34 (0.08)	7.48 (0.13)	7.54 (0.03)	7.78 (0.33)	7.66 (0.05)
Matéria mineral (%)	5.10 (0.13)	4.51 (0.14)	4.31 (0.19)	4.92 (0.21)	5.22 (0.12)	4.65 (0.06)	4.70 (0.15)
Cr ₂ O ₃ (%)	0.39 (0.01)	0.43 (0.01)	0.42 (0.01)	0.39 (0.02)	0.40 (0.01)	0.42 (0.01)	0.42 (0.2)
Fósforo (g/kg)	8,13	5,83	5,84	6,15	8,55	5,99	6,36
Magnésio (g/kg)	1,86	1,81	1,72	1,83	1,91	1,85	1,83
Potássio (g/kg)	9,28	9,61	9,13	9,78	9,77	9,9	10,1

¹DSM, Mairinque, São Paulo

²Dinâmica, Indaiatuba, Brasil

³Evonik Industries, Hanau, Alemanha

⁴Evonik-Degussa, Castro, Brasil

⁵Aliphos, Rotterdam, Holanda

Experimento 3 — Níveis de inclusão de fitase

No terceiro teste com o camarão *L. vannamei*, foram testadas sete dietas experimentais com duração de 42 dias, seguindo o mesmo foco de todo o trabalho com a espécie, a baixa disponibilidade de fósforo nas dietas, fruto da utilização de ingredientes em sua maioria vegetais e subprodutos da indústria animal. A formulação das dietas, bem como sua composição centesimal e mineral são apresentados na Tabela 1.4. A fabricação das dietas e armazenamento se deu como descrito anteriormente. Assim como nos experimentos anteriores, foram utilizados em sua maioria ingrediente de origem vegetal para a formulação das dietas, porém mais restritiva em termos de fósforo total e maior concentração de fósforo fítico (fitato, indisponível para camarões e demais animais monogástricos em geral). Nesse experimento foram utilizados um controle positivo (Ctrl +) com a adição do fosfato monocálcico, um controle negativo (Ctrl -) sem a adição de suplementação, e cinco níveis progressivos de adição de fitase, 2000, 4000, 6000, 8000 e 16000 FYT/kg.

Tabela 1.4 – Formulação, composição centesimal e mineral das dietas experimentais (matéria úmida) utilizadas em teste de suplementação com diferentes níveis de fitase, para verificação de desempenho e digestibilidade do camarão marinho *L. vannamei*. Dados expressos em média para composição centesimal (n=3) e teor mineral (n=2).

Ingredientes (%)	Ctrl+	Ctrl-	Phy2000	Phy4000	Phy 6000	Phy 8000	Phy 16000
Farinha de trigo	35,00	36,20	36,20	36,20	36,20	36,20	36,20
Farelo de soja	26,70	26,70	26,70	26,70	26,70	26,70	26,70
Farinha de sangue	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Glúten de trigo	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Farinha de lula	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50	3,50
Concentrado protéico de soja	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Farinha de penas	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Levedura seca	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Óleo de peixe	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Hidrolisado de peixe	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Lecitina de soja	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Premix ¹	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Cr ₂ O ₃ (%) ²	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Metionina ³	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
Lisina ⁴	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
MCP ⁵	1,20	-	-	-	-	-	-
Phytase ¹ FYT/kg	-	-	2000,00	4000,00	6000,00	8000,00	16000,00
Composição centesimal							
Umidade (%)	5,34 (0,32)	5,40 (0,65)	4,98 (0,44)	6,09 (0,09)	5,60 (0,10)	5,77 (0,07)	5,55 (0,09)
Proteína bruta (%)	39,6 (0,59)	39,9 (1,1)	39,7 (1,1)	39,4 (0,45)	38,8 (0,74)	39,9 (0,78)	38,8 (0,17)
Gordura bruta (%)	6,34 (0,05)	6,33 (0,07)	6,85 (0,16)	6,35 (0,11)	6,55 (0,15)	6,24 (0,34)	6,33 (0,21)
Matéria mineral (%)	5,24 (0,06)	4,39 (0,02)	4,37 (0,27)	4,52 (0,07)	4,42 (0,01)	4,44 (0,06)	4,64 (0,04)
Cr ₂ O ₃ (%)	0,35 (0,01)	0,41 (0,02)	0,41 (0,01)	0,41 (0,01)	0,36 (0,01)	0,35 (0,01)	0,36 (0,02)
Fósforo (g/kg)	9,16	5,5	5,54	5,8	5,57	5,36	5,96
Magnésio (g/kg)	2,11	2,04	1,91	1,95	1,88	1,89	2,02
Potássio (g/kg)	10,8	10,9	10,3	10,2	9,92	10,4	10,8

¹DSM, Mairinque, São Paulo

²Dinâmica, Indaiatuba, Brasil

³Evonik Industries, Hanau, Alemanha

⁴Evonik-Degussa, Castro, Brasil

⁵Aliphos, Rotterdam, Holanda

Estocagem de camarões e manejo alimentar

Os juvenis de camarões foram pesados individualmente em água do mar (balança semianalítica, Sartorius CPA 22025, Goettingen - Alemanha), e estocados ao número de 34 indivíduos por tanque, correspondendo a uma densidade inicial de estocagem de 85 indivíduos/m³. Os camarões foram alimentados durante pelo menos cinco dias com as dietas experimentais, antes do início das coletas de fezes para análises de digestibilidade.

A maior parte da alimentação foi fornecida por alimentadores automáticos (70 a 80% do peso diário), enquanto o restante foi fornecido de forma manual, em pequenas porções durante o intervalo de tempo das 8h00 às 14h00, que correspondia ao período de coleta de amostras fecais. A quantidade inicial de ração a ser fornecida para os camarões foi determinada a partir da biomassa, peso individual e temperatura da água, conforme recomendações de Forster et al. (2003) para *L. vannamei* (Tabela 1.5). No decorrer do experimento as quantidades de ração foram ajustadas de acordo com o consumo, a previsão de incremento de peso nos indivíduos e observação diária de possíveis sobras de ração nos tubos de decantação, podendo a quantidade ser aumentada/diminuída pela ausência/presença de desperdício de ração.

Tabela 1.5 – Determinação de taxa de arraçoamento utilizado para camarões baseados no peso e temperatura, usado como referência nos experimentos.

Peso médio individual (g)	Porcentagem da biomassa estimada		
	21 -24 °C	24 -28 °C	28 -32 °C
1 - 3	6,0	7,0	8,0
3 - 5	5,0	6,0	7,0
5 -7	4,5	5,5	6,5
7 - 9	4,0	5,0	6,0
9 - 11	3,5	4,5	5,5
11 -13	3,0	4,0	5,0
13 - 15	2,5	3,5	4,5
15 -17	2,5	3,0	4,0
17 -30	2,0	2,5	3,0

Adaptado, Forster et al. (2003).

Coleta de amostras de fezes e análises de digestibilidade

Nos três experimentos foram realizadas coletas de fezes para análises de digestibilidade aparente de nutrientes, seguindo a mesma metodologia descrita a seguir. Para essas análises foi adicionado o óxido de cromo III (Cr_2O_3) a todas as dietas experimentais, sendo considerado um marcador inerte, e que permite calcular o coeficiente de digestibilidade ou a taxa de desaparecimento dos nutrientes.

A coleta e amostragem de fezes foram iniciadas após o período de 5 dias de alimentação com as dietas experimentais. Amostras foram coletadas individualmente para cada tanque, seis vezes ao dia, cinco dias por semana, durante o período da manhã e tarde. A rotina de coleta era iniciada pela limpeza e troca do tubo falcon com material decantado no período da noite, o qual era totalmente descartado. Após 1 hora dessa limpeza eram coletadas as primeiras amostras, o que era feito posteriormente de hora em hora até a sexta coleta. Esse material coletado foi filtrado, retirando-se manualmente possíveis contaminações com restos de ração e mudas de camarão, era cuidadosamente lavado com água destilada, retirado o excesso de umidade e sal, e então estocados em freezer ($-15\text{ }^\circ\text{C}$) até serem finalmente secas em liofilizador para o processo de análises.

Os Coeficientes de Digestibilidade Aparente (CDA) para matéria seca e nutrientes (%) das dietas foram calculados como se segue:

$$\text{CDA (matéria seca, \%)} = 100 - 100(\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ na dieta} / \% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ nas fezes})$$

$$\text{CDA (nutrientes, \%)} = 100 - 100[(\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ na dieta} / \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ nas fezes}) * (\text{N fezes} / \text{N dietas})]$$

Onde N corresponde ao nutriente estudado. Foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente para a proteína total, matéria mineral, cálcio, magnésio, potássio e fósforo.

Finalização dos experimentos, amostragem de animais e cálculos de desempenho

Após a finalização do período experimental os animais foram eutanasiados, sendo imersos em água com gelo ($0\text{ }^\circ\text{C}$), onde acontecia a imediata imobilização dos mesmos. Foram então pesados individualmente, para a amostragem de desempenho dos animais. Dez animais por tanque foram congelados para as análises da composição

centesimal e mineral da carcaça, de mesmo modo, foram retirados exoesqueletos de 10 camarões por tanque, para a composição desse material.

O desempenho alimentar e de crescimento de juvenis *L. vannamei* foram calculados utilizando as seguintes equações:

Ganho de peso (%) = (peso final – peso inicial) / peso inicial * 100.

Taxa de crescimento específico (TCE) (% dia⁻¹) = (ln peso final – ln peso inicial) / dias * 100

Sobrevivência (%) = 100* (número de camarões final / número de camarões inicial)

Crescimento (g/semana) = (peso total final – peso total inicial) / número de semanas

Fator de conversão alimentar (FCA) = Consumo total de ração / (peso final total - peso inicial total).

O FCA é uma medida de produtividade animal, calculado pela razão entre o volume consumido de alimento e a biomassa produzida, quanto menor for o valor dessa razão, maior é a eficiência alimentar.

Taxa de eficiência protéica (TEP) =

(peso total final – peso total inicial) / total de proteína consumida

Análises químicas

Amostras de ingredientes, dietas, carcaça e fezes, a serem utilizadas para análises, foram coletadas antes e durante o experimento e estocadas em freezer (-15 °C). Para a realização de análise, amostras de ingredientes, dietas, e carcaças passaram por processo de preparação, que envolveu a moagem para homogeneização, seguido de secagem em estufa (103 °C) até atingir peso constante; amostras de fezes foram liofilizadas e depois secas até peso constante também em estufa (103 °C). Esse processo forneceu os valores do teor de umidade das amostras, pela diferença de peso antes e após secagem. Após a secagem uma nova moagem foi realizada, e por fim as amostras foram acondicionadas em embalagens herméticas no freezer, até a realização das demais análises.

As análises de composição centesimal de ingredientes, dietas, fezes, carcaça e exoesqueleto foram realizados no próprio Laboratório de Aquicultura (LAM), sendo utilizadas metodologias padrões, descritas em AOAC (2005). O teor das cinzas e matéria mineral foi analisada pelo método gravimétrico, calculado pela diferença do peso antes e após a queima em mufla (600 °C por 4 horas), sendo as amostras retiradas do forno e resfriados à temperatura ambiente em dessecador para a apuração do teor mineral.

O teor de proteína bruta foi obtido a partir da análise do nitrogênio total nas amostras, de acordo com o método Kjeldahl, utilizando digestão ácida (H_2SO_4) em bloco digestor (Kjeltec 8200, Foss, Dinamarca) a 420 °C e catalisado pela inclusão de sulfato de cobre no processo, seguido pela destilação (Kjeltec 8200, Foss) com água destilada, hidróxido de sódio (40 % p:v), ácido bórico (30%), e a presença de indicadores (verde de bromeocrasol e vermelho de metila). Após a recuperação do nitrogênio no processo de destilação, o volume obtido foi titulado com ácido clorídrico padronizado (0,1 N) até atingir o “ponto de viragem”. Para chegar ao valor de proteína bruta das amostras, o valor obtido de nitrogênio na amostra foi multiplicado pelo fator empírico de 6,25 (AOAC- 0976.05).

O teor de gordura foi obtido a partir da extração de lipídeos em equipamento específico (ST255, Soxtec, FOSS), utilizando como solvente o éter de petróleo a temperatura de 235 °C, e medido a partir do peso recuperado de gordura das amostras. As análises do marcador inerte cromo na ração e nas fezes foi feita pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5 difenilcarbazida (BREMER-NETO et al., 2005), com leitura em cubeta de quartzo de 1 cm de trajeto óptico a 550 nm.

Análises de composição mineral para cálcio, magnésio, potássio e fósforo foram realizados em laboratório externo (Merieux Nutrisciences Brasil, São Paulo, Brasil), por meio de espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) (EPA, 2014). Para o segundo e terceiro experimentos, as análises de teor de fósforo da carcaça e do exoesqueleto foram realizadas a partir do método de complexação mista de molibdato/fosfato em presença do íon vanadato e quantificação colorimétrica por espectrofotometria à 420 nm (Brasil, 2011).

Composição centesimal e mineral, retenção de nutrientes

A composição centesimal e mineral corporal dos camarões foram analisadas ao início e ao final dos 3 experimentos realizados. Com esses dados foram calculados os incrementos na composição dos animais conforme as diferentes dietas e suplementações a que foram submetidos.

A partir dos valores de composição corporal inicial e final foram calculados o percentual de eficiência de retenção de nutrientes (ERN) para cada um dos tratamentos, segundo os cálculos a seguir (adaptado, STOREBAKKEN; SHEARER; ROEM, 1998).

$$\text{ERN (\%)} = 100 * [(P_f * N_f) - (P_i * N_i)] / (C_{\text{dieta}} * N_{\text{dieta}})$$

Onde P_f corresponde ao peso final dos animais, P_i ao peso inicial, N_f ao conteúdo final do nutriente na carcaça, N_i ao conteúdo inicial na carcaça, C_{dieta} ao consumo de ração durante o período de experimento e N_{dieta} ao teor do nutriente estudado na dieta. Todos os valores utilizados para os cálculos são feitos a partir do teor de nutriente obtido com base na matéria seca do composto analisado. Foram calculados a retenção de matéria seca, proteína bruta, gordura, matéria mineral e fósforo para os três experimentos realizados.

Estabilidade do pélete na água

No primeiro experimento, foram utilizadas dietas suplementadas com fosfatos inorgânicos, e estes possuem notadamente diferentes solubilidades em água, podendo afetar a sua disponibilidade nas rações, bem como aumentar a dispersão para a água por meio da lixiviação. Sabido isso, foram realizados testes para verificação da perda potencial de minerais nas dietas pela lixiviação. Essa perda foi estimada a partir de experimento simulando os parâmetros do ambiente de cultivo.

O teste de lixiviação baseado em Obaldo, Divakaran e Tacon (2002) foi realizado em triplicatas. Para isso eram pesadas amostras de 2,0 g das dietas e inseridas em frascos Elenmeyer com volume de 250 ml contendo água marinha (35 ppt). Esses frascos eram imersos em banho-maria com temperatura (30 °C) e agitação controlada (100 ciclos por minuto), de modo a reproduzir o ambiente e a agitação dos tanques de cultivo,

utilizando aparelho adequado (Figura 1.6, A e B) (Lindberg/Blue M RSWB 3222 A-2, ThermoFisher Scientific Inc.,MA, EUA).

Figura 1.6 -Aparato de equipamentos e processo de análise de amostras: pesagem das amostras de ração e estabilização de temperatura do equipamento (A), imersão das amostras em água salgada em banho maria com agitação, simulando condições de cultivo (B), amostra após 30 minutos imersa em água, pré filtragem (C), amostras de ração após filtrações prontas para serem secas em estufa e analisados os teores de nutrientes após processo de lixiviação (D).



Fonte – Reprodução acervo pessoal

As amostras foram colocadas em intervalos de tempo, de modo a serem retiradas gradativamente, todas após 30 minutos de imersão e agitação (Figura 1.6, C). Após esse período o conteúdo dos frascos foi filtrado a vácuo com auxílio de água destilada para retirar o excesso de sal (Figura 1.6, D), esse procedimento foi realizado com filtros previamente secos e pesados (0,7 μm fibra de vidro, AP4004700, Millipore). As partículas de péletes, juntamente aos filtros foram secos em estufa a 105 °C até peso constante. Foram realizadas análises de minerais e as possíveis perdas de fósforo, cálcio, magnésio e potássio foram contabilizadas a partir da proporção de nutrientes recuperados após a lixiviação em comparação ao conteúdo original das dietas.

Controle de parâmetros e qualidade da água

Anterior ao início dos experimentos foi realizado durante 2 semanas a “maturação” e estabilização dos sistemas de filtrações. Durante esse período foi também verificado a estabilidade da temperatura da água com medições em diferentes

horários e períodos do dia, bem como o teor de oxigênio dissolvido e a salinidade foram monitorados, de modo a padronizar e garantir a homogeneidade da qualidade da água.

Após o início dos experimentos, diariamente foram monitorados a temperatura, salinidade e teor de oxigênio dissolvido, utilizando sonda multiparâmetros YSI 85[®] meter (YSI Inc., Yellow Springs, OH, EUA), e, quando necessário, eram feitos ajustes na temperatura por meio de pequenas alterações nos aquecedores e adições de água doce para correção de salinidade (quando acima de 35 ppt). A amônia total, nitrito, nitrato, pH e alcalinidade da água foram monitorados semanalmente com a utilização de kit comercial colorimétrico para água salgada (Alfakit, Florianópolis, SC, Brasil), sendo que pequenos ajustes da alcalinidade total eram feitos pela adição de bicarbonato de sódio (NaHCO₃).

Análises estatísticas

Nos três experimentos com o camarão foram utilizados o delineamento inteiramente casualizado. Cada tanque foi considerado como uma unidade experimental, e o valor médio das quadruplicatas para cada tratamento foi utilizado para as análises estatísticas. Todos os resultados obtidos foram submetidos a testes de normalidade de Shapiro-Wilk e para homogeneidade das variâncias foi utilizado o teste de Levene. Satisfeitas as premissas, os dados foram submetidos à análise estatística paramétricas. Para as análises de variância foram utilizados teste ANOVA de um fator, e, quando observadas diferenças entre as médias, os dados foram submetidos a análise pós-hoc de Tukey, utilizando IBM SPSS Statistics for Windows, versão 20.0 (IBM Corp., Armonk, NT). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ (ZAR, 1984).

RESULTADOS

Experimento 1 – Fosfatos inorgânicos

Os parâmetros de qualidade de água monitorados durante 52 dias de período experimental são apresentados na Tabela 1.6, as medições mostraram que as variações foram baixas, com os parâmetros sempre dentro das faixas esperadas, indicando um bom ajuste no sistema.

Tabela 1.6 – Qualidade da água monitorado durante 52 dias de experimento com juvenis de *L. vannamei* em sistema de recirculação de água salgada. Valores expressos como média (DP).

Temperatura (°C)	OD (%)	OD (mg/L)	Salinidade (ppm)	Amônia (mg/L)	Nitrito (mg/L)	pH	Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)
30,1 (0,22)	91,5 (4,80)	6,68 (0,92)	34,4 (0,52)	0,48 (0,37)	0,15 (0,11)	7,69 (0,26)	108,8 (16,4)

O desempenho zootécnico do camarão *L. vannamei* alimentado com dietas suplementadas de fosfatos inorgânicos é apresentado na Tabela 1.7. A sobrevivência foi alta para todos os tratamentos e variou de 87,9% a 95,5%, e não foi significativamente afetada pelas dietas ($P>0,05$). O desempenho como um todo pode ser considerado bom durante o experimento. Os camarões apresentaram peso final médio entre 3 e 4 vezes maior em relação ao peso inicial. Esses valores apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, sendo superiores para MCP e MAP em relação aos tratamentos CTRL- e DCP. O ganho de peso semanal esteve sempre acima de 1,4 g/semana, sendo que para os melhores tratamentos, MCP e MAP, o crescimento semanal obteve resultados expressivos, com valores de 2,01 e 2,10 g/semana, respectivamente, estatisticamente superiores aos tratamentos CTRL- e DCP. Do mesmo modo, o ganho de peso percentual apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, também superior para MCP e MAP em detrimento aos tratamentos CTRL- e DCP que apresentaram valores finais inferiores, e semelhantes entre si. Em resumo, as dietas CTRL- e DCP acarretaram em restrições de pelo menos 30% no crescimento dos juvenis de camarão, quando comparado com os animais alimentados com as dietas MCP e MAP. Os valores de conversão alimentar obtidos após 52 dias de experimento foram condizentes para essa fase de crescimento do camarão e variaram de 1,59 e 2,28, apresentando diferenças estatísticas entre os tratamentos CTRL-, DCP que foram mais elevados e, portanto, piores em relação aos tratamentos MCP e MAP. Assim como o FCA, o consumo de ração também variou significativamente, e apresentou diferenças

entre todas as dietas, sendo menor significativamente na seguinte ordem CTRL- <DCP<MCP<MAP. Simultaneamente a isso, foi observado frequentemente durante o período experimental o consumo de exúvia pelos camarões nos tratamentos CTRL- e DCP, e esporadicamente no tratamento MCP, enquanto no tratamento MAP esse comportamento não foi constatado. No mesmo caminho dos outros apontadores de desempenho, a taxa de crescimento específico e a taxa de aproveitamento de proteínas foram superiores estatisticamente nos tratamentos MCP e MAP, quando comparados aos demais tratamentos.

Tabela 1.7– Desempenho de juvenis de camarão (*L. vannamei*) após 52 dias de experimento. Valores expressos em média (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras sobrescritas indicam diferenças significativas ($P < 0,05$; ANOVA seguido de teste de Tukey).

	CTRL-	DCP	MCP	MAP
Peso inicial (g)	5,49 (0,85)	5,44 (0,82)	5,49 (0,78)	5,42 (0,92)
Peso final (g)	16,3 ^a (2,15)	16,0 ^a (2,17)	20,7 ^b (2,46)	21,3 ^b (2,74)
Ganho de peso (%)	196,9 ^a (12,7)	194,9 ^a (14,9)	277,2 ^b (19,2)	292,9 ^b (9,3)
Crescimento (g/semana)	1,43 ^a (0,10)	1,40 ^a (0,12)	2,01 ^b (0,13)	2,10 ^b (0,06)
FCA ¹	2,28 ^a (0,17)	2,24 ^a (0,16)	1,66 ^b (0,11)	1,59 ^b (0,07)
Sobrevivência (%)	87,9 (8,21)	93,2 (6,25)	90,9 (2,47)	95,5 (1,75)
Consumo total de ração (g/tanque)	659,8 ^a (6,99)	697,8 ^b (9,84)	729,2 ^c (16,6)	782,1 ^d (1,98)
TCE ²	2,05 ^a (0,08)	2,04 ^a (0,09)	2,50 ^b (0,10)	2,58 ^b (0,04)
TEP ³	1,17 ^a (0,09)	1,18 ^a (0,09)	1,59 ^b (0,11)	1,66 ^b (0,08)

¹ Fator de conversão alimentar (FCA)= Consumo total de ração/(peso final total-peso inicial total).

² Taxa de crescimento específico (TCE) (% dia⁻¹) = (ln peso final – ln peso inicial)/dias * 100

³ Taxa de eficiência protéica (TEP) (peso total final – peso total inicial)/ total de proteína consumida

O cálculo dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) apontaram diferenças significativas entre os tratamentos testados ($P < 0,05$) (Tabela 1.8). O CDA para a matéria seca e proteína bruta dividiu claramente o experimento em dois grupos, dietas CTRL- e DCP com valores inferiores, e dietas MCP e MAP com valores superiores. Os resultados de cálcio e magnésio foram negativos para todos os tratamentos, o que sugere uma absorção significativa desses minerais a partir de outras fontes, que não as

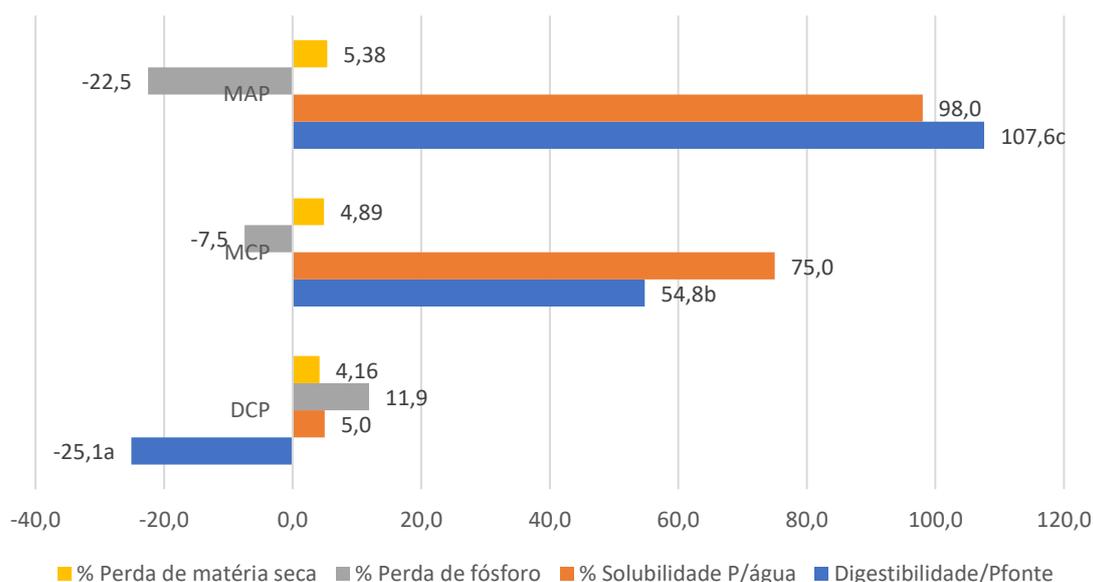
dietas, por exemplo, da água de cultivo. Por outro lado, os valores de CDA para o potássio foram altos, com valores variando de 80 a 87%, com as dietas CTRL- e DCP novamente significativamente inferiores as dietas MCP e MAP. A digestibilidade aparente do fósforo apresentou grandes diferenças entre os tratamentos, com valores inferiores para as dietas DCP (4,88%) e CTRL- (19,6%) sem diferenças significativas entre eles. O tratamento MCP foi significativamente mais eficiente para o CDA do fósforo que as dietas anteriores, com valor médio de 37,9%, porém, foi inferior a dieta MAP, que atingiu o valor médio de 54,5% para a digestibilidade desse mineral. De modo semelhante aos valores obtidos para digestibilidade do cálcio e magnésio, os valores encontrados para matéria mineral também foram negativos, não apresentando diferenças significativas entre os tratamentos, e denotando novamente a absorção de minerais a partir da água de cultivo. Considerando o teor de fósforo total das dietas e a digestibilidade aparente, o fósforo digestível médio foi mais baixo para o tratamento DCP (0,036), seguido pelo Ctrl- (0,099), MCP (0,299) e MAP (0,437), este último significativamente superior aos primeiros. Em uma outra abordagem, considerando apenas a absorção relativa da fonte de fósforo testada, foram encontradas novamente diferenças significativas entre as dietas suplementadas, sendo que a dieta DCP apresentou valores negativos (-27,7%), seguido pela dieta MCP (71,5%) e o mais alto índice alcançado pela dieta MAP (114,0%).

Tabela 1.8 – Digestibilidade aparente das dietas (%), por fontes de fosfatos e fósforo digestível nas dietas teste. Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma coluna com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey)

	CTRL-	DCP	MCP	MAP
<i>Dieta</i>				
Matéria seca	60,7 ^a (1,52)	60,5 ^a (2,58)	66,8 ^b (4,80)	70,5 ^b (2,21)
Proteína bruta	68,9 ^a (2,54)	68,4 ^a (2,86)	73,8 ^b (3,28)	76,4 ^b (1,26)
Cálcio	-117,2 ^{ac} (22,6)	-36,4 ^b (12,7)	-66,1 ^{ab} (36,1)	-151,1 ^c (36,3)
Magnésio	-126,3 (14,8)	-115,4 (16,1)	-96,8 (32,7)	-79,4 (22,7)
Potássio	82,1 ^a (1,07)	80,9 ^a (1,75)	85,8 ^b (2,61)	87,2 ^b (1,13)
Fósforo	19,6 ^a (5,76)	4,88 ^a (1,80)	37,9 ^b (10,7)	54,4 ^c (4,67)
Matéria mineral	-78,7 (5,81)	-70,9 (6,45)	-54,5 (21,7)	-59,3 (17,7)
Fósforo digestível	0,099	0,036	0,299	0,437
<i>Digestibilidade da fonte de fósforo</i>				
P		-27,7 ^a (5,79)	71,5 ^b (30,5)	114,0 ^c (12,7)

Na Figura 1.7 são apresentados dados de quatro diferentes parâmetros referentes as dietas e as formas de fósforo utilizados: a % de perda da matéria seca, % de perda de fósforo, a solubilidade de DCP, MCP e MAP em água e a digestibilidade segundo a fonte de fósforo utilizada nas dietas.

Figura 1.7 – Gráfico comparativo de perda de matéria seca e fósforo nas dietas experimentais submetidos a 30 minutos de processo de lixiviação; valores de solubilidade dos fosfatos inorgânicos, e digestibilidade encontrada de acordo com a fonte inorgânica do fósforo.



Fonte – Figura produzida a partir de dados obtidos no presente estudo.

Os valores de perda de matéria seca variaram de 4,16 a 5,38% entre as dietas, sendo menor para o tratamento DCP e a maior perda no tratamento MAP. A perda de fósforo após 30 minutos de exposição a água refletiu a solubilidade da fonte de fósforo utilizado, sendo que a maior perda ocorreu para a dieta MAP (-22,5%) seguido pela dieta MCP (-7,5%) sendo que as fontes de fósforo inorgânico utilizado nessas dietas possuem uma solubilidade de 98 e 75% respectivamente. De mesmo modo, o fósforo inorgânico DCP que possui baixa solubilidade (5%), apresentou baixo potencial de perda após a exposição em água, tendo inclusive ganho matéria, provavelmente do fósforo presente na água. Por outro lado, a solubilidade menor também foi acompanhada de menores valores de digestibilidade (P_{fonte}), sendo que o DCP de menor solubilidade apresentou valores negativos para digestibilidade desse fósforo, enquanto o fósforo mais solúvel (MAP) apresentou valores superiores a 100%.

Os valores obtidos com a composição de fezes também apresentaram diferenças significativas em alguns dos nutrientes analisados ($P < 0,05$) (Tabela 1.9). A porcentagem de proteína bruta e potássio nas fezes não diferiu entre os 4 tratamentos, com valores bem próximos entre eles. Para os valores de Ca e matéria mineral a dieta CTRL- possuiu valores mais baixos ($P < 0,05$) quando comparado as 3 dietas suplementadas de fosfatos inorgânicos. O menor valor de P foi encontrado também na dieta CTRL-, seguido pela dieta MAP e MCP, sendo o maior valor apresentado pela dieta DCP. Por outro lado, a dieta MAP apresentou o maior valor de magnésio na composição das fezes, sendo que as 3 dietas restantes não diferiram entre si. ($P > 0,05$).

Tabela 1.9 - Composição de matéria fecal de camarões (matéria seca). Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$; ANOVA seguido de teste de Tukey).

	CTRL -	DCP	MCP	MAP
Proteína bruta (%)	33,1 (1,32)	33,4 (0,91)	33,1 (0,69)	34,0 (0,81)
Ca (mg/kg)	14.700 ^a (1.000)	24.225 ^b (1.375)	24.050 ^b (1.300)	22.850 ^b (1.800)
Mg (mg/kg)	7.232 ^a (317)	7.215 ^a (140)	7.935 ^{ab} (257)	8.192 ^b (382)
K (mg/kg)	2.482 (78)	2.507 (57)	2.497 (107)	2.350 (30)
P (mg/kg)	10.485 ^a (665)	18.075 ^b (575)	15.450 ^c (375)	13.100 ^d (500)
Matéria mineral (g/100g)	19,4 ^a (0,68)	22,9 ^b (0,51)	22,7 ^b (0,42)	23,6 ^b (1,05)

A composição corporal (Tabela 1.10) analisada a partir de exemplares inteiros de camarão e do exoesqueleto apresentou variação significativa em certos nutrientes, de acordo com os tratamentos e o nutriente estudado. O teor corporal inicial dos camarões apresentou maiores valores para umidade, matéria mineral ($P < 0,05$), Ca e K, enquanto foi muito inferior para o teor de gordura (50% menor) em comparação aos animais ao final do experimento. Para a proteína bruta não foram encontradas diferenças significativas entre o camarão inicial e os tratamentos testados. Entre os tratamentos, na grande maioria dos parâmetros analisados (umidade, gordura, matéria mineral, Ca, Mg e K) não foram encontradas diferenças significativas, tanto para a análise do tecido corporal, como para a análise do exoesqueleto. Entretanto, a fonte de fósforo se mostrou influente sobre o teor final desse mineral na composição dos camarões e exoesqueleto, com valores mais elevados para as dietas MCP e MAP, e menores para as dietas CTRL- e DCP.

Tabela 1.10 - Composição corporal e do exoesqueleto de juvenis de camarões (matéria seca, exceto para umidade); ao início e após 52 dias de experimento. Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$; ANOVA seguido de teste de Tukey).

	Inicial	CTRL-	DCP	MCP	MAP
<i>Carcaça</i>					
Umidade (%)	77,2 ^a (0,13)	75,1 ^b (0,797)	74,9 ^b (0,442)	74,5 ^b (0,431)	74,4 ^b (0,706)
Proteína bruta (%)	72,1 (0,64)	71,3 (0,665)	71,3 (0,743)	71,8 (0,960)	72,3 (0,947)
Gordura bruta (%)	3,37 ^a (0,09)	7,3 ^b (0,955)	8,11 ^b (0,928)	8,00 ^b (0,451)	7,76 ^b (0,867)
Matéria mineral (%)	15,5 ^a (0,012)	10,9 ^b (0,328)	10,4 ^b (0,674)	10,9 ^b (0,308)	11,3 ^b (0,216)
Cálcio (mg/kg)	25.900	20.175 (1.513)	20.000 (850)	21.575 (525)	21.900 (1.300)
Fósforo (mg/kg)	8.620	7.253 ^a (588)	7.280 ^a (27)	8.680 ^b (113)	9.375 ^b (335)
Magnésio (mg/kg)	2.750	1.885 (145)	1.975 (105)	2.073 (74)	2.113 (71)
Potássio (mg/kg)	11.100	9.308 (793)	9.485 (458)	10.328 (423)	10.393 (308)
<i>Exoesqueleto</i>					
Cálcio (mg/kg)	-	72.650 (8.750)	75.775 (3.475)	75.875 (4.425)	76.500 (1.600)
Fósforo (mg/kg)	-	7.210 ^a (287)	7.310 ^a (465)	9.883 ^b (544)	10.085 ^b (1.108)
Magnésio (mg/kg)	-	2.785 (538)	2.663 (136)	2.835 (148)	2.895 (60)
Potássio (mg/kg)	-	2.075 (373)	1.985 (255)	2.205 (368)	1.805 (250)

(-): não analisado.

A eficiência na retenção de nutrientes (ERN) e de minerais (Tabela 1.11) variou entre 4 tratamentos experimentais para quase todos os parâmetros analisados, sendo somente a ERN para gordura comum a todos os tratamentos. A eficiência na retenção de nutrientes possui grande influência da composição corporal e das dietas, bem como da taxa de conversão alimentar, refletindo esses parâmetros sobre os seus resultados. A retenção de proteína bruta, fósforo, magnésio e potássio foram superiores para as dietas MCP e MAP em comparação ao CTRL- e DCP. A dieta MAP foi superior as demais para as retenções de cálcio e matéria mineral como um todo. A retenção de cinzas foi maior para a dieta MAP, em relação a todas demais, sendo reflexo também de uma maior retenção de cálcio e fósforo para o tratamento MAP em relação a todas demais dietas, e retenção de magnésio superior a DCP e CTRL-, com valor igual ao obtido por MCP. A retenção de cálcio para a dieta DCP foi significativamente inferior a todos os demais tratamentos, fato que pode ser explicado pela elevada concentração (mais de 200% superior as demais) e baixa digestibilidade desse mineral na dieta DCP. A eficiência de retenção de P considerando a fonte de fosfato mostrou MCP e MAP também com valores de eficiência muito superiores ao tratamento DCP com valores de 8 a 9,7 vezes maiores respectivamente.

Tabela 1.11 - Eficiência de retenção de nutrientes (%) para juvenis de camarão (*L. vannamei*). Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).

	CTRL-	DCP	MCP	MAP
<i>Dieta</i>				
Proteína bruta	20,5 ^a (1,94)	21,1 ^a (1,44)	28,8 ^b (1,71)	30,2 ^b (1,45)
Gordura bruta	15,0 (1,96)	18,8 (3,50)	21,7 (2,07)	20,8 (3,33)
Matéria mineral	24,1 ^a (5,07)	18,6 ^a (2,85)	31,8 ^b (3,46)	40,1 ^c (1,81)
Cálcio	78,6 ^a (19,4)	30,3 ^b (3,14)	69,5 ^a (4,54)	135,9 ^c (15,7)
Fósforo	12,8 ^a (0,81)	10,1 ^a (1,27)	18,3 ^b (1,56)	20,0 ^b (1,61)
Magnésio	28,3 ^a (3,22)	27,7 ^a (1,33)	35,1 ^b (1,77)	36,3 ^b (2,52)
Potássio	14,6 ^a (2,69)	15,1 ^a (0,58)	24,0 ^b (1,12)	25,2 ^b (1,93)
<i>Da fonte de fósforo</i>				
P		6,64 ^a (6,81)	53,7 ^b (8,37)	64,8 ^b (8,65)

Experimento 2 – Suplementação de enzimas exógenas

Parâmetros de qualidade de água monitorados durante 50 dias de período experimental são apresentados na Tabela 1.12. Os valores foram sempre mantidos dentro da faixa de melhor crescimento para a espécie, com oxigênio dissolvido sempre acima de 5,3 mg/L, controle dos compostos nitrogenados a partir do bom funcionamento do filtro biológico, e a manutenção de altos valores para alcalinidade, com a adição de bicarbonato de sódio sempre que necessário.

Tabela 1.12 – Qualidade da água monitorado durante 50 dias de experimento com juvenis de *L. vannamei* em sistema de recirculação de água salgada. Valores expressos como média (DP).

Temperatura (°C)	OD (%)	OD (mg/L)	Salinidade (ppm)	Amônia (mg/L)	Nitrito (mg/L)	pH	Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)
30,2 (0,34)	87,5 (2,92)	6,11 (0,26)	34,3 (0,25)	0,13 (0,04)	0,21 (0,48)	7,77 (0,26)	154,4 (10,1)

O desempenho de crescimento e alimentação de juvenis do camarão *L. vannamei* alimentado com dietas controle positivo, negativo e suplementadas com fitase e protease são apresentados na Tabela 1.13. A sobrevivência foi considerada elevada para todos os tratamentos, com valores mínimos de 84,6% para o Ctrl- e máximo de 90,4% para Phy2000+Prot, sem diferenças significativas entre todos os tratamentos. A princípio os valores obtidos com o Ctrl+ e Ctrl- demonstram que as dietas foram bem formuladas, podendo demonstrar o potencial de uma dieta que atenda as exigências (Ctrl+), bem como a deficiência de um componente importante na dieta (Ctrl-) para o camarão, com respectivamente os melhores e piores desempenhos no geral. O peso final, ganho de peso e o crescimento semanal resultaram em valores de desempenho semelhantes para as dietas, sendo o Ctrl+ semelhante estatisticamente apenas ao tratamento MCP+Prot, que também utiliza o fosfato em sua composição, e superior a todos os demais tratamentos ($P < 0,05$). Dentre os tratamentos suplementados, não foram observadas grandes diferenças, sendo notável apenas o bom desempenho da dieta Phy4000, que obteve índices próximos ao da dieta MCP+Prot. No geral pode se considerar que mesmo estando em um patamar abaixo do Ctrl+, as dietas obtiveram um bom crescimento semanal, estando todos com ganhos acima de 1,6 g por semana. O fator de conversão alimentar (FCA) variou de 1,66 (Ctrl+) até 2,34 (Phy2000). Os tratamentos Ctrl+, Phy4000, MCP+Prot e Phy2000+Prot apresentaram os

melhores valores, e não apresentaram diferenças significativas entre si ($P>0,05$) nesse parâmetro.

Tabela 1.13 – Desempenho de juvenis de camarão (*L. vannamei*) após 50 dias de experimento. Valores expressos em média (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$; ANOVA seguido de teste de Tukey).

	Ctrl (+)	Ctrl (-)	Phy2000	Phy4000	MCP+Prot	Phy2000 + Prot	Phy4000 + Prot
Peso inicial (g)	4,63 (0,08)	4,55 (0,10)	4,61 (0,07)	4,66 (0,10)	4,54 (0,52)	4,50 (0,12)	4,68 (0,06)
Peso final (g)	20,4 ^a (1,00)	16,5 ^b (0,29)	16,3 ^b (0,15)	18,2 ^{cd} (0,44)	19,5 ^{ad} (0,97)	17,0 ^{bc} (1,02)	17,2 ^{bc} (0,71)
Ganho de peso (%)	340,8 ^a (15,03)	263,0 ^{bc} (6,98)	252,2 ^b (5,99)	290,5 ^{cd} (15,6)	329,2 ^a (22,2)	276,7 ^{bc} (23,0)	266,7 ^{bc} (17,1)
Crescimento (g/semana)	2,25 ^a (0,13)	1,71 ^{bc} (0,03)	1,66 ^b (0,23)	1,93 ^{cd} (0,71)	2,13 ^a (0,14)	1,78 ^{bc} (0,14)	1,78 ^{bc} (0,10)
FCA	1,66 ^a (0,11)	2,27 ^b (0,14)	2,34 ^b (0,28)	1,99 ^{ab} (0,13)	1,73 ^a (0,06)	1,96 ^{ab} (0,13)	2,13 ^b (0,30)
Sobrevivência (%)	88,2 (5,88)	84,6 (5,02)	85,3 (5,88)	89,7 (5,63)	88,2 (6,79)	90,4 (7,73)	89,0 (11,10)
Consumo total de ração (g/tanque)	756,8 ^a (9,39)	728,0 ^b (10,7)	731,4 ^b (8,34)	759,5 ^a (11,4)	742,7 ^{ab} (7,46)	720,3 ^b (10,6)	755,1 ^{ac} (15,1)
TCE	3,02 ^a (0,07)	2,63 ^{bc} (0,04)	2,56 ^c (0,03)	2,77 ^b (0,08)	2,97 ^a (0,10)	2,70 ^{bc} (0,11)	2,65 ^{bc} (0,09)
TEP	1,54 ^a (0,10)	1,10 ^b (0,07)	1,06 ^b (0,11)	1,30 ^{bc} (0,17)	1,43 ^{ac} (0,05)	1,25 ^{bc} (0,08)	1,16 ^b (0,15)

¹ Fator de conversão alimentar (FCA)= Consumo total de ração/(peso final total-peso inicial total).

² Taxa de crescimento específico (TCE) (% dia⁻¹) = (ln peso final – ln peso inicial)/dias *100

³ Taxa de eficiência protéica (TEP) (peso total final – peso total inicial)/ total de proteína consumida

O consumo de ração foi ajustado periodicamente pelo apetite do camarão, e apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Os tratamentos de maior consumo (Ctrl+, MCP+Prot, Phy4000), são também os de melhor fatores de conversão alimentar (FCA), denotando que esse consumo a mais era realmente aproveitado, bem como, os tanques com menor consumo foram que obtiveram relativamente os piores FCAs, justificando o menor apetite e aproveitamento observado. De mesmo modo que os demais indicadores, a taxa de crescimento específico e a taxa de aproveitamento de proteínas foram superiores para o tratamento Ctrl+, com bons valores observados também para as dietas MCP+Prot e Phy4000.

O cálculo dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) apontaram diferenças significativas entre os tratamentos testados ($P<0,05$) (Tabela 1.14). No geral os melhores valores de digestibilidade foram obtidos com o tratamento Ctrl+, estando próximo desses valores também o tratamento MCP+Prot. A inclusão de fitase no nível de 2000FYT (Phy2000) não pareceu surtir efeito sobre a digestibilidade dos nutrientes

utilizados, estando sempre significativamente inferior ao Ctrl+, e similar ao Ctrl-. Por outro lado, o outro nível de fitase testado, e as inclusões de fitase e protease trouxeram os níveis de digestibilidade para um patamar próximo ao Ctrl+, sem diferenças significativas para os CDAs de proteína, fósforo, magnésio e matéria mineral na grande maioria dos tratamentos. Diferente dos demais nutrientes analisados, a digestibilidade do potássio não pareceu sofrer influência das dietas utilizadas, com valores próximos a 90% para todos os tratamentos, sem diferenças significativas entre eles.

Tabela 1.14 – Digestibilidade aparente nas dietas teste (%). Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma coluna com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).

Diet	Matéria seca	Proteína bruta	P	Mg	K	Matéria mineral
<i>Ctrl+</i>	67,0 ^a (3,32)	73,2 ^a (3,34)	49,15 ^{ab} (6,17)	-48,9 ^a (23,7)	90,9 (1,94)	-28,3 ^{ac} (14,7)
<i>Ctrl-</i>	59,4 ^b (1,93)	67,6 ^b (1,03)	41,9 ^b (3,98)	75,2 ^{ab} (14,6)	89,3 (1,51)	-56,6 ^{bc} (12,5)
<i>Phy2000</i>	59,5 ^b (2,43)	67,1 ^b (0,94)	40,6 ^b (5,13)	-96,0 ^b (13,5)	88,2 (1,19)	-57,9 ^b (13,4)
<i>Phy4000</i>	60,2 ^b (1,43)	69,7 ^{ab} (2,33)	50,35 ^{ab} (5,29)	-71,4 ^{ab} (12,9)	89,5 (0,62)	-55,5 ^{bc} (16,0)
<i>MCP+Prot</i>	65,6 ^{ac} (1,55)	73,7 ^a (1,48)	49,40 ^{ab} (6,19)	-52,5 ^a (14,4)	90,9 (0,74)	-21,2 ^a (11,8)
<i>Phy2000+Prot</i>	61,1 ^{bc} (0,91)	68,0 ^b (1,21)	46,31 ^{ab} (3,24)	-65,4 ^{ab} (11,1)	90,5 (0,77)	-32,1 ^{abc} (12,5)
<i>Phy4000+Prot</i>	63,2 ^{abc} (1,12)	71,4 ^{ab} (1,08)	53,95 ^a (5,13)	-67,3 ^{ab} (22,8)	90,5 (1,42)	-43,1 ^{abc} (6,39)

A composição analisada a partir de exemplares inteiros de camarão e do exoesqueleto (Tabela 1.15) apresentou variação significativa em alguns dos nutrientes estudados, de acordo com os tratamentos submetidos. Para a composição de umidade, proteína bruta e matéria mineral do exoesqueleto não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. O teor de gordura foi superior para os animais alimentados com o Ctrl+ quando comparados aos tratamentos suplementados de fitase e protease, porém entre os demais tratamentos os valores foram semelhantes estatisticamente. Diferente do esperado, a matéria mineral do Ctrl+ não diferiu do Ctrl-, sendo superior estatisticamente para os tratamentos MCP+Prot e Phy4000+Prot quando comparados ao Ctrl-. Por outro lado, o teor de fósforo corporal e do exoesqueleto apresentou clara diferença entre os Ctrl+ e Ctrl-, sendo superiores os valores encontrados na dieta referência (Ctrl+). É possível verificar ainda uma tímida

influência da suplementação de fitase sobre o teor desse mineral nos camarões, principalmente nas dietas com concentração mais elevada dessa enzima.

Tabela 1.15 - Composição corporal e do exoesqueleto de juvenis de camarões (matéria seca, exceto para umidade); após 50 dias de experimento. Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$; ANOVA seguido de teste de Tukey).

	<i>Ctrl+</i>	<i>Ctrl-</i>	<i>Phy2000</i>	<i>Phy4000</i>	<i>MCP+Prot</i>	<i>Phy2000+Prot</i>	<i>Phy4000+Prot</i>
Carcaça							
Umidade (%)	73,3 (0,77)	74,9 (1,24)	74,5 (0,50)	73,3 (0,48)	73,5 (0,77)	73,4 (1,00)	74,0 (0,65)
Proteína bruta (%)	70,3 (1,81)	69,2 (1,36)	68,3 (1,80)	68,4 (2,17)	68,1 (1,36)	68,3 (1,03)	68,7 (1,72)
Gordura (%)	9,21 ^a (0,93)	8,64 ^{ab} (0,29)	8,95 ^{ab} (0,15)	8,42 ^{ab} (0,46)	8,74 ^{ab} (0,16)	8,06 ^b (0,22)	8,11 ^b (0,29)
Matéria mineral (%)	10,5 ^{ab} (0,18)	10,4 ^a (0,48)	10,8 ^{ab} (0,30)	10,2 ^a (0,21)	11,2 ^b (0,49)	10,3 ^a (0,15)	11,2 ^b (0,87)
P (mg/kg)	10.317 ^a (240)	7.540 ^b (270)	7.689 ^{bc} (150)	8.481 ^d (580)	9.767 ^a (240)	7.010 ^b (400)	8.382 ^{cd} (130)
Exoesqueleto							
Matéria mineral (%)	19,2 (0,58)	18,9 (0,62)	18,7 (0,14)	19,3 (0,71)	19,4 (0,39)	19,2 (0,45)	19,4(0,41)
P (mg/kg)	10.717 ^a (80)	8.020 ^b (180)	8.100 ^b (100)	8.480 ^{bc} (100)	10.150 ^{ad} (0,93)	9.233 ^{cd} (550)	8.631 ^{bc} (280)

A eficiência na retenção de nutrientes (ERN, Tabela 1.16) variou entre os tratamentos experimentais para todos os parâmetros analisados. Para proteína os valores de retenção foram superiores para as dietas *Ctrl+* e *MCP+Prot*. Dentre os demais tratamentos não houve diferença significativa, entretanto é possível notar uma sensível melhora na retenção para os tratamentos suplementados, com exceção de *Phy2000*. A retenção de gordura foi também superior para o *Ctrl+*, seguido pelo tratamento *MCP+Prot*, e sem nenhuma influência da adição das enzimas. Para o fósforo a retenção foi novamente superior para o *Ctrl+*, porém, a retenção deste mineral foi claramente afetada positivamente pela adição de enzimas, principalmente para as duas dietas com nível mais elevado de fitase (*Phy4000* e *Phy4000+Prot*), com valores que se assemelham ao obtido com o tratamento *MCP+Prot*. A retenção de matéria mineral também demonstrou ser influenciada pela presença de enzimas nas dietas, sendo que o tratamento *Phy4000+Prot* foi superior ao *Ctrl-*, e os demais, apesar de não diferirem significativamente desse controle negativo, estiveram mais próximos em valores ao controle positivo, também sem diferença estatística a este.

Tabela 1.16 - Eficiência de retenção de nutrientes (%) para juvenis de camarão (*L. vannamei*). Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma coluna com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).

Dieta	Proteína	Gordura	P	Matéria mineral
<i>Ctrl+</i>	31,0 ^a (1,79)	21,9 ^a (1,46)	22,9 ^a (1,54)	30,4 ^{ab} (2,36)
<i>Ctrl-</i>	20,7 ^b (1,84)	13,5 ^b (1,59)	13,7 ^b (1,85)	21,71 ^c (3,13)
<i>Phy2000</i>	21,0 ^{bc} (0,38)	15,1 ^b (0,54)	15,0 ^{bc} (0,62)	25,3 ^{bc} (1,12)
<i>Phy4000</i>	24,8 ^{cd} (1,86)	15,8 ^b (0,66)	19,6 ^d (0,86)	26,5 ^{abc} (1,12)
<i>MCP+Prot</i>	27,5 ^{ad} (2,15)	18,7 ^c (1,11)	19,4 ^d (1,16)	31,6 ^a (2,08)
<i>Phy2000+Prot</i>	24,6 ^{bcd} (2,06)	14,1 ^b (1,45)	15,4 ^{bc} (1,75)	27,0 ^{abc} (3,13)
<i>Phy4000+Prot</i>	24,2 ^{bcd} (1,80)	14,1 ^b (1,14)	18,0 ^{cd} (1,51)	29,1 ^{ab} (2,6)

Experimento 3 – Níveis de inclusão de fitase

Assim como nos demais experimentos, a qualidade da água foi diariamente monitorada durante o período de 42 dias (Tabela 1.17). O sistema de recirculação de água se mostrou constante nesse período, com mínimas variações na temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido e pH, geralmente abaixo de uma unidade de medida para cada um desses parâmetros. As concentrações de compostos nitrogenados na água foram mantidas baixas durante todo o período, bem como valores de pH foi sempre mantida a níveis adequados para o desenvolvimento da espécie.

Tabela 1.17 – Qualidade da água monitorada durante 42 dias de experimento com juvenis de *L. vannamei* em sistema de recirculação de água salgada. Valores expressos como média (DP).

Temperatura (°C)	OD (%)	OD (mg/L)	Salinidade (ppm)	Amônia (mg/L)	Nitrito (mg/L)	pH	Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)
30,0 (0,37)	90,7 (5,32)	6,45 (0,54)	34,4 (0,23)	0,13 (0,1)	0,30 (0,14)	7,66 (0,25)	133,3 (25,2)

O desempenho de crescimento e alimentação de juvenis do camarão *L. vannamei* alimentado com dietas controle positivo, negativo e suplementadas com fitase e protease são apresentados na Tabela 1.18. Foram utilizados novamente tratamentos controle positivo e negativo a fim de atestar a capacidade geral da dieta e do sistema de cultivo (*Ctrl+*), e também verificar a perda de desempenho causado pela

retirada/diminuição de um nutriente importante, o fósforo no caso (Ctrl-). Os resultados deixam claro a influência do nível de fósforo nessas dietas, sendo os tratamentos Ctrl+ e Ctrl- o melhor e o pior respectivamente, em todos os quesitos de desempenho estudados. No geral, o tratamento Ctrl+ foi superior a todos os demais, não sendo estatisticamente superior apenas para o FCA, no qual se assemelhou a dieta Phy16000, e a sobrevivência e o consumo total de ração, parâmetros nos quais se assemelhou a todas as dietas suplementadas. Ao analisarmos a partir do controle negativo, podemos notar uma clara melhora nos indicadores de desempenho a partir da suplementação com níveis de fitase, principalmente a partir da inclusão de 6000 FYT/kg ou mais. O peso final, ganho de peso, crescimento semanal, taxa de crescimento específico e de eficiência protéica foram significativamente superiores para as dietas Phy6000, Phy8000 e Phy16000 quando comparadas ao Ctrl-. A sobrevivência neste teste esteve abaixo do obtido nos dois experimentos anteriores (exceto Ctrl+ e Phy16000), com valores próximos a 75%, porém não abaixo do encontrado usualmente para a espécie.

A sobrevivência mais baixa, com algumas mortes já na parte final do experimento acabou por afetar também o FCA, que leva em conta o consumo e a biomassa final como um todo, tendo a perda de alguns indivíduos de tamanho grande influenciado, principalmente nos tratamentos suplementados de fitase a níveis de 2000 até 8000 FYT/kg, que obtiveram um consumo equivalente ao Ctrl+ e ao Phy16000, porém com sobrevivência e, conseqüentemente, biomassa final, inferiores.

Tabela 1.18 – Desempenho de juvenis de camarão (*L. vannamei*) após 42 dias de experimento. Valores expressos em média (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$; ANOVA seguido de teste de Tukey).

Dieta	Ctrl+	Ctrl-	Phy2000	Phy4000	Phy 6000	Phy 8000	Phy 16000
Peso inicial (g)	4,37 (0,26)	4,41 (0,11)	4,36 (0,09)	4,31 (0,13)	4,42 (0,05)	4,31 (0,13)	4,33 (0,07)
Peso final (g)	18,0 ^a (0,45)	13,2 ^b (0,29)	14,1 ^{bc} (0,90)	14,3 ^{bcd} (0,23)	15,6 ^e (0,38)	15,1 ^{cde} (0,61)	15,4 ^{de} (0,22)
Ganho de peso (%)	311,6 ^a (8,51)	198,3 ^b (4,05)	224,3 ^{bc} (21,2)	232,5 ^{cd} (15,1)	252,8 ^d (11,7)	249,1 ^{cd} (7,99)	256,8 ^d (1,14)
Crescimento (g/semana)	2,27 ^a (0,07)	1,46 ^b (0,03)	1,63 ^{bc} (0,15)	1,67 ^{cd} (0,05)	1,86 ^e (0,07)	1,80 ^{cde} (0,08)	1,85 ^{de} (0,02)
FCA	1,45 ^a (0,11)	2,91 ^b (0,50)	2,59 ^b (0,49)	2,42 ^{bc} (0,30)	2,23 ^{bc} (0,20)	2,43 ^{bc} (0,10)	1,71 ^{ac} (0,70)
Sobrevivência (%)	91,2 ^{ab} (4,80)	76,5 ^c (7,60)	78,7 ^{cb} (6,95)	79,4 ^{cb} (4,15)	78,7 ^{cb} (5,02)	75,0 ^c (2,94)	93,1 ^a (3,40)
Consumo total de ração (g/tanque)	594,8 ^a (5,77)	546,6 ^b (15,1)	579,0 ^a (12,6)	575,6 ^a (6,70)	593,1 ^a (6,07)	577,3 ^a (9,77)	587,1 ^a (2,74)
TCE	3,36 ^a (0,5)	2,60 ^b (0,34)	2,80 ^{bc} (0,16)	2,86 ^{cd} (0,11)	3,00 ^{cd} (0,08)	2,98 ^{cd} (0,51)	3,03 ^d (0,01)
TEP	1,74 ^a (0,13)	0,98 ^b (0,05)	1,12 ^{bc} (0,13)	1,15 ^{bc} (0,02)	1,30 ^{cd} (0,04)	1,26 ^d (0,09)	1,50 ^d (0,06)

¹ Fator de conversão alimentar (FCA)= Consumo total de ração/(peso final total-peso inicial total).

² Taxa de crescimento específico (TCE) (% dia⁻¹) = (ln peso final – ln peso inicial)/dias *100

³ Taxa de eficiência protéica (TEP) (peso total final – peso total inicial)/ total de proteína consumida

Assim como os resultados obtidos com o desempenho, o cálculo dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) (Tabela 1.19) apontaram resultados significativamente ($P < 0,05$) melhores para o controle positivo em comparação ao negativo em quase todos os nutrientes analisados se destacando o CDA de matéria seca, proteína bruta e fósforo. Os valores de digestibilidade para o magnésio e matéria mineral foram negativos, apontando mais uma vez a absorção desses minerais por outras fontes que não as rações, no caso, diretamente da água de cultivo. A inclusão de fitase nas dietas aponta de maneira clara uma evolução na digestibilidade dos nutrientes, em relação ao Ctrl-, principalmente a partir do nível de inclusão de 6000 FYT/kg. O fósforo, principal nutriente abordado no estudo, apresenta uma evolução no CDA de 41,7% para dieta Ctrl- chegando a até 52,9% para as dietas Phy6000 e Phy16000, valores significativamente maiores que o Ctrl-, e semelhantes estatisticamente ao Ctrl+.

Tabela 1.19 – Digestibilidade aparente das dietas (%). Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas (P < 0,05; ANOVA seguido de teste de Tukey).

	<i>Ctrl+</i>	<i>Ctrl-</i>	<i>Phy2000</i>	<i>Phy4000</i>	<i>Phy 6000</i>	<i>Phy 8000</i>	<i>Phy 16000</i>
Matéria seca	67,5 ^a (2,74)	58,1 ^b (2,37)	59,1 ^{bcd} (3,11)	58,2 ^{bc} (1,83)	64,4 ^{ad} (0,19)	64,0 ^{ad} (2,98)	63,6 ^{acd} (1,24)
Proteína bruta	76,9 ^a (2,20)	68,1 ^b (1,94)	69,9 ^{bc} (1,66)	69,6 ^{bc} (2,06)	72,8 ^{ac} (0,75)	72,4 ^c (2,11)	72,2 ^{bc} (1,24)
P	58,7 ^a (5,28)	41,7 ^b (7,51)	40,2 ^b (4,24)	44,6 ^{bc} (2,22)	52,9 ^{ac} (0,45)	49,0 ^{abc} (3,74)	52,9 ^{ac} (5,12)
Mg	-39,4 ^a (10,1)	-66,3 ^{ac} (16,8)	-106,4 ^b (31,3)	-88,6 ^{bc} (4,45)	-60,0 ^{ac} (9,63)	-59,6 ^{ac} (15,2)	-56,6 ^{ac} (17,6)
K	91,2 ^a (0,77)	89,8 ^{ab} (1,09)	87,6 ^b (2,02)	88,8 ^{ab} (0,72)	90,2 ^a (0,73)	90,7 ^a (0,83)	90,7 ^a (0,65)
Matéria mineral	-40,7 ^a (11,8)	-103,3 ^b (16,3)	-101,2 ^b (12,0)	-94,3 ^{bc} (8,60)	-48,7 ^{ac} (46,3)	-63,9 ^{abc} (14,4)	-66,5 ^{abc} (17,6)

A composição química e mineral de camarões e exoesqueleto (Tabela 1.20) apresentou variação significativa em alguns dos nutrientes estudados, de acordo com os tratamentos submetidos. Assim como no segundo experimento a composição de umidade, proteína bruta e matéria mineral do exoesqueleto foi similar para todos os tratamentos, indicando que esses parâmetros se mantêm mais conservativos, independente dos teores de disponibilidade de fósforo utilizados. A suplementação de fitase, apesar de ter aumentado o teor de fósforo no corpo dos camarões, não foi estatisticamente superior ao grupo *Ctrl-*, e foi inferior ao *Ctrl+*. Por outro lado, níveis mais elevados de fitase foram efetivos no aumento do teor de fósforo no exoesqueleto, principalmente nos níveis 8000 e 16000, embora que, ainda inferior ao *Ctrl+*. O conteúdo de gordura corporal também pareceu ter um incremento relativo em função da adição de níveis de fitase, principalmente ao nível máximo de 16000 FYT/kg.

Tabela 1.20 - Composição corporal e do exoesqueleto de juvenis de camarões (matéria seca, exceto para umidade); ao início e após 42 dias de experimento. Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma linha com diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$; ANOVA seguido de teste de Tukey).

	<i>Ctrl+</i>	<i>Ctrl-</i>	<i>Phy2000</i>	<i>Phy4000</i>	<i>Phy6000</i>	<i>Phy8000</i>	<i>Phy16000</i>
Carcaça							
Umidade (%)	75,1 (1,79)	77,1 (0,41)	77,6 (0,72)	76,2 (2,00)	76,6 (1,14)	76,7 (0,86)	75,3 (0,91)
Proteína bruta (%)	70,4 (1,61)	71,8 (2,04)	72,3 (1,91)	73,4 (1,67)	72,5 (2,02)	73,3 (1,50)	72,4 (0,82)
Gordura (%)	6,14 ^{ac} (0,51)	5,33 ^b (0,22)	5,55 ^{ab} (0,17)	5,73 ^{ab} (0,47)	5,66 ^{ab} (0,38)	6,09 ^{ab} (0,24)	6,48 ^c (0,17)
Matéria mineral (%)	10,4 (0,19)	10,7 (0,22)	10,4 (0,49)	11,9 (1,43)	11,3 (0,60)	10,3 (0,60)	10,5 (0,87)
P (mg/kg)	9.590 ^a (650)	7.130 ^b (90)	7.520 ^b (390)	7.420 ^b (310)	7.510 ^b (120)	7.800 ^b (140)	8.030 ^b (490)
Exoesqueleto							
Matéria mineral (%)	17,7 (1,97)	17,6 (2,20)	17,4 (0,91)	19,2 (1,44)	19,7 (0,90)	19,1 (0,58)	19,8 (1,35)
P (mg/kg)	10.400 ^a (170)	7.720 ^b (230)	7.860 ^b (130)	7.840 ^b (540)	8.250 ^{bc} (190)	8.940 ^c (510)	8.770 ^c (530)

A eficiência na retenção de nutrientes (ERN, Tabela 1.21) variou entre os tratamentos experimentais para todos os parâmetros analisados. O tratamento Ctrl+ foi estatisticamente superior ao Ctrl- para os quatro parâmetros de retenção testados, com um valor médio de 100% a mais de retenção na dieta Ctrl+ em relação ao Ctrl-. De maneira semelhante aos demais pontos analisados nesse experimento, a suplementação de fitase pareceu influenciar positivamente o desempenho dos camarões, com valores de retenção sendo melhorado com as adições dessa enzima, apesar desta ainda não apresentar a mesma eficiência trazida pela adição do fosfato inorgânico. Entre esses dados, podem se destacar o aumento de mais de 100% de retenção para a gordura e o fósforo na dieta Phy16000 em relação ao Ctrl-, sendo estatisticamente superior nos dois parâmetros.

Tabela 1.21 - Eficiência de retenção de nutrientes (%) para juvenis de camarão (*L. vannamei*). Valores expressos em médias (DP) (n=4). Médias na mesma coluna com diferentes letras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$; ANOVA seguido de teste de Tukey).

Dieta	Proteína	Gordura	P	Matéria mineral
<i>Ctrl+</i>	32,4 ^a (5,43)	22,9 ^a (3,76)	19,4 ^a (3,14)	29,8 ^a (5,60)
<i>Ctrl-</i>	17,4 ^b (1,30)	8,64 ^b (0,70)	8,27 ^b (0,73)	15,5 ^b (1,43)
<i>Phy2000</i>	19,2 ^b (3,18)	9,70 ^b (1,65)	11,5 ^{bc} (2,14)	17,3 ^{bc} (3,60)
<i>Phy4000</i>	21,9 ^b (1,93)	12,8 ^{bc} (1,80)	12,5 ^{bc} (1,94)	25,2 ^{acd} (3,78)
<i>Phy 6000</i>	22,0 ^{bc} (1,18)	10,6 ^{bc} (1,00)	13,4 ^c (1,30)	23,7 ^{acd} (2,33)
<i>Phy 8000</i>	23,0 ^{bc} (3,22)	15,2 ^c (2,00)	15,9 ^{ac} (2,30)	21,3 ^{bcd} (3,46)
<i>Phy 16000</i>	28,8 ^{ac} (0,64)	21,4 ^a (0,55)	19,3 ^a (0,51)	27,7 ^{ad} (0,76)

DISCUSSÃO

Experimento 1 – Fosfatos inorgânicos

Camarões alimentados com a dieta controle contendo $4,39 \text{ g/kg}^{-1}$ de fósforo total, e também aqueles alimentados com a dieta DCP, apresentaram comportamento errático, visualmente mais agitados que camarões dos tratamentos MCP e MAP, sendo constantemente vistos se alimentando de restos de exúvia no fundo dos tanques, esse comportamento pode indicar a tentativa de suprir algum nutriente na dieta oferecida. Moss, Divakaran e Kim (2001) relataram o aumento da enzima quitinase (ligada a digestão de exúvia) em camarões mantidos em água clara, esses camarões se alimentavam desse substrato para suprir parcialmente as deficiências dietéticas de minerais, que não podiam obter a partir da água.

São descritos 15 minerais essenciais para o camarão (DAVIS; LAWRENCE, 1997; TACON, 2015), dentre esses, os quatro macros minerais que são analisados mais detalhadamente no presente trabalho, o fósforo, magnésio, potássio e cálcio. Além de possuir a exigência de minerais como todos animais de cultivo, os camarões possuem ainda um requisito extra de minerais, inerente a todos os crustáceos, que está relacionado ao processo de mudas e formação de novos exoesqueletos (exúvias). Esse processo é responsável pelo gasto de aproximadamente 10% da energia metabolizada em camarões (ZHU et al., 2004; COELHO et al., 2019), além de exigir uma constante absorção de minerais para realização (DALL et al., 1990; CHANG; MYKLES, 2011; LEMOS; WEISSMAN, 2020). Dentre esses quatro macros minerais, dois deles, o cálcio e o magnésio, podem ser absorvidos diretamente da água de cultivo, quando em condições marinhas de alta salinidade, por exemplo (DAVIS; LAWRENCE; GATLIN, 1993; CHENG et al., 2005). No presente estudo essa condição foi confirmada, uma vez que os valores obtidos para a digestibilidade aparente do cálcio e magnésio foram negativos, indicando uma outra fonte de absorção que não as dietas oferecidas, no caso a própria água de cultivo. Por outro lado, as necessidades de potássio e fósforo para camarões devem ser atendidas através das dietas (CHENG et al., 2006; KOSHIO; DAVIS, 2011).

Estudos atestam que a exigência do fósforo nas dietas está intimamente ligada também ao teor de cálcio nessa dieta, em uma relação Ca/P, conforme verificado para

diversas espécies de camarões, como *Penaeus monodon* (PEÑAFLORES, 1999), *Fenneropenaeus indicus* (AMBASANKAR; ALI, 2002), *Marsupenaeus japonicus* (KITABAYASHI et al., 1971), e também para a espécie do presente estudo, o *L. vannamei* (DAVIS; LAWRENCE; GATLIN, 1993; CHENG et al., 2006). Devido a essa dependência do nível de cálcio dietético, os níveis recomendados de fósforo para juvenis de *L. vannamei* possuem uma grande faixa de variação, que vai de 0,34 a 2,2% de fósforo total na dieta (DAVIS; LAWRENCE; GATLIN, 1993; HUANG; WANG, 2004; NIU et al., 2008), aumentando conforme os níveis de cálcio aumentam. Teores de fósforo digerível de 0,6 a 0,8% têm sido geralmente utilizados nas formulações de dietas práticas para o *L. vannamei* (CHENG et al., 2006), valores estes, acima do fósforo total utilizado na dieta controle do presente trabalho (0,5% P total), formulado propositalmente para fornecer níveis de fósforo abaixo da necessidade para a espécie. De mesmo modo, o nível de fósforo utilizados nos tratamentos testados foram menores do que os valores encontrados atualmente na literatura para o camarão, inclusive em dietas formuladas com restrição desse mineral para a espécie (QIU; DAVIS, 2017; ZHAO et al., 2017), e pode ajudar a explicar os diferentes valores de digestibilidade aparente encontrados na literatura e no presente trabalho, uma vez que estes estão diretamente ligados ao teor das dietas formuladas e a necessidade real de cada espécie para o nutriente. Dado os bons resultados com o desempenho dos camarões no presente estudo, os níveis de fósforo utilizados podem ser definidos como um patamar base para formulações de dietas limitadas nesse mineral, neste caso devem se considerar também baixos níveis de cálcio, para manutenção da relação Ca/P.

No geral, os desempenhos obtidos com os tratamentos, inclusive com o controle negativo, podem ser considerados muito bons para a espécie, superiores ao encontrado anteriormente em condições semelhantes de cultivo (CARVALHO et al., 2016; RAGGI 2016). Os dados mostram um ótimo desempenho e digestibilidade adequada para os tratamentos MCP e MAP, indicando que os requisitos de fósforo podem ser satisfeitos entre 0,3 a 0,4% de P digestível em *L. vannamei*, cerca de metade dos valores descritos na literatura (CHENG et al., 2006), considerando para isso uma razão Ca/P = 0,32 a 0,58 (dietas MAP e MCP respectivamente). Embora inferior significativamente em relação as dietas MCP e MAP, o desempenho dos camarões com a dieta controle e a dieta DCP

pode ser considerado surpreendente, e pode ser explicado por alguma recuperação de fósforo e outros minerais a partir da ingestão de exúvias (MOSS; DIVAKARAN; KIM, 2001) retratada nesses tratamentos. Por outro lado, o potássio que é outro macro mineral que deve ser oferecido aos animais a partir da dieta (ROY et al., 2007), apresentou menos variação entre os tratamentos experimentais (entre 0,54 e 0,58% de K digerível nas dietas), sendo compatível com os valores recomendados para espécies de camarão (KANAZAWA; TESHIMA; SASAKI, 1984; SHIAU; HSIEH, 2001), resultando em uma digestibilidade aparente similar entre todos os tratamentos testados. Esse resultado corrobora com o fato que a digestibilidade e exigência desse mineral não parece estar ligado aos níveis de cálcio e outros minerais presentes nas dietas (TACON, 1987), sendo as formulações, e portando as fontes de K nas dietas as mesmas, esse resultado era esperado.

A diferença de desempenho devido à disponibilidade de fósforo dietético foi detectada no desempenho de juvenis de camarões. Dietas onde este mineral esteve mais disponível (MCP E MAP) produziram um ganho de peso final de 4 vezes o inicial, enquanto para as dietas controle e DCP esse crescimento esteve abaixo de 3 vezes do tamanho inicial. O aumento do crescimento proporcionado pelas dietas MCP e MAP foram também acompanhadas de um aumento no consumo de ração e melhoria na conversão alimentar. Nas dietas controle e DCP, apesar de haver um menor consumo de ração, estas resultaram em uma conversão inferior de dieta em biomassa (FCA mais alto), deixando claro que a pior performance no crescimento não esteve ligada a falta de alimento, e sim a redução de fósforo total (dieta controle), fósforo digerível (dieta DCP) e a conversão de ração em biomassa nas duas dietas. Estudos sobre a utilização de MAP em dietas para camarões são ainda muito escassos, porém, estudos com outras espécies de animais aquáticos cultivados demonstram que esse fosfato pode ser empregado com sucesso na suplementação de dietas (MORALES et al., 2018; MILIÁN-SORRIBES et al., 2021), com melhoras no desempenho e na redução de efluentes minerais. A suplementação de MCP também foi testada com resultados positivos em dietas para peixes, como a truta-arco-íris (HERNÁNDEZ; SATOH; KIRON, 2005) e a carpa-comum (KIM et al., 1998) resultando em ganhos significativos sobre o peso final e a eficiência alimentar.

Em estudo com *L. vannamei* (peso inicial e final de 0,16 g e 6,33 g), Pan et al. (2005) suplementaram dietas práticas com níveis crescentes de MCP, indicando o seu uso a níveis de suplementação de 1,3 a 1,7% em dietas, baseado no ganho de peso e taxas de conversão alimentar obtidos no estudo. Esses valores de suplementação estiveram acima do utilizados no atual experimento para MCP (1,03%), porém, a comparação direta é difícil visto as diferentes faixas de peso trabalhadas.

O uso de ingredientes vegetais é cada vez maior e mais necessário na indústria de alimentos para animais aquáticos (PEZZATO; BARROS; FURUYA, 2009), porém, esses ingredientes são muitas vezes fontes limitadas de minerais, como o fósforo, e a necessidade de suplementação mineral tende a aumentar junto (CUZON; GUILLAUME, 1999; NRC, 2011; LEMOS; TACON, 2017). Para juvenis de *L. vannamei* o uso de MCP e MAP, nos níveis de suplementação atualmente testados podem ser recomendados para a espécie, baseados no ótimo desempenho zootécnico e bons resultados com a digestibilidade. Muito embora, o uso desses suplementos deva ser recomendado com cautela e baseado nos tipos de criação, por exemplo com a presença ou não de alimento natural (TACON et al., 2002). Deve se levar em conta ainda, que esses fosfatos monobásicos da mesma forma que são altamente disponíveis, são também relativamente altamente solúveis em água, com alto potencial de lixiviação, sugere-se cultivos onde o alimento fique por um tempo mínimo imerso em água, para se evitar essa lixiviação (OBALDO; DIVAKARAN; TACON, 2002; SMITH; TABRETT, 2004; DIAS et al., 2009), como o que foi visto no presente trabalho, onde o intervalo de tempo entre a queda do alimento na água e a total ingestão (desaparecimento) não passou de 5 minutos, graças à alimentação contínua e dosada pelo alimentador automático.

Como para a maioria dos animais cultivados, o suprimento de nutrientes e em especial o fósforo nas dietas deve ser ajustado ao mínimo exigido, a fim de evitar a assimilação reduzida e a descarga desses nutrientes no ambiente (PIEDAD-PASCUAL, 1989). Apesar da escassez de trabalhos com suplementação de fosfatos inorgânicos para camarões, podemos fazer algumas comparações com base nos poucos estudos relatados. Davis e Arnold (1994) descreveram a baixa contribuição de DCP como fonte de fósforo disponível para camarão, fato novamente verificado no presente estudo, embora essa fonte seja ainda hoje muito empregada na fabricação de rações comerciais.

Além disso, o DCP foi responsável por uma diminuição geral do aproveitamento dos demais nutrientes na dieta, estando provavelmente ligado ao teor de cálcio nesse suplemento, elevando a razão Ca/P para 0,90, um valor 0,4 mais elevado que a dieta controle.

A literatura mostra que a suplementação de fosfatos monobásicos é a mais adequada em dietas para camarões, baseado no aumento da digestibilidade desses fosfatos em comparação ao DCP (DAVIS; LAWRENCE; GATLIN, 1993; KOSHIO; DAVIS, 2011), e atualmente confirmada com os dois fosfatos monobásicos utilizados, MCP e MAP. A digestibilidade do fósforo total nas dietas testadas, indiferente do fosfato adicionado, é limitada até certo ponto pelos altos níveis de fósforo fítico, uma forma indisponível de P para peixes e camarões, e que representam muitas vezes mais de 60% do fósforo total provenientes de ingredientes vegetais (CAO et al., 2007). Os valores obtidos com a digestibilidade de fósforo para o tratamento suplementado com MCP demonstram compatibilidade com resultados obtidos com a mesma espécie em dietas a base de ingredientes vegetais (QIU; DAVIS, 2017). Os valores de digestibilidade obtidos com a dieta suplementada de MAP sugerem um benefício potencial do uso desse fosfato em relação ao MCP, e embora esse benefício não tenha sido traduzido em melhor desempenho de crescimento, a análise do conteúdo fecal demonstrou que o seu uso pode ser indicado, visando a diminuição da carga de fosfatos no ambiente de cultivo.

O teor de fósforo do corpo inteiro e no exoesqueleto dos camarões possui grande influência segundo a disponibilidade desse mineral presente nas dietas (CHENG et al., 2006). Os valores obtidos destacaram a maior assimilação para os tratamentos MCP e MAP, quando comparado as dietas controle e DCP. Em contraste, o teor corporal dos camarões foi semelhante em proteína bruta, superior em gordura, mas inferior em matéria mineral (44% menos), cálcio (50% menos) e fósforo (35 a 50% menos) em comparação a juvenis de *L. vannamei* alimentados com dietas ricas em farinha de peixe e com alto teor de minerais (NIU et al., 2008). Por outro lado, o teor de matéria mineral encontrado no exoesqueleto dos camarões alimentados com MCP e MAP foi mais alto do que níveis relatados anteriormente em dietas suplementadas com MCP e fosfato monossódico (DAVIS; LAWRENCE; GATLIN, 1993). Entre os tratamentos utilizados no presente trabalho, a suplementação de MCP e MAP confirmou ainda a sua maior

eficiência sobre a retenção de proteína bruta, fósforo, magnésio e potássio, enquanto que o tratamento MAP se mostrou superior a todos os demais na retenção de matéria mineral e cálcio.

Considerando os custos e benefícios da adição desses fosfatos a dietas, fica claro que embora mais barato, a utilização de DCP em dietas para camarões promove pouco ou nenhum benefício para a espécie, por outro lado, é expressiva a melhora ao adicionar os fosfatos MCP e MAP com bom custo benefício atrelado. O MAP apesar de possuir valores de custos mais elevados, promove algumas pequenas diferenças no aumento na digestibilidade de nutrientes, além da diminuição na descarga de fósforo nas fezes, o que em grande escala poderia compensar a diferença de custo em relação ao MCP, sendo possível a indicação dessas duas fontes para a suplementação de dietas a base de ingredientes vegetais para juvenis de *L. vannamei*.

Experimentos 2 e 3

Suplementação de fitase

A suplementação de fitases em dietas para organismos aquáticos está cada vez mais difundida, com benefícios atrelados primariamente ao aumento da disponibilidade do fósforo, mas também com relatos reportados para a melhora no desempenho geral, aumento na digestibilidade e retenção de outros nutrientes, além da redução da excreção de fósforo no cultivo (KUMAR et al., 2012; LEMOS; TACON, 2017). Camarões e organismos aquáticos em geral não evoluíram com a necessidade de acessar o fósforo presente no fitato (mio-inositol hexafosfato), uma vez que essa substância não estava presente naturalmente em sua alimentação. Porém, a partir do momento que são cultivados, novas fontes de nutrientes são propostas para essas espécies, e dentre essas fontes se destacam os ingredientes vegetais, considerados mais sustentáveis e muitas vezes mais acessíveis, mas que por sua vez carregam alguns fatores antinutricionais consigo, como é o caso do fitato, presente em alto teor nesses ingredientes (KUMAR et al., 2012).

As moléculas de fitato correspondem a maior parcela de fósforo presente nos ingredientes vegetais (SELLE et al., 2010; NRC, 2011; KUMAR et al., 2012), sendo

naturalmente indisponível para o camarão e monogástricos em geral (JACKSON; LI; ROBINSON, 1996; RAMSEYER et al., 1999), pois este só é acessível a partir da quebra dessa molécula, a partir da enzima fitase. Além disso, o fitato é ainda responsável por fatores antinutricionais, podendo reduzir a digestibilidade e assimilação de outros nutrientes, como proteína, gordura, cálcio, magnésio, dentre muitos outros minerais, sendo um fator limitante ao uso de ingredientes vegetais em dietas (SUGIURA et al., 2001; CAO et al., 2007; KUMAR et al., 2012). A fitase atua como um catalisador promovendo a hidrólise do fitato (GREINER; KONIETZNY, 2006), liberando fosfato inorgânico disponível para assimilação pelo animal, além disso, a degradação completa do fitato irá liberar ainda o mio-inositol, composto semelhante a uma vitamina, benéfico ao metabolismo (LAIRD; KÜHN; MILLER, 2018; MORAN et al., 2019).

A digestibilidade aparente do fósforo pode ser considerado o critério mais sensível e claro para avaliar o efeito da suplementação da fitase nas dietas e sua utilização no fósforo (QIU; DAVIS, 2017). No presente estudo a adição de fitase em dietas baseadas em ingredientes vegetais afetou de maneira benéfica o desempenho de juvenis de *L. vannamei* sobre a digestibilidade aparente do fósforo, atuou positivamente também sobre a composição corporal e a retenção deste mineral. A digestibilidade aparente do fósforo foi superior a partir do nível de suplementação de 4000 FYT/kg, mas foi ao nível de 6000 FYT/kg que incremento foi observado. Após esse nível, as melhoras da adição da enzima foram mantidas, porém sem nenhum ganho significativo para os dois níveis posteriores. Resultados semelhantes foram demonstrados com espécies de peixes alimentados com dietas baseadas em ingredientes vegetais, como tilápia-do-Nilo (PORTZ; LIEBERT, 2004; SILVA et al., 2005), bagre-do-canal (EYA; LOVELL, 1997), salmão-do-atlântico (SAJJADI; CARTER, 2004). De modo semelhante, Suprayudi, Dini e Dedi (2012) utilizando dietas com 25% de farinha de peixe na alimentação de juvenis de *L. vannamei* encontraram efeitos positivos ao suplementar a dietas com níveis de 500 FTU/kg (“equivalente” a 1000 FYT/kg). Em outro estudo também com o *L. vannamei*, Qiu e Davis (2017) reportaram efeitos positivos sobre a digestibilidade de nutrientes ao incluir 2000 UI/kg (“equivalente” a 4000 FYT/kg) de fitase, em dietas suplementadas também de fosfatos inorgânicos. A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a adição de fitase a partir do nível de 4000 FYT/kg em dietas baseadas em ingredientes vegetais melhora a utilização de fósforo em juvenis de *L.*

vannamei, sendo essa melhora acentuada ao nível de 6000 FYT/kg, onde se estabiliza nas condições do presente estudo. É possível afirmar ainda que o aumento da disponibilidade do fósforo gerado pela inclusão de fitase, promoveu também o aumento do teor corporal e retenção desse mineral para o camarão, fato já comumente reportado para espécies de peixes, como salmonídeos (STOREBAKKEN; SHEARER; ROEM, 1998; VIELMA; LALL; KOSKELA, 1998), panga (DEBNATH et al., 2005), robalo-listrado (HUGHES; SOARES, 1998), robalo-japonês (AI et al., 2007), linguado-japonês (MASUMOTO; TAMURA; SHIMENO, 2001) dentre outros. Anteriormente, Qiu e Davis (2017) já haviam reportado um aumento significativo do teor de fósforo corporal de *L. vannamei* em dietas suplementados de fitase, porém, essa influência não chegou a afetar a retenção dietética desse mineral.

Além dos mais conhecidos e estudados efeitos da fitase sobre a disponibilidade do fósforo, essa enzima ainda é responsável pelos denominados efeitos extra fosfóricos (WALK et al., 2013; LU et al., 2019), relacionados a melhora de digestibilidade de energia, proteínas, aminoácidos e minerais, por meio da dissociação de complexos formados pela molécula do fitato junto a esses componentes (ZANELLA et al., 1999; SUGIURA et al., 2001; SELLE; RAVINDRAN, 2008). Além disso, o fitato dos ingredientes vegetais pode se combinar a enzimas digestivas endógenas dos animais (RAVINDRAN; BRYDEN; KORNEGAY, 1995), como amilases e proteases, reduzindo a sua atuação no processo digestivo dos animais. Efeitos extra fosfóricos da fitase já foram reportados para animais monogástricos terrestres como suínos (NORTEY et al., 2007; HILL; SUTTON; RICHERT, 2009) e frangos de corte (SINGH, 2008; EL-HACK et al., 2018), e também aquáticos como carpas (BARUAH et al., 2005; ROY et al., 2014) truta-arco-íris (VIELMA; LALL; KOSKELA, 1998; SUGIURA et al., 2001; VIELMA et al., 2004; WANG et al., 2009), salmão (STOREBAKKEN; SHEARER; ROEM, 1998), robalo (OLIVA-TELES et al., 1998), dentre outras espécies (KUMAR et al., 2012; LEMOS; TACON, 2017). Assim como observado para essas espécies, no presente estudo a suplementação de fitase proporcionou ganhos além do uso do fósforo para o camarão, sendo observados principalmente o aumento da digestibilidade aparente e a retenção de proteína e matéria mineral, além do incremento no teor de matéria mineral corporal em juvenis de *L. vannamei*.

Autores indicam que os efeitos da adição da fitase são mais pronunciados em dietas em que os níveis de fósforo, cálcio e outros minerais são limitados nas dietas (ZENG et al., 2014; LAIRD; KÜHN; MILLER, 2018). Esse pode ser um dos fatores que levaram o presente estudo a obtenção de um maior número de efeitos benéficos da suplementação de fitase, em relação a outro estudo com a mesma espécie, em que Qiu e Davis (2017) utilizaram a suplementação de fitase em dietas já repletas de fósforo disponível, acima do exigido para espécie, diferente das dietas limitadas para esses minerais utilizadas no presente estudo. Por outro lado, Rachamawati e Samidjan (2018) utilizando suplementação de fitase em dietas ricas em farinha de peixe (teor de fósforo não reportado) para juvenis de *L. vannamei* obtiveram alguns ganhos extra fosfóricos significativos, principalmente sobre a digestibilidade e retenção de proteínas, em dietas que provavelmente já supriam as necessidades de minerais para a espécie.

A suplementação de fitase no presente estudo claramente promoveu o aumento da disponibilidade de nutrientes importantes ao crescimento de juvenis de *L. vannamei*, sendo esses aumentos suficientemente benéficos, de modo a sustentar a expressão dessa melhoria sobre o desempenho geral dos camarões, em parâmetros como o peso final, crescimento semanal, taxa de eficiência protéica entre outros. Estudos de suplementação de fitase em *L. vannamei* são recentes e ainda limitados (SUPRAYUDI; DINI; DEDI, 2012; QIU; DAVIS, 2017; RACHMAWATI; SAMIDJAN, 2018), e embora todos relatem pelo menos alguns efeitos benéficos da adição dessa enzima em dietas, esses efeitos se alternam muito, o que pode estar intimamente relacionado as diferentes abordagens e composição das dietas testadas em cada um desses estudos.

As melhorias encontradas pela suplementação de fitase no presente estudo foram observadas a partir da suplementação ao nível de 4000 FYT/kg até 6000 FYT/kg, com pouco ou nenhum efeito adicional ao nível de 8000 FYT/kg e na superdosagem de 16000 FYT/kg. Cowieson et al. (2017) relataram que os efeitos da adição de fitase podem seguir uma curva de dose-resposta decrescente, onde a maioria dos efeitos benéficos é gerado dentro da dose de fitase necessária para destruir de 30 a 40% do fitato dietético, com efeitos proporcionalmente menores a partir desse ponto. A partir dos dados podemos concluir que no presente estudo esse pico de máximo retorno da fitase esteve entre os de níveis de suplementação de 4000 e 6000 FYT/kg utilizados, com uma tendência de máxima eficiência mais próxima ao nível de 6000 FYT/kg.

Suplementação de protease

No presente estudo, a adição solo da protease em dieta suplementada de fósforo (tratamento MCP+Prot) não resultou em efeitos significativos em nenhum dos parâmetros de desempenho analisado, bem como seu efeito não foi notado sobre a digestibilidade e retenção de nutrientes. Assim como a fitase, o uso de proteases já se encontra mais bem estabelecido e seus benefícios reportados para monogástricos terrestres como aves e suínos (O'DOHERTY; FORDE, 1999; GHAZI et al., 2002; GHAZI; ROOKE; GALBRAITH, 2003; YU et al., 2007) em comparação ao uso em animais aquáticos. Entretanto, estudos realizados nas últimas décadas indicam a possibilidade de efeitos positivos dessa enzima quando aplicada na suplementação de organismos aquáticos cultivados, como carpas (LENG et al., 2008; CHENG et al., 2009; SHI et al., 2016), salmonídeos (DREW et al., 2005; ZHANG et al., 2012), e tilápias (DALSGAARD et al., 2012; LI et al., 2015). Estudos apontam que a eficiência do uso de proteases está intimamente ligada a uma diversa gama de fatores, sendo alguns deles, a digestibilidade potencial dos aminoácidos da dieta ou alimento utilizado, a estrutura da proteína utilizada e suas características, a presença de fatores antinutricionais nas dietas, processos de fabricação e manuseio das proteases, dentre outros (COWIESON; ROSS, 2016). Drew et al. (2005) em estudo com a truta arco-íris reportaram ganhos significativos em crescimento e conversão alimentar com o uso de proteases em dietas formuladas com farinha de sementes de canola, enquanto dietas semelhantes formuladas com outra farinha, de sementes de linhaça, não resultaram em nenhum efeito positivo para adição de proteases exógenas. De mesmo modo, Shi et al., (2016) obtiveram resultados positivos e nulos para o uso de proteases apenas alternando o processo de fabricação de dietas de mesma formulação, com efeitos positivos relatados para dietas peletizadas (temperatura baixa), e sem nenhum efeito positivo para dietas extrusadas (temperatura alta), em experimento com carpas. Alguns estudos têm reportado efeitos positivos da suplementação de proteases em dietas para *L. vannamei*. Li et al. (2015) indicaram que a adição de protease em dietas formuladas com baixa inclusão de farinha de peixe resultou em crescimento semelhante ao de camarões alimentados com dietas ricas nesse ingrediente. Em outro estudo, Yao et al. (2019) utilizou um complexo de proteases em dietas com substituição a farinha de peixe para juvenis de *L. vannamei*, e concluiu

que a inclusão dessas enzimas em dietas com baixos níveis de farinha de peixe resultou na melhora da performance de crescimento e a utilização de nutrientes para a espécie.

No presente estudo, o processo de fabricação das dietas (peletização a frio) não indica ter sido determinante para a falta de efeitos benéficos na adição solo da protease. Por outro lado, a formulação contou com apenas alguns principais doadores de proteína, o que pode ser prejudicial devido as especificidades da protease, além disso, o ótimo resultado da dieta controle (Ctrl+) pode ter nivelado o desempenho em um patamar muito alto, já sem muita margem para a enzima atuar. Em caráter comparativo, no presente estudo, os piores tratamentos obtiveram resultados iguais ou superiores em crescimento semanal quando comparados aos melhores resultados reportados em estudos com protease para *L. vannamei* (LI et al., 2015; YAO et al., 2019), enquanto os resultados obtidos com o controle positivo e a dieta suplementada com protease foram cerca de 40% superiores a esses mesmos estudos.

Suplementação combinada de fitase e protease

Na maioria dos ingredientes vegetais, os fitatos se encontram englobados em camadas de proteínas, formando complexos inseparáveis e indigestos (CHOW; SCHELL, 1980), a quebra do fitato pela ação da fitase libera porções de substrato que se tornam propícios a ação das proteases, tanto endógenas do animal, como exógenas, adicionadas artificialmente as dietas (KEMIGABO et al., 2017). Alguns estudos abordaram a suplementação combinada de protease e fitase em dietas para animais aquáticos, embora com resultados ainda pouco reveladores. Yigit et al. (2018) suplementou dietas para truta-arco-íris com essas duas enzimas combinadas, e não obteve efeitos positivos sobre o crescimento e digestibilidade dos nutrientes, embora tenha obtido efeitos benéficos ao adicioná-las separadamente. De mesmo modo, estudos de digestibilidade *in vitro* com extrato de enzima intestinal de bagre (com dietas baseadas em ingredientes vegetais suplementadas de fitase e protease não reportou efeitos positivos da combinação dessas duas enzimas (KEMIGABO et al., 2017), muito embora efeitos benéficos tenham sido encontrados quando as enzimas foram adicionadas individualmente as dietas. Além de relatar a falta de sinergismo entre essas duas enzimas, Novelli et al. (2017) sugeriram ainda a possibilidade que a protease

fúngica adicionada a dieta poderia ter degradado a fitase, aumentando o efeito negativo na digestibilidade e os efeitos antinutricionais de ingredientes vegetais. De maneira semelhante a esses estudos, a combinação da protease e fitase no presente trabalho não resultaram em efeitos benéficos para o camarão, sendo observado ainda uma ligeira piora no desempenho ao adicionar a protease no tratamento de 4000 FYT/kg, em comparação ao mesmo tratamento sem protease, embora essa piora não tenha sido significativa. Os efeitos da adição de combinações de enzimas em dietas são ainda muito recentes, sendo que alguns estudos já detalharam a sinergia dessas duas enzimas ou combinadas a outras para frangos (COWIESON; ADEOLA, 2005; JUANPERE et al., 2005; LEITE et al., 2012), enquanto trabalhos com suínos demonstraram não haver melhoras na combinação da fitase e protease em dietas (LORENA-RESENDE et al., 2012; RAVIDRAN, 2013; PEREZ-PALENCIA; SAMUEL; LEVESQUE, 2021).

CONCLUSÕES

As primeiras conclusões tiradas dos experimentos com juvenis de *L. vannamei* cultivados em água do mar, são que a espécie pode apresentar um ótimo desempenho de crescimento e de alimentação quando alimentadas com dietas baseadas em ingredientes vegetais, livres de farinha de peixe. Concluimos também que a suplementação com diferentes aditivos pode impulsionar ganhos significativos sobre essa performance, de maneiras singulares para cada um desses aditivos.

A partir dos resultados, fica claro que dados da literatura podem estar extrapolando os níveis mínimos de fósforos exigidos em dietas para camarões, e que níveis $\geq 0,3\%$ de P digestível em dietas de baixa relação Ca/P ($\leq 0,6$) atendem as exigências da espécie, baseado no desempenho dos animais. Dos quatro macro minerais exigidos pelo camarão, em condições de cultivo de alta salinidade, dois deles não são exigidos nas dietas, o cálcio e o magnésio, uma vez que podem ser absorvidos diretamente da água de cultivo, enquanto o fósforo e potássio devem estar disponíveis nas dietas em sistemas de criação de água clara. Camarões alimentados com dietas deficientes em fósforo podem recuperar parte desse mineral através da ingestão de exúvias, mantendo um desempenho satisfatório de crescimento se os demais nutrientes forem supridos, porém com rendimento significativamente inferior a animais

alimentados com dietas com níveis adequados de fósforo digerível. Fosfatos MCP e MAP são indicados como fontes suplementares de fósforo para o crescimento do camarão, proporcionam aumento de digestibilidade e retenção de nutrientes, o MAP leva vantagem na digestibilidade de alguns nutrientes, além de gerar menor descarte de fósforo. Considerando uma escala de custo benefício de 0 a 5, para os três fosfatos analisados, o DCP receberia 0, pois não trouxe nenhum ganho em relação ao controle e sua adição seria apenas um custo adicional, enquanto os fosfatos MCP e MAP poderiam obter a nota máxima, e se por um lado o fosfato MAP é um pouco mais eficaz, o custo inferior do MCP compensaria e igualaria essa diferença.

A abordagem sobre as enzimas demonstrou que a fitase é um aditivo potencial para o *L. vannamei*, e sua adição a dietas baseadas em ingredientes vegetais possibilita o aumento da disponibilidade do fósforo para os camarões, com efeitos positivos sobre o desempenho de crescimento e alimentar, digestibilidade e retenção dos nutrientes, além de diminuir a descarga de fósforo nas águas de cultivo. Os níveis de fitase indicados na suplementação para o *L. vannamei* ficaram no intervalo de 4000 e 6000 FYT/kg, faixa de adição nos quais foram obtidos os melhores desempenhos, acima desses níveis a adição da enzima não é justificada pelo baixo incremento nas melhorias notadas. O estudo indicou que a suplementação de protease nos modelos de dietas formuladas foi ineficaz sobre o desempenho do camarão, sendo necessárias novas investigações e enfoques para essa enzima, que se mostra promissora para outras espécies. Apesar das melhorias claramente trazidas pelas adições da enzima fitase ao desempenho dos camarões, os seus resultados estiveram ainda um patamar abaixo quando comparado ao uso de fosfatos inorgânicos. Sugere-se então uma abordagem nova para futuras pesquisas, em que há grande potencial para a espécie, aliando a suplementação de níveis reduzidos de fosfatos inorgânicos em paralelo a adições de fitase.

Produção científica realizada e potencial

Parte das informações contidas nesse capítulo (Experimento 1 - fosfatos inorgânicos) foram publicadas em revista internacional arbitrada, como segue:

Lemos, D.; Coelho, R.; Zwart, S.; Tacon, A.G.J. Performance and digestibility of inorganic phosphates in diets for juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*): dicalcium phosphate, monocalcium phosphate, and monoammonium phosphate. **Aquaculture International**, v.29, p. 681–695, 2021.

Além de publicação em revista de caráter científico/divulgação de grande relevância no setor, como segue:

ZWART, S; COELHO, R.; LEMOS, D. Formulation of low phosphorus feeds for shrimp. **AQUACULTURE Asia Pacific**, v. 15, n.2, p. 35-38, 2019.

Há ainda o desenvolvimento de um novo manuscrito, abordando o tema de suplementação de enzimas exógenas para camarões marinhos (Experimentos 2 e 3), em processo de preparação para submissão, conforme descrito:

COELHO, R; LEMOS, D. Effects of exogenous enzymes (phytase and protease) in diets on growth, feed utilization, apparent digestibility and nutrient retention of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in high performance conditions. **Aquaculture Research**. (em preparação).

REFERÊNCIAS

ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão. História da Carcinicultura no Brasil, 2011. Disponível em: <www.abccam.com.br/2011/02/historia-da-carcinicultura-no-brasil>. Acesso em 01 de set. de 2021.

AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, W.; XU, W.; TAN, B.; ZHANG, C.; LI, H. Effects of exogenous enzymes (phytase, nonstarch polysaccharide enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 502–508, 2007.

AKIYAMA, D.M. Future considerations for shrimp nutrition and the aquaculture feed industry. em: Wyban, J. (ed.). Proceedings of the special session on shrimp farming. Orlando, Florida, Maio 22-25, p. 198-205, 1992.

AMARAL, R.; ROCHA, I. P.; LIRA JR., G. P. Shrimp Feeding and Feed Consumption: The Brazilian experience. Em. Responsible Aquaculture for a Secure Future: Proceedings of a Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana 70803, United States. p. 267-276, 2003.

AMBASANKAR, K.; ALI, A. S. Effect of dietary phosphorus on growth and excretion in Indian white shrimp. **Journal of Aquaculture in the Tropics**. 17 p.119–126, 2002.

AOAC. (Association of Official Analytical Chemists) INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 18th Edition. Gaithersburg, Maryland, USA, AOAC International, 2005.

BARUAH, K.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; DEBNATH, D. Dietary phytase: an ideal approach for a cost effective and low polluting aqua feed. **NAGA WorldFish Center Quarterly**, v. 27, n. 3&4, p; 15-19, 2004.

BARUAH, K.; PAL, A. K.; SAHU, N. P.; JAIN, K. K.; MUKHERJEE, S. C.; DEBNATH, D. Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. **Aquaculture Research**, v.36, n. 8, p. 803-812. 2005.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa nº 25, de 2 de junho de 2011, Métodos analíticos físico-químicos para controle de pescado e seus derivados, Brasília: Diário Oficial da União. 2011.

BREMER NETO, H.; GRANER, C. A. F.; PEZZATO, L. E.; PADOVANI, C. R. Determinação de rotina do cromo em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5-difenilcarbazida. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 691-697, 2005.

BROWDY, C. L.; VENERO, J. A.; STOKES, A. D.; LEFFLER J. W. Superintensive Biofloc Production Systems Technologies for Marine Shrimp *Litopenaeus vannamei*: Technical Challenges and Opportunities. Em: Burnell G, Allan GL, editors. **New Technologies in Aquaculture**. Cambridge, UK: Woodhead Publishing. P. 1010–1028, 2009.

CAO, L.; WANG, W.; YANG, C.; YANG, Y.; DIANA, J.; YAKUPITIYAGE, A.; Luo, Z.; Li, D. Application of microbial phytase in fish feed. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 497–507, 2007.

CARVALHO, R. A. P. L. F. **Desenvolvimento de um sistema de recirculação para estudos de digestibilidade em condições de alto desempenho para camarões marinhos: avaliação de ingredientes protéicos alternativos à farinha de peixe em diferentes níveis de inclusão em dietas para juvenis de *Litopenaeus vannamei***. 2011. 243 f. Tese (Doutorado) - Curso de Oceanografia Biológica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CARVALHO, R. A. L. F.; OTA, R.H.; KADRY, V.O.; TACON, A.G.J.; LEMOS, D. Apparent digestibility of protein, energy and amino acids of six protein sources included at three levels in diets for juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in high performance conditions. **Aquaculture**, 465, 2016.

CHANG, E. S.; MYKLES, D. L. Regulation of crustacean molting: a review and our perspectives. **General and Comparative Endocrinology**, v. 171, n. 3, p. 323–330, 2011.

CHENG, K. M.; HU, C. Q.; LIU, Y. N.; ZHENG, S. X.; QI, X. J. Dietary magnesium requirement and physiological responses of marine shrimp *Litopenaeus vannamei* reared in low salinity water. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, n. 5, p. 385–393, 2005.

CHENG, K. M.; HU, C. Q.; LIU, Y. N.; ZHENG, S. X.; QI, X. J. Effects of calcium, phosphorus and calcium/ phosphorus ratio on the growth and tissue mineralization of *Litopenaeus vannamei* reared in low-salinity water. **Aquaculture**, v. 251, n. 2-4, p. 472–483, 2006.

CHEN, J. M.; YE, J. Y.; XU, Y. X.; SHEN, B. Q.; GUO, J. L.; PAN, Q.; WU, Y. H. Effect of adding neutral protease to diets on growth performance, digestion and body composition of fingerling black carp (*Mylopharyngodon piceus*). **Acta Hydrobiologica Sinica**, v. 33, n. 4, p. 726–731, 2009.

CHOW K. W.; SCHELL, W. R. The minerals. Em: Aquaculture Development and Coordination Program. Fish feed technology, Lectures presented at the FAO/UNDP Training Course in Fish Feed Technology, Seattle, Washington, FAO, ADCP/REP/80/11. p. 400, 1980.

COELHO, R. T. I.; YASUMARU, F. A.; PASSOS, M. J. A. C. R.; GOMES, V.; LEMOS, D. Energy budgets for juvenile Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* fed different diets. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 67, p. 1-8, 2019.

COWIESON, A. J.; ADEOLA, O. Carbohydrases, protease, and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicks. **Poultry Science**, v. 84, n. 12, p. 1860-1867, 2005.

COWIESON, A. J.; ROSS, F. F. Toward optimal value creation through the application of exogenous mono-component protease in the diets of non-ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 221, part B, p. 331-340. 2016.

COWIESON, A. J.; RUCKEBUSCH, J. P.; SORBARA, J. O. B.; WILSON, J. W.; GUGGENBUHL, P.; TANADINI, L.; ROOS, F. F. A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 231, p. 138-149, 2017.

CROMWELL, G.L. Phytase appears to reduce phosphorus in feed, manure. **Feedstuffs**, v. 63, p.41-41, 1991.

CUZON, G.; GUILLAUME, J. Nutrition and feeding of shrimps in intensive and extensive culture. Em: Guillaume J, Kaushik S, Bergot P, Métailler R (eds) **Nutrition and feeding of fish and crustaceans**. Springer Praxis, p. 265–278, 1999.

CUZON, G.; LAWRENCE, A.; GAXIOLA, G.; ROSAS, C.; GUILLAUME, J. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. **Aquaculture**, v. 235, n. 1-4, p. 513-551, 2004.

CYRINO, J. E. P.; BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J. K. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.68- 87, 2010.

DALL, W.; HILL, B. J.; ROTHLSBERG, P. C.; STAPLES, D. J. The biology of Penaeidae. **Advances in Marine Biology**, v. 27, p. 1-489, 1990.

DALSGAARD, J.; VERLHAC, V.; HJERMITSLEV, N.; EKMANN, K. S.; FISCHER, M.; KLAUSEN, M.; PEDERSEN, P. B. Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. **Animal Feed Science and Technology**, v. 171, n. 2-4, p. 181–191, 2012.

DAVIS, D. A.; LAWRENCE, A. L.; GATLIN, D. M. III Response of *Penaeus vannamei* to dietary calcium, phosphorus and calcium:phosphorus ratio. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 24, n. 4, p. 504–515, 1993.

DAVIS, D. A.; ARNOLD, C. R. Estimation of apparent phosphorus availability from inorganic phosphorus sources for *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 127, n. 2-3, p. 245–254, 1994.

DAVIS, D. A.; LAWRENCE, A. L.; Minerals. Em: D’Abramo LR, Conklin DE, Akiyama DM (eds) Crustacean nutrition. **World Aquaculture Society**, p. 150–163, 1997.

DEBNATH, D.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; JAIN, K. K.; YENGGOKPAM, S.; MUKHERJEE, S. C., Mineral status of *Pangasius pangasius* (Hamilton) fingerlings in relation to supplemental phytase: absorption, whole body and bone mineral content. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 4, p. 326–335, 2005.

DIAS, R. O. C.; CARVALHO, R. A. P. L. F.; LEMOS, D.; TACON, A. G. J. Tailoring feed to farm conditions: effects of water temperature, salinity and exposure time on the stability of shrimp feeds. **Global Aquaculture Advocate**, Nov/Dec, p. 50–52, 2009.

DREW, M.; RACZ, V.; GAUTHIER, R.; THIESSEN, D. Effect of adding protease to coextruded flax: pea or canola: pea products on nutrient digestibility and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Animal Feed Science and Technology**, v. 119, n. 1-2, p. 117-128, 2005.

EL-HACK, M. A. E.; ALAGAWANY, M.; ARIF, M.; EMAM, M.; SAEED, M.; ARAIN, M. A.; SIYAL, F. A.; PATRA, S.; ELNESR, S. S.; KHAN, R. U. The uses of microbial phytase as a feed additive in poultry nutrition – a review. **Annals of Animal Science**, v. 18, n.3, p.639-658, 2018.

EPA – United States Environmental Protection Agency (2014) Method 6010D (SW-846): Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, Revision 4. Washington, DC. <<https://www.epa.gov/esam/epa-method-6010d-sw-846-inductively-coupled-plasma-atomic-emission-spectrometry>>. Disponível em 05 de setembro de 2021. 2014.

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. 386–391, 1997.

FAO, FAO Statistical Yearbook: Fishery and Aquaculture Statistics. The organization of Food and Agriculture of the United Nations, Rome, 2020.

FORSTER, I. P.; DOMINY, W.; OBALDO, L.; TACON, A.G.J. Rendered meat and bone meals as ingredients of diets for shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquaculture**, v. 219, n. 1-4, p. 655-670. 2003.

GARCIA, C. E. O.; ARAÚJO, B. C.; MELLO, P. H.; NARCIZO, A. M.; RODRIGUES-FILHO, J. A.; MEDRADO, A. T.; ZAMPIERI, R. Z.; FLOETER-WINTER, L. M.; MOREIRA, R. G. Involvement of pituitary gonadotropins, gonadal steroids and breeding season in sex change of protogynous dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Teleostei: Serranidae), induced by a non-steroidal aromatase inhibitor. **General and Comparative Endocrinology**, v. 192, p. 170-180, 2013.

GHAZI, S.; ROOKE, J.; GALBRAITH, H.; BEDFORD, M. The potential for the improvement of the nutritive value of soya-bean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. **British Poultry Science**, v. 43, n. 1, p. 70–77, 2002.

GHAZI, S.; ROOKE, J.; GALBRAITH, H. Improvement of the nutritive value of soybean meal by protease and α -galactosidase treatment in broiler cockerels and broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 44, n. 3, p. 410–418, 2003.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Phytase for food application. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 125-140, 2006.

HARDY, R.W. Worldwide Fish Meal Production Outlook and The Use of Alternative Protein Meals for Aquaculture. Em: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D.A., Puello-Cruz, A.C., García-Ortega, A. (Eds.), Avances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición

Acuicola. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, p. 410–419, nov., 2006.

HERNÁNDEZ, A.; SATOH, S.; KIRON, V. Effect of monocalcium phosphate supplementation in a low fish meal diet for rainbow trout based on growth, feed utilization, and total phosphorus loading. **Fisheries Science**, v. 71, p. 817–822, 2005.

HILL, B. E.; SUTTON, A. L.; RICHERT, B.T. Effects of low-phytic acid corn, low-phytic acid soybean meal, and phytase on nutrient digestibility and excretion in growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 4, p.1518-1527, 2009.

HUA, K.; COBCROFT, J. M.; COLE, A.; CONDON, K.; JERRY, D. R.; MANGOTT, A.; PRAEGER, C.; VUCKO, M. J.; ZENG, C.; ZENGER, K.; STRUGNELL, J. M. The Future of Aquatic Protein: Implications for Protein Sources in Aquaculture Diets. **One Earth**, v. 1, n. 3, p. 316-329, 2019.

HUANG, K.; WANG, W. Requirements of *Penaeus vannamei* in low salinity water for dietary phosphorus and calcium. **Periodical of Ocean University of China/Zhongguo Haiyang Daxue Xuebao**, v. 34, p. 209–216, 2004.

HUGHES, K. P.; SOARES Jr., J. H. Efficacy of phytase on phosphorus utilization in practical diets fed to striped bass *Morone saxatilis*. **Aquaculture Nutrition**, v.4, p.133-140, 1998.

JACKSON, L.; LI, M. H.; ROBINSON, E. H., Use of microbial phytase in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets to improve utilization of phytate phosphorus. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 27, n. 3, p. 309–313, 1996.

JUANPERE, J.; PÉREZ-VENDRELL, A.M.; ANGULO, E.; BRUFAU, J. Assessment of potential interactions between phytase and glycosidase enzyme supplementation on nutrient digestibility in broilers. **Poultry Science**, v. 84, n. 4, p. 571–580, 2005.

KANAZAWA, A.; TESHIMA, S.; SASAKI, M. Requirements of the juvenile prawn for calcium, phosphorus, magnesium, potassium, copper, manganese and iron. **Memoirs of the Faculty of Fisheries**, Kagoshima University. v. 33 p. 63- 71, 1984.

KEMIGABO, C.; KANG'OMBE, J.; MASEMBE, C.; JERE, W.; SIKAWA, D. Effects of protease enzyme supplementation on protein digestibility of legume and/or fish meal-based fish feeds. **International Journal of Fisheries and Aquaculture**, v. 9, n. 7, p. 73-80, 2017.

KIM, J. D.; KIM, K. S.; SONG, J. S.; LEE, J. Y.; JEONG, K. S. Optimum level of dietary monocalcium phosphate based on growth and phosphorus excretion of mirror carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 161, p. 337–344, 1998.

KITABAYASHI, K; KURATA, H; SHUDO, K; NAKAMURA, K; ISHIKAWA, S. Studies on formula feed for kuruma prawn. On the relationship among glucosamine, phosphorus and calcium. **Tokai Regional Fisheries Research Laboratory**, n. 64, p. 91-108, 1971.

KOSHIO, S.; DAVIS, D. A. Mineral requirements and current status of shrimp nutrition research. In: Alday-Sanz V (ed) *The Shrimp Book*. Nottingham University Press, p. 485–490, 2011.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; De BOECK, G.; BECKER, K. Phytate and phytase in fish nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 96, p. 335–364, 2012.

LAIRD, S.; KÜHN, I.; MILLER, H. M. Super-dosing phytase improves the growth performance of weaner pigs fed a low iron diet. *Animal Feed Science and Technology*, v. 242, p. 150–160, 2018.

LEITE, P. R. S. C.; LEANDRO, N. S. M.; STRINGHINI, J. H.; SOUZA, E. S.; CAFÉ, M. B.; CARVALHO, F. B.; ANDRADE, M. A. Microbiota intestinal e desempenho de frangos alimentados com rações elaboradas com sorgo ou milho e complexo enzimático. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, n. 6, p. 1673–1681, 2012.

LEMOS, D.; TACON, A. G. J. Use of phytases in fish and shrimp feeds: a review. *Reviews in Aquaculture*, v. 9, n. 3, p. 266, 282, 2017.

LEMOS, D.; WEISSMAN, D. Moulting in the grow-out of farmed shrimp: a review. *Reviews in Aquaculture*, v. 13, n. 1, p. 5–17, 2020.

LENG, X. J.; LIU, D. Y.; LI, X. Q.; LU, Y. H. Effects of adding Protease AG on growth and digestive protease activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, v. 20, p. 268–274, 2008.

LI, X. Q.; CHAI, D. Y.; LIU, M. A.; CHOWDHURY, K.; LENG, X. J. Effects of temperature and feed processing on protease activity and dietary protease on growths of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture Nutrition*, v. 22, n. 6, p. 1283–1292, 2015.

LORENA-REZENDE, I. M. B.; DUTRA JR., W. M.; REZENDE, F. M.; PALHARES, L. O.; LUDKE, M. C. M. M.; RABELLO, C. B. V. Digestibility of the cottonseed meal with or without addition of protease and phytase enzymes in swine diet. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, v. 34, n. 3, p. 259–265, 2012.

LOVELL, R. T. *Nutrition and Feeding of fish*. 2.ed. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998.

LU, H.; COWIESON, A. J.; WILSON, J. W.; AJUWON, K. M.; ADEOLA, O. Extra-phosphoric effects of super dosing phytase on growth performance of pigs is not solely due to release of myo-inositol. *Journal of Animal Science*, v. 97, v. 9, S p. 3898–3906, 2019.

MASUMOTO, T.; TAMURA, B.; SHIMENO, S. Effects of phytase on bioavailability of phosphorus in soybean meal-based diets for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, v. 67, n. 6, p. 1071–1080, 2001.

MILIÁN-SORRIBES, M. C.; TOMÁS-VIDAL, A.; PEÑARANDA, D. S.; CARPINTERO, L.; MESA, J. S.; DUPUY, J.; DONADEU, A.; MACÍAS-VIDAL, J.; MARTÍNEZ-LLORENS, S. Estimation of

Phosphorus and Nitrogen Waste in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) Diets Including Different Inorganic Phosphorus Sources. **Animals**, v. 11, n. 6. p. 1-14, 2021.

MOLES, P.; BUNGE, J. Shrimp farming in Brazil: an industry overview. Roma: FAO/WWF/NACA, p. 26, 2002.

MORALES, G. A.; AZCUYA, R. L.; CASARETTO, M. E.; MÁRQUEZ, L.; HERNÁNDEZ, A. J.; GÓMEZ, F.; KOPPE, W.; MEREU, A. Effect of different inorganic phosphorus sources on growth performance, digestibility, retention efficiency and discharge of nutrients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 495, p. 568–574, 2018.

MORAN, K.; BOYD, R. D.; ZIER-RUSH, C.; ELSBERND, A.; WILCOCK, P; van HEUGTEN, E. Effects of super-dosing phytase and inositol supplementation on growth performance and blood metabolites of weaned pigs housed under commercial conditions. **Journal of Animal Science**, v. 97, n.7, p. 3007-3015, 2019.

MOSS, S. M.; DIVAKARAN, S.; KIM, B. G. Stimulating effects of pond water on digestive enzyme activity in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 2, p. 125– 131, 2001.

NIU, J.; LIU, Y. J.; TIAN, L. X.; MAI, K. S.; YANG, H. J.; YE, C. X.; GAO, W. Effect of dietary phosphorus sources and varying levels of supplemental phosphorus on survival, growth and body composition of postlarval shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture Nutrition**, v. 14, n. 5, p. 472–479, 2008.

NORTEY, T. N.; PATIENCE, J. F.; SIMMINS, P. H.; TROTTIER N. L.; ZIJLSTRA, R. T. Effects of individual or combined xylanase and phytase supplementation on energy, amino acid, and phosphorus digestibility and growth performance of grower pigs fed wheat-based diets containing wheat millrun. **Journal of Animal Science**, v.85, n.6, p.1432-1443, 2007.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; de ARAUJO, E. P.; de MATTOS R. B.; FLEURI, L. F. Enzymes produced by agro-industrial co-products enhance digestible values for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A significant animal feeding alternative. **Aquaculture**, v. 481, p. 1-7, 2017.

NRC – National Research Council. Nutrient requirements of fish and shrimp. **The National Academies Press**, Washington, DC, p. 376. 2011.

OBALDO, L. G.; DIVAKARAN, S.; TACON, A. G. J. Method for determining the physical stability of shrimp feeds in water. **Aquaculture Research**, v. 33, n. 5, p. 369–377, 2002.

O'DOHERTY, J. V.; FORDE, S. The effect of protease and alpha-galactosidase supplementation on the nutritive value of peas for growing and finishing pigs. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 38, n. 2, p. 217–226, 1999.

OLIVA-TELES, A.; PERIERA, J. P.; GOUVEIA, A.; GOMES, E. Utilization of diets supplemented with microbial phytase by sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles. **Aquatic Living Resources**, v. 11, n. 4, p. 255–259, 1998.

ORMOND, J. G. P.; MELLO, G. A. T.; FERREIRA, P. R. P.; LIMA, C. A. O. A carcinicultura brasileira. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n.19, p. 91-118, mar., 2004.

PAN, Q.; CHEN, X. Y.; LI, F.; BI, Y. Z.; ZHENG, S. X. Response of juvenile *Litopenaeus vannamei* to varying levels of calcium phosphate monobasic supplemented to a practical diet. **Aquaculture**, v. 248, n. 1-4, p. 97-102, 2005.

PEÑAFLORES, V. D. Interaction between dietary levels of calcium and phosphorus on growth of juvenile shrimp, *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 172, p. 281–289, 1999.

PEREZ-PALENCIA, J. Y.; SAMUEL, R. S.; LEVESQUE, C. L. Supplementation of protease to low amino acid diets containing superdose level of phytase for wean-to-finish pigs: effects on performance, postweaning intestinal health and carcass characteristics. **Translational Animal Science**, v. 5, n. 2, p. 1-13, 2021.

PEZZATO, L.; BARROS, M.; FURUYA, W. Valor nutritivo dos alimentos utilizados na formulação de rações para peixes tropicais. **Revista Brasileira De Zootecnia**, v. 38, p. 43-51, 2009.

PIEDAD-PASCUAL, F. Mineral requirements of Penaeids. **Actes de Colloque**, v. 9, 309–318, 1989.

PORTZ, L.; LIEBERT, F. Growth, nutrient utilization and parameters of mineral metabolism in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fed plant-based diets with graded levels of microbial phytase. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 88, n. 9-10, p. 311-320, 2004.

QIU, X.; DAVIS, D. A. Effects of dietary phytase supplementation on growth performance and apparent digestibility coefficients of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 5, p. 942–951, 2017.

RACHMAWATI, D.; SAMIDJAN, I. Engineering Technology of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Intensive System Culture with the Supplementation of Phytase Enzyme in the diet. **Omni-Akuatika**, v. 14, n. 2, p. 138-148, 2018.

RAGGI, T. **Feeding and nutrition of tropical farmed fish and shrimp: pellet water stability, in vitro protein digestion, comparison of inert markers, evaluation of practical feeds, and dietary amino acid requirement**, 2016, p. 280. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

RAMSEYER, L.; GARLING, D.; HILL, G.; LINK, J. Effect of dietary zinc supplementation and phytase pre-treatment of soybean meal or corn gluten meal on growth, zinc status and zinc-related metabolism in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 20, p. 251–261, 1999.

RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W. L.; KORNEGAY, E. T., Phytates: occurrence, bioavailability, and implications in poultry nutrition. **Poultry and Avian Biology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 125–143, 1995.

RAVINDRAN, V. Feed enzymes: The science, practice and metabolic realities. **Poultry Science Association**, v. 22, n. 3, p 628, 636, 2013.

RAY, A. J.; SEABORN, G.; LEFFLER, J. W.; WILDE, S. B.; LAWSON, A.; BROWDY, C. L. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. **Aquaculture**, v. 310, n. 1-2, p. 130–138, 2010.

ROCHA, I. P. Desempenho da carcinicultura brasileira em 2007: desafios e oportunidades para 2008. **Revista da ABCC**, Recife, ano X, mar., 2008.

ROCHA, I. P. Carcinicultura Brasileira: Processos tecnológicos, impactos socioeconômicos, sustentabilidade ambiental, entraves e oportunidades. **Revista da ABCC**, ano XII, n. 1, p.26-34, 2011.

ROCHA, I. P., 2020. Desafios e perspectivas do camarão cultivado no Brasil. VI Anuário Seafood Brasil, **Seafood Brasil**, v. 35, p, 22-23, 2020.

ROY, L. A.; DAVIS, D. A.; SAOUD, I. P.; HENRY, R. P. Supplementation of potassium, magnesium and sodium chloride in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low salinity waters. **Aquaculture Nutrition**, v. 13, n. 2, p. 104–113, 2007.

ROY, T.; BANERJEE, G.; DAN, S. K.; GHOSH, P.; RAY, A. K. Improvement of nutritive value of sesame oilseed meal in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings after fermentation with two phytase producing bacterial strains isolated from fish gut. **Aquaculture International**, v. 22, n. 2, p. 633–652, 2014.

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.

SEAFOOD BRASIL, 2020. VI Anuário Seafood Brasil # 35. p. 100, disponível em: <http://www.seafoodbrasil.com.br/revista/seafood-brasil-35-56h-yearbook-6-anuario>, 2020.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. **Livestock Science**, v. 113, n. 2-3, p. 99–122, 2008.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V.; COWIESON, A. J.; BEDFORD, M. R. Phytate and phytase. In: Bedford M, Partridge G (eds) **Enzymes in Farm Animal Nutrition**, 2nd p. 160–205. CABI, Oxfordshire, UK. 2010.

SHI, Z.; LI, X. Q.; CHOWDHURY, M. A. K.; CHEN, J. N.; LENG, X. J. Effects of protease supplementation in low fish meal pelleted and extruded diets on growth, nutrient retention and digestibility of gibel carp, *Carassius auratus* gibelio. **Aquaculture**, v. 460, p. 37–44, 2016.

SHIAU, S. Y.; HSIEH, J. F. Dietary potassium requirement of juvenile grass shrimp *Penaeus monodon*. **Fisheries Science**, v. 67, n. 4, p. 592–595, 2001.

SILVA, T. S. C.; FURUYA, W. M.; SANTOS, V. G.; BOTARO, D.; SILVA, L. C. R.; SALES, P. J. P.; HAYASHI, C.; SANTOS, L. D.; FURUYA, V. R. B. Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes do farelo de soja integral sem e com fitase para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 27, n. 3, p. 371-376, 2005

SINGH, P. K. Significance of phytic acid and supplemental phytase in Chicken nutrition: a review. **World's Poultry Science Journal**, v. 64, n. 4, p. 553-580, 2008.

SMITH, D. M.; TABRETT, S. J. Accurate measurement of in vivo digestibility of shrimp feeds. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 564–580, 2004.

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, n. 1-4, p. 365–379, 1998.

SUGIURA, S. H.; GABAUDAN, J.; DONG, F. M.; HARDY, R. W. Dietary microbial phytase supplementation and the utilization of phosphorus, trace minerals and protein by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fed soybean meal-based diets. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 7, p. 583–592, 2001.

SUPRAYUDI, M. A.; DINI, H.; DEDI, J. The effect of phytase levels in the diet on the digestibility and growth performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Jurnal Akuakultur Indonesia**, v. 11, n. 2, p. 103-108, 2012.

SUSSEL, F. R.; VIEGAS, E. M. M.; PARISI, G. Acquacoltura in Brasile. **Revista Il Pesce, Modene**, n. 2, p. 49- 55, Mar./Apr., 2010.

TACON, A. G. J. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. The essential nutrients. In: Training Manual. Food and Agriculture Organization, Brasilia, p. 73–84, 1987.

TACON, A. G. J.; CODY, J. J.; CONQUEST, L. D.; DIVAKARAN, S.; FORSTER, I. P.; DECAMP, O. E. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. **Aquaculture Nutrition**. v. 8, n. 2, p. 121-137, 2002.

TACON, A. G. J. Recent developments in shrimp feeds & feeding: a practical perspective. XII Fenacam, Brazilian Aqua Show, Fortaleza. ABCC, Brazil, 2015.

VALENTI, W. C.; BARROS, H. P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G. W.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture reports**, v. 19, p. 1-18, 2021.

VIELMA, J.; LALL, S. P.; KOSKELA, J. Effects of dietary phytase and cholecalciferol on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 163, n. 3-4, p. 309–323, 1998.

VIELMA, J.; RUOHONEN, K.; GABAUDAN, J.; VOGEL, K. Top-spraying soybean meal-based diets with phytase improves protein and mineral digestibilities but not lysine utilization

in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 35, n. 10, p. 955–964, 2004.

WALK, C. L.; BEDFORD, M. R.; SANTOS, T. S.; PAIVA, D.; BRADLEY, J. R.; WLADECKI, H.; HONAKER, C.; MCELROY, A. P. Extra-phosphoric effects of superdoses of a novel microbial phytase. **Poultry Science**, v. 92, n. 3, p. 719-725, 2013.

WANG, F.; YANG, Y. H.; HAN, Z. Z.; DONG, H. W.; YANG, C. H.; ZOU, Z. Y. 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, 143– 157, 2009.

WILSON, R. P. Protein and amino acid requirements of fishes. In: S.Y. SHIAU, ed. Progress in fish nutrition Keelung: National Taiwan Ocean University. Marine Food Science Series, no. 9, 1989.

XIE, Y.; YU, D.; REN, B. Effects of nitrogen and phosphorus availability on the decomposition of aquatic plants. **Aquatic Botany**, v. 80, n. 1, p. 29-37, 2004.

YAO, W.; Li, X.; CHOWDHURY, M. A. K.; WANG, J.; LENG, X. J. Dietary protease, carbohydrase and micro-encapsulated organic acid salts individually or in-combination improved growth, feed utilization and intestinal histology of Pacific white shrimp. **Aquaculture**, v. 503, p. 88–95, 2019.

YE, J. D.; WANG, K.; LI, F. D.; SUN, Y. Z.; LIU, X. H. Incorporation of a mixture of meat and bone meal, poultry byproduct meal, blood meal and corn gluten meal as a replacement for fish meal in practical diets of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at two dietary protein levels. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 2, p. 337–347, 2011.

YIGIT, N. O.; KOCA, S. B.; DIDINEN, B. I. S.; DILER, I. Effect of protease and phytase supplementation on growth performance and nutrient digestibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) fed soybean meal-based diets. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n. 1, p. 29-32, 2018.

YU, B.; WU, S.; LIU, C.; GAUTHIER, R.; CHIOU, P.W. Effects of enzyme inclusion in a maize–soybean diet on broiler performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, n. 3-4, p. 283–294, 2007.

ZANELLA, I.; SAKOMURA, N. K.; SILVERSIDES, F. G.; FIQUEIRDO, A.; PACK, M. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. **Poultry Science**, v.78, n.4, p.561-568, 1999.

ZENG, Z. K., WANG, D.; PIAO, X. S.; LI, P. F.; ZHANG, H. Y.; SHI, C. X.; YU, S. K. Effects of adding super dose phytase to the phosphorus-deficient diets of young pigs on growth performance, bone quality, minerals and amino acids digestibilities. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 27, n. 2, p. 237-246, 2014.

ZHANG, J. J.; LI, X. Q.; LENG, X. J.; HAN, Z. Y.; ZHANG, F.G. Effects of supplemental protease on growth and intestinal tissue structure in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Dalian Ocean University**, v. 27, n. 6, p. 534–538, 2012.

ZHAO, L.; WANG, W.; HUANG, X.; GUO, T.; WEN, W.; FENG, L.; WEI, L. The effect of replacement of fish meal by yeast extract on the digestibility, growth and muscle composition of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 1, p. 311–320, 2017.

ZAR, J. H. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. 218pp, 1984.

ZHU, C.; DONG, S.; WANG, F.; HUANG, G. Effects of Na/K ratio in seawater on growth and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 234, n. 1-4, p. 485-496, 2004.

CAPÍTULO 2

Desempenho de juvenis de garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*: protocolos de manejo alimentar e densidade de estocagem, avaliação de dietas práticas, e estimativa de exigências de aminoácidos

RESUMO

Foram conduzidos dois experimentos com juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus* em sistema de recirculação de água salgada: (1) no primeiro experimento foram verificadas a influência de três diferentes frequências alimentares (1x ao dia, 2x ao dia e alimentação contínua) e duas diferentes densidades de estocagem (40 e 95 peixes/m³, Baixa Densidade BD, e Alta Densidade, AD, respectivamente), sobre o desempenho zootécnico e bem estar do animal. O experimento teve duração de 60 dias, garoupas (9.66 ± 2.50 g) foram distribuídas em 24 tanques em 6 diferentes tratamentos, definidos a partir das combinações de frequência alimentar e densidades (1xBD; 2xBD; 24hBD; 1xAD; 2xAD; 24hAD). Ao final do experimento as taxas de sobrevivência não apresentaram variação e estiveram próximas a 100%. Foi constatado que a frequência alimentar não produziu efeitos significativos ($P>0,05$) sobre o desempenho de crescimento e alimentação dos animais, por outro lado, a densidade de estocagem foi responsável por diferenças no desempenho entre os tratamentos. Garoupas estocadas na densidade de 95 peixes/m³ apresentaram resultados superiores para ganho de peso, produtividade e fator de conversão alimentar, indicando essa densidade de estocagem para juvenis de garoupa-verdadeira, e a frequência de uma alimentação ao dia sem perder em desempenho. (2) no segundo experimento com duração de 100 dias, juvenis de garoupa foram submetidas a quatro tratamentos alimentares diferentes, sendo eles, peixe fresco (cavalinha, *Scomber japonicus*), dieta semiúmida, composta por uma mistura 60:40 de dieta seca e peixe fresco, e duas dietas peletizadas a base de farinha de peixe, com ou sem a inclusão de taurina suplementar (0,5%). Os quatro tratamentos promoveram um crescimento satisfatório e aceitação dos peixes, porém a dieta seca sem suplementação de taurina apresentou um desempenho significativamente inferior as demais ($P<0,05$). O crescimento foi superior para peixes alimentadas com a dieta semiúmida e dieta seca com taurina, seguido do tratamento com peixe fresco. A necessidade de aminoácidos essenciais da garoupa-verdadeira foi estimada, utilizando técnica de composição corporal de aminoácidos, os valores estiveram dentro do estipulado anteriormente para outras espécies de garoupa, com exceção de isoleucina e triptofano (valor inferior) e fenilalanina (superior). Baseado no crescimento e teor de retenção de aminoácidos, a taurina foi considerada um aminoácido condicionalmente essencial para juvenis da espécie, e indica-se a suplementação desse aditivo para satisfazer o nível mínimo de 1,0 % de taurina nas dietas. Os presentes resultados servem como ponto de partida para novos estudos nutricionais sobre a garoupa-verdadeira, e podem servir de base na formulação de dietas específicas para a espécie.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a criação de peixes marinhos ainda não atingiu um patamar elevado de importância econômica, apesar de ter um reconhecido potencial, sendo considerado pela FAO como o segundo país com maior área adequada para cultivos offshore no mundo (KAPETSKY; AGUILAR-MANJARREZ; JENNESS, 2013). As atividades de pesquisa e desenvolvimento com peixes marinhos iniciaram-se há algum tempo no país, na década de 1990, com quatro principais espécies candidatas na época, o robalo (*Centropomus parallelus*), a tainha (*Mugil spp.*) e os pargos (*Lutjanus analis* e *Lutjanus synagris*) (Valenti et al., 2021), porém, os esforços não foram suficientes para consolidar a atividade.

Mais recentemente, os cultivos de bijupirá (*Rachycentron canadum*) na Ásia se mostraram interessantes e tornaram a espécie alvo de pesquisas e principal aposta de peixe marinho para o cultivo em muitos países, inclusive o Brasil (BEZERRA et al., 2016; RAGGI; TACON; LEMOS, 2019; VALENTI et al., 2021). A primeira desova em laboratório nacional ocorreu em 2006 (SAMPAIO et al., 2010), e com protocolos de reprodução e berçário estabelecidos foi possível tornar a atividade real, e implantar cultivos economicamente viáveis (DOMINGUES et al., 2014). Apesar disso, a atividade não apresentou evolução constante ao passar dos anos, sendo considerados os principais entraves as dificuldades de obtenção de licenciamento ambiental e a disponibilidade de alimentos específicos e de qualidade para peixes marinhos (CAVALLI; DOMINGUES; HAMILTON, 2011; VALENTI et al., 2021), mantendo a atividade restrita a poucos pequenos produtores.

Em um patamar ainda mais inicial de cultivo no país, porém, já com engordas comerciais em andamento, encontra-se a garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus*, que é considerada atualmente uma das espécies mais promissoras e indicadas para o cultivo de peixes marinhos no Brasil (RIMMER; GLAMUZINA, 2019; LISBOA et al., 2020; VALENTI et al., 2021). Assim como o bijupirá, a garoupa é uma espécie autóctone no Brasil, e já possui seu ciclo reprodutivo e fase de alevinagem bem definidos por produtor comercial no país (KERBER et al., 2012, RIMMER; GLAMUZINA, 2019), com capacidade atual de produção de 200 mil alevinos por ano e margem para expansão.

As garoupas pertencem à família Serranidae, composta por 48 gêneros, são peixes carnívoros, que habitam regiões costeiras de água quentes e temperadas (HEEMSTRA; RANDALL, 1993; CRAIG; SADOVY; HEEMSTRA, 2011), apresentam considerável valor econômico, especialmente na pesca costeira em regiões tropicais e subtropicais (CHUA; TENG, 1980; HEEMSTRA; RANDALL, 1993; OTTOLENGHI et al., 2004; LÓPEZ; CASTELLÓ-ORVAY, 2005; PIERRE et al., 2008), sendo que em muitas regiões essa pesca exerce pressão sobre a sustentabilidade e conservação das espécies (FAO, 2020). O desenvolvimento da aquicultura de garoupas pode representar um alívio para a conservação e manutenção das populações das espécies (TUPPER; SHERIFF, 2008). O cultivo de garoupas já apresenta grande importância para o setor de pescado em muitos países, com destaque para países do leste e sudeste asiático, onde são cultivadas principalmente em tanques-rede próximos a costa (RIMMER; GLAMUZINA, 2019). Nessas regiões podem ser destacados o cultivo de 3 países, com um percentual estimado em 92% da produção global de espécies identificadas como garoupas, China, Indonésia e Taiwan (RIMMER; GLAMUZINA, 2019). A produção anual de garoupas em 2015 chegou a 155 mil toneladas, com um valor estimado em 4,5 bilhões de reais (RIMMER; GLAMUZINA, 2019).

Na Ásia a criação de garoupas se destaca entre outras coisas, pela grande diversidade de espécies cultivadas, principalmente do gênero *Epinephelus* (cerca de 36 espécies), *Plectropomus*, *Cephalopholis* e ainda uma quantidade relevante de híbridos, muitos dos quais já são cultivados rotineiramente, com um total de 47 espécies de garoupas e 15 híbridos (RIMMER; GLAMUZINA, 2019). Nas Américas, o estudo com a garoupa-de-Nassau, *Epinephelus striatus*, é o que se encontra mais avançado, com algum cultivo estabelecido na região das Bahamas (RIMMER; GLAMUZINA, 2019), além do destaque a garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, que é considerada a espécie mais promissora no Brasil, assim como apresenta maior enfoque também no mediterrâneo (PIERRE et al., 2008; RIMMER; GLAMUZINA, 2019). Apesar de ser uma indústria consolidada em muitos países, o cultivo de garoupas ainda apresenta baixo desenvolvimento em termos nutricionais (LUO et al., 2005a; RIMMER; GLAMUZINA, 2019) com grande parte dos criadores utilizando rejeito de pesca como complementação a dietas secas, ou mesmo como única fonte de alimento (SIM et al.,

2006; TUPPER; SHERIFF, 2008; BUNLIPATANON et al., 2014; RIMMER et al., 2016). Além disso, muitas das espécies cultivadas não possuem o seu ciclo totalmente fechado, sendo capturados indivíduos jovens no ambiente natural, para serem então engordados em cativeiro (SADOVY, 2000; PIERRE et al., 2008; VI et al., 2015).

Garoupa-verdadeira

A garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, é uma espécie carnívora, de hábitos bentônicos, e que habita regiões costeiras dos dois lados do oceano Atlântico, desde o Mar mediterrâneo até África do Sul e Madagascar pelo lado oriental, e desde a costa norte e nordeste do Brasil até o sul da Argentina no lado ocidental (RICO; ACHA, 2003; PIERRE et al., 2008). É considerada uma espécie de grande interesse no setor pesqueiro e econômico, além de possuir um elevado valor comercial (SANCHES; AZEVEDO; COSTA, 2007), porém, apresenta baixa resiliência e alta vulnerabilidade à exploração humana (CUNHA et al., 2013), estando atualmente incluída em listas de conservação devido a sobrepesca (POLLARD et al., 2018).

A garoupa-verdadeira pode chegar a grandes proporções, atingindo até 60 kg ao longo de sua vida, que pode chegar a 50 anos (HARMELLIN; HARMELLIN-VIVIEN, 1999). A garoupa possui peculiaridades no processo reprodutivo, é uma espécie hermafrodita protogínica (ANDRADE et al., 2003), em que a sua primeira maturação ocorre com tamanhos próximo a 2,5 kg, o que corresponde a aproximadamente 5 anos de vida (BERTONCINI et al., 2003), e invertem de sexo, ou seja, as fêmeas passam a ser machos, quando os animais já atingem pesos superiores a 13 kg, e idades entre 9 e 16 anos de vida. Ainda, por apresentarem um período de desova bem definido, isto acaba tornando a espécie mais vulnerável a sobrepesca, neste período os indivíduos formam grandes agregações populacionais para a reprodução, onde são capturados com relativa facilidade pelos pescadores (WHAYLEN et al., 2004). No Brasil, o período de desova da garoupa se concentra no verão (ANDRADE et al., 2003), coincidindo com períodos em que o litoral está mais povoado devido à presença de turistas, o que acaba causando um aumento na demanda por peixes de qualidade, seguido por um aumento inadequado no esforço pesqueiro sobre a espécie. Nos últimos anos esse problema tem sido

atenuado pelo estabelecimento do período de defeso para a espécie (novembro a março, PORTARIA INTERMINISTERIAL N° 41, de 27 de julho de 2018), em que ficam proibida a pesca e o desembarque de exemplares, justamente pelo entendimento que a espécie se encontra ameaçada na nossa região.

Dada a importância e a vulnerabilidade da espécie, a aquicultura é apontada como um caminho eficiente na redução do déficit entre a demanda e a oferta da espécie para o consumo, reduzindo ainda a pressão sobre os estoques pesqueiros da espécie, já em declínio (FOGLIARINI et al., 2021).

Os protocolos de reprodução e larvicultura da garoupa-verdadeira são há alguns anos bem sucedidos no país, sendo constantemente aprimorados (SANCHES; OLIVEIRA; SERRALHEIRO, 2009; KERBER et al., 2012; SILVA; KUHNEN; SANCHES, 2018; RIMMER; GLAMUZINA, 2019; VALENTI et al., 2021) e gerando alevinos de boa qualidade para engordas comerciais. Porém, são necessários mais investimentos e estudos sobre o manejo, alimentação, nutrição e tecnologias de cultivo para a espécie (CAVALLI; HAMILTON, 2009). Pelo fato de ser uma espécie inserida recentemente na aquicultura nacional e também mundial, existe pouco conteúdo disponível que explore essas áreas de grande importância, como o manejo e os aspectos nutricionais exigidos pela espécie. Os trabalhos existentes apresentam maior enfoque a aceitação de dietas naturais como rejeito de pesca, mexilhões, além de dietas comerciais genéricas (LÓPEZ; CASTELLÓ-ORVAY, 2003; SANCHES; AZEVEDO; COSTA, 2007; SANCHES et al., 2014; RAMOS et al., 2018), frequência alimentar (SOUSA et al., 2019; SPANDRI et al., 2020), e principalmente aos protocolos de reprodução, indução hormonal e larvicultura (SPEDICATO et al., 1995; GLAMUZINA et al., 1998a; GLAMUZINA et al., 1998b; SANCHES; OLIVEIRA; SERRALHEIRO, 2009; MARINO et al., 2000; KERBER et al., 2012; GARCIA et al., 2013; SILVA; KUHNEN; SANCHES, 2018; MELLO et al., 2018; RODRIGUES-FILHO et al., 2020). Visto a escassez de estudos, é aceitável e necessário tomar como ponto de partida estudos já realizados com espécies congêneres asiáticas, as quais possuem estudos, revisões e um pacote nutricional mais completo (TUCKER, 2005, LUO et al., 2005a; LUO et al., 2005b, LIAO; LEAÑO, 2008; PIERRE et al., 2008; CAI-JUAN; RAMLI; RAHMAN, 2016; RIMMER; GLAMUZINA, 2019), e que podem servir de guia para formulação de dietas específicas para a garoupa-verdadeira (NRC, 2011).

Estudos de revisões para garoupas indicam a necessidade de dietas altamente protéicas, dado os hábitos naturalmente carnívoros da espécie, indicando teores de proteína próximos a 50% para promover o crescimento máximo do animal (LUO et al., 2005a), por sua vez, este mesmo estudo indica a aceitabilidade de diferentes fontes de proteína na formulação das dietas, sem prejuízos ao desempenho. Há estudos que indicam a possibilidade de diminuição dos teores de proteína total nas dietas, desde que mantido os níveis energia disponível (SHIAU; LAN 1996; SHIAU; LIN, 2001). As garoupas aceitam lipídios como fonte de energia, mais barata quando comparado as proteínas, além de serem importantes fornecedores de ácidos graxos essenciais aos animais, a inclusão de lipídios a níveis que variam entre 9 a 10% nas dietas parece satisfazer as necessidades e promover o máximo desempenho dos animais (LUO et al., 2005a). A exigência de aminoácidos não está totalmente estabelecida para a grande maioria de espécies de garoupas, mas a princípio são considerados 10 os aminoácidos essenciais, como na maioria das espécies de peixes, a arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (LUO et al., 2005a; MUHAMMADAR et al., 2011). Além desses aminoácidos, a taurina vem sendo muito estudada e é considerada um aminoácido condicionalmente essencial para algumas espécies de peixes (EL-SAYED, 2014), sendo que a suplementação de dietas com esse aminoácido já se mostrou positivo para espécies de garoupas (KOVEN et al., 2016; LIN; LU, 2020), indicando o uso potencial na alimentação da garoupa-verdadeira *E. marginatus*.

Na Ásia os sistemas de criação se dividem em tanques-rede, tanto próximos como afastados da costa, tanques escavados, além de muitos países que adotam preferencialmente a utilização de cultivos em sistemas de recirculação de água (RAS) (RIMMER; GLAMUZINA, 2019). Os peixes são estocados com base em densidades finais variando de 10 a 20 kg/m³ (KONGKEO et al., 2010), em ciclos que duram de 9 a 23 meses (KONGKEO et al., 2010; PETERSEN et al., 2013), utilizando dietas como o rejeito de pesca e rações comerciais (RIMMER; GLAMUZINA, 2019). Atualmente no Brasil a espécie é cultivada em pequena escala e com grande aceitação de mercado, com principalmente três sistemas adotados, tanques redes próximos a costa, RAS de água salgada e o cultivo em antigos viveiros de camarões (salinidade > 25 ppt), com alimentação sendo realizada por meio de dietas comerciais algumas vezes complementada por rejeito de pesca.

OBJETIVOS DETALHADOS

- Avaliar a aceitação de juvenis de garoupa-verdadeira ao cultivo em sistema de recirculação de água salgada;
- Desenvolver e testar protocolos de alimentação para garoupa-verdadeira com diferentes números de refeições diárias, avaliando possíveis influências no desempenho zootécnico da espécie a esses protocolos;
- Verificar a aceitação de juvenis de garoupa a diferentes densidades de estocagem e quantificar a aceitação e o desempenho a partir de parâmetros zootécnicos de crescimento;
- Avaliar o desempenho de juvenis de garoupa cultivados em sistema de recirculação de água indoor alimentados com quatro diferentes dietas práticas; dieta baseada em peixe fresco (utilizado por cultivos no Brasil), um preparado semiúmido de peixe fresco e dieta seca; e duas dietas secas formuladas para peixes marinhos com e sem a adição de taurina em sua composição;
- Analisar e calcular a composição de aminoácidos de juvenis de garoupa submetidos a tratamentos alimentares (peixe fresco e dieta seca) e a partir de duas diferentes metodologias estimar a exigência individual de cada aminoácido para a espécie.
- Comparar os valores de exigência de aminoácidos estimados no presente estudo com valores obtidos em literatura outras espécies de peixes marinhos e também do mesmo gênero estudado, *Epinephelus* sp.
- Avaliar o efeito da suplementação de taurina sobre a performance zootécnica de juvenis de garoupa-verdadeira

MATERIAIS E MÉTODOS

Contexto

Foram realizados dois experimentos distintos com juvenis de garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*) com o intuito de aumentar o conhecimento sobre essa espécie tão pouco explorada, e que possui grande potencial para ser cultivada comercialmente no Brasil. O primeiro com duração de 60 dias foi voltado a aprimorar o manejo da espécie, número de alimentações diárias, aceitação a tanques de cultivo e também ao adensamento. Já o segundo experimento, com duração de 100 dias, agregou um pouco do conhecimento adquirido no primeiro trabalho, e se aprofundou sobre a nutrição da espécie, sendo testadas diferentes dietas práticas, abordando aspectos de desempenho e retenção de nutrientes, além de estimar a exigência de aminoácidos essenciais na dieta para juvenis da espécie.

Animais experimentais

Foram adquiridos aproximadamente 650 alevinos de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus* (Figura 2.1, A e B), provenientes de matrizes selvagens cultivadas em cativeiro, com peso inicial médio de 2,0 g de um produtor comercial de peixes marinhos (Redemar Alevinos, Ilhabela, SP, Brasil). Os animais foram submetidos a um jejum de 24 horas para o traslado entre o produtor comercial e o laboratório de pesquisas (cerca de 5 horas de viagem), e estocados em caixa d'água adaptada para viagem (transfish), com suporte de aeração constante durante todo o trajeto.

Figura 2.1 - Soltura de alevinos de garoupa (peso médio 2,0 g) em tanque berçário (A); transfish utilizado no traslado de Ilhabela-Ubatuba, com suporte de oxigenação constante (B)



Fonte – Reprodução acervo pessoal

Esses cuidados, aliados a robustez da espécie, permitiram que todos os animais chegassem vivos e saudáveis ao laboratório, onde foram estocados em tanque de lona de 9000 L (berçário, Figura 2.2), em sistema de fluxo aberto (100% de troca de água por dia), com água bombeada diretamente da enseada localizada à frente do laboratório (Enseada do Flamengo, Ubatuba - Brasil), mantidos a temperatura ambiente (média de 25 °C, primavera e verão) e alimentados com ração comercial para peixes marinhos, com a seguinte composição declarada: Umidade (max.) 5,0%, proteína bruta (min.) 55,0%, gordura (min.) 13,0%, cinzas (max.) 13,5% (INVE Aquaculture Nv, Bélgica). Para manutenção da qualidade da água, o berçário era equipado com sistema de circulação de água e Venturi (oxigenação) promovidos por motobomba (Sodramar 3/4 cv, Diadema, Brasil).

Figura 2.2 – Sistema de berçário para alevinos de garoupa-verdadeira, em tanque circular e volume útil de 9000 L, sistema em fluxo aberto, com troca de água de 100% ao dia.



Fonte – Reprodução acervo pessoal

A alimentação foi realizada quatro vezes ao dia até atingir saciedade aparente, de modo a prevenir o canibalismo. Uma dieta de manutenção (AquaMar, Tabela 2.3), também utilizada nos experimentos, foi fabricada e gradualmente adicionada a alimentação dos peixes junto a dieta comercial, até que fosse possível fazer a substituição completa.

Durante o período que precedeu o primeiro experimento, entre a chegada dos peixes até atingir um tamanho próximo a 10,0 g (cerca de 2 meses) foram medidos diariamente parâmetros de qualidade da água com uma sonda multiparâmetros (YSI 85, YSI Inc., Yellow Springs, USA), sendo as médias de salinidade, oxigênio dissolvido e temperatura para esse período 34,5 ppt, 5,75 mg.O₂/L e 25,7 °C respectivamente. Nesse período não foi observado mortalidade entre os animais, a aceitação a ração preparada no laboratório ocorreu de forma rápida, mantendo a sanidade e o bem-estar das garoupas até sua utilização nos experimentos.

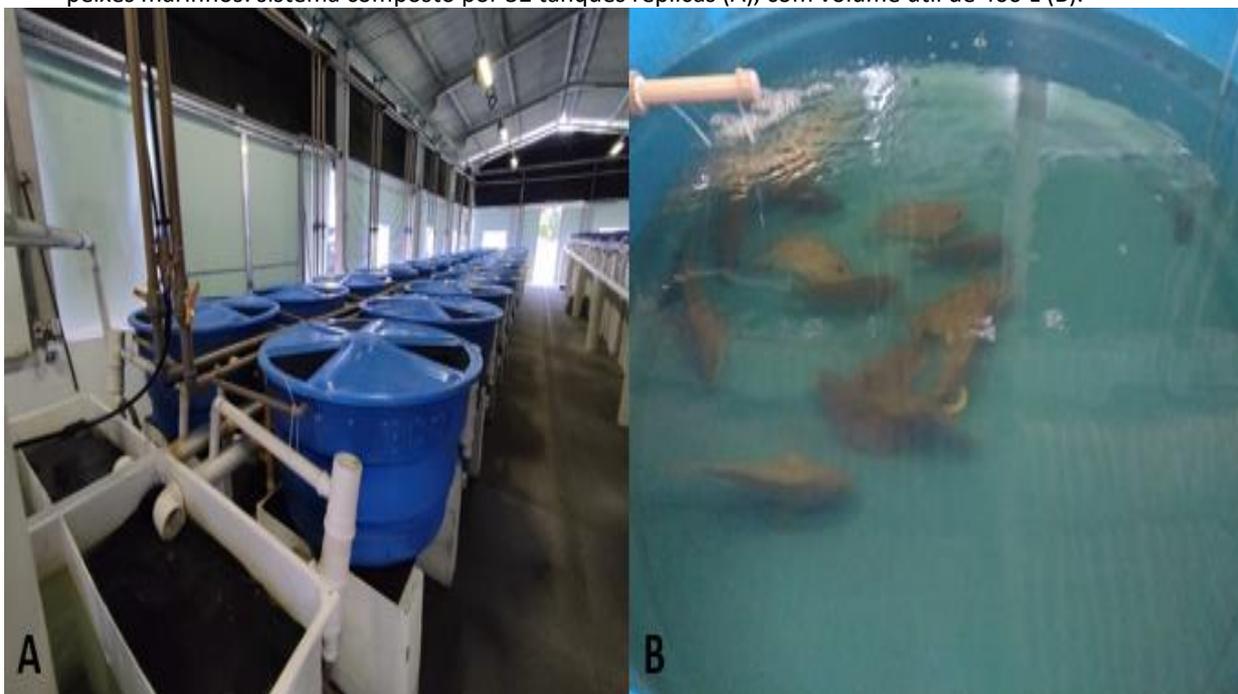
Após a realização do primeiro experimento, as garoupas retornaram a este tanque de manutenção (berçário), onde foram alimentadas com ração comercial para peixes marinhos (umidade (max.) 5,0%, proteína bruta (min.) 40,0%, gordura (min.)

15,0%, cinzas (max.) 10,5%) e permaneceram nesse sistema durante 6 meses (valores médios: temperatura 26,8 °C, salinidade 34,6 ppt, oxigênio dissolvido 5,44 mg.O₂/L), até a estocagem para o segundo experimento.

Sistema experimental de cultivo

Os experimentos de manejo e desempenho foram conduzidos no Laboratório de Aquicultura (LAM) da Universidade de São Paulo (Instituto Oceanográfico), localizado na Enseada do Flamengo, Ubatuba. Para os dois experimentos realizados com a garoupa-verdadeira foram utilizados um mesmo sistema recirculante de água salgada, com a seguinte configuração (Figura 2.3):

Figura 2.3 – Sistema recirculante de água marinha, adaptado para experimentos de desempenho para peixes marinhos: sistema composto por 32 tanques réplicas (A), com volume útil de 400 L (B).



Fonte – Reprodução acervo pessoal

O sistema recirculante foi composto por tanques cilíndricos auto limpantes de 0,5 m³ (volume útil de 0,4 m³), cobertos com tampa de proteção que permitia a passagem de iluminação e também a alimentação. Esse sistema foi abastecido com água do mar captada por bombeamento da enseada localizada em frente ao laboratório, sendo previamente filtrada para uso (CUNO 5 e 25 µm, e UV-C para desinfecção).

O sistema possui 32 tanques réplicas, porém, estes não foram usados em sua totalidade por questões experimentais, sendo que no experimento 1 foi utilizada uma configuração com 24 tanques, e no experimento 2 foi utilizada uma configuração com 16 tanques, sendo sempre mantidos o número de 4 réplicas por tratamento. Além dos tanques de cultivo, esse sistema foi composto por duas caixas reservatório (1 m³ cada uma), sendo uma no mesmo nível do cultivo (recebia a água dos tanques após passagem pelo tratamento) e outra acima (retorna a água para o cultivo por gravidade), a água era repostada na caixa superior por duas motobombas que funcionavam alternadamente (Sodramar 3/4 cv, Diadema, SP - Brasil). O tratamento foi composto por duas caixas d'água (volume 1000 L), equipadas com filtros do tipo manta de perlona (lavado diariamente) para remoção de material particulado, dois skimmers para remoção de compostos nitrogenados (sistema alimentado por motobomba individual, Sodramar 1/2 cv, Diadema, Brasil), além de filtros biológicos, compostos por mídias plásticas de alta superfície de contato (promoção de bactérias benéficas). Individualmente os tanques de cultivo possuíam sistema de entrada de água recirculada (\cong 4 L/min) e aeração, além de possuírem decantadores que permitiram a retirada de material particulado (sobra de ração/fezes) sem o contato direto com os peixes, evitando o estresse pelo manejo.

Durante os dois experimentos realizados, o sistema de cultivo operou sem grandes volumes de trocas d'água (menos que 5% diário), apenas para reposição de água perdida por evaporação e limpeza. Os parâmetros de qualidade de água, como temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido foram monitorados diariamente a partir de sonda multiparâmetros (9:00 a.m., YSI 85 meter, Yellow Springs, OH). Variáveis como amônia total, nitrito, nitrato e pH foram monitorados semanalmente por meio de kit colorimétrico (Alfakit, Florianópolis, Brasil).

Desenho experimental: experimento 1 -Frequência alimentar e densidade de estocagem juvenis de garoupa

Os peixes utilizados neste experimento foram transferidos do tanque de manutenção e mantidos no sistema de cultivo RAS (descrito anteriormente) durante uma semana, após esse período, peixes com peso médio de 9,6 g foram pesados

individualmente e estocados randomicamente entre 24 tanques experimentais (6 tratamentos com 4 réplicas cada), para o início do experimento.

Neste primeiro experimento foram testados seis diferentes tratamentos, combinando duas diferentes densidades de estocagem, e três diferentes frequências alimentares (Tabela 2.1). As densidades foram divididas entre alta e baixa densidade, sendo denominada alta densidade (AD) os tratamentos com 38 peixes por tanque (95 ind/m³) e baixa densidade os tratamentos (BD) com 16 peixes por tanque (40 ind/m³). Para o regime alimentar foram escolhidos três diferentes manejos, sendo eles: uma alimentação diária até saciedade aparente (1x), sempre realizada no período da manhã (08:00 a.m.), regime de duas alimentações diárias (2x), a primeira pela manhã (08:00 a.m.) e a segunda pela tarde (14:00 p.m.), também realizada até atingir saciedade aparente, e o terceiro regime alimentar fornecido de modo contínuo (24h) por meio de alimentadores automáticos (aproximadamente 22h/dia, Baby belt feeder, Pentair, Brookfield, USA), sempre abastecidos pela manhã, tendo seu controle de fornecimento a partir de ajustes diários a partir da observação de sobras/ausência de ração nos tanques.

Tabela 2.1 - Design experimental, densidade de estocagem inicial, biomassa inicial e frequência alimentar para experimento realizado com juvenis de *Epinephelus marginatus*.

	Densidade de estocagem inicial			Regime alimentar
	Número total de peixes estocados por tanque	Densidade de estocagem inicial (ind/m ³)	Biomassa de estocagem inicial (kg/m ³)	Número de refeições
AD-1x	38	95	0,91	Uma ao dia
BD-1x	16	40	0,38	Uma ao dia
AD-2x	38	95	0,92	Duas ao dia
BD-2x	16	40	0,38	Duas ao dia
AD-24x	38	95	0,93	Contínua 24h
BD -24x	16	40	0,40	Contínua 24h

AD – alta densidade

BD – Baixa densidade

A ração fornecida foi sempre pesada antes e após a alimentação, sendo esta realizada sempre por um mesmo tratador, sete dias por semana. Os tanques foram sempre alimentados randomicamente para evitar possíveis vícios do tratador, sendo feita uma primeira alimentação por tanque, seguido por uma segunda rodada para confirmar a saciedade aparente. A dieta utilizada neste experimento foi comum a todos os tratamentos, sendo uma dieta seca de alta proteína, baseada em farinha de peixe (AquaMar, Tabela 2.3), fabricada no próprio laboratório de pesquisa, com péletes de

4mm. O teste teve duração de 60 dias de alimentação, ao fim desse período todos os animais foram pesados individualmente para cálculos de desempenho. Parâmetros de qualidade da água como temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido foram monitorados duas vezes ao dia (09:00 a.m. e 16:00 p.m.; sonda multiparâmetros YSI 85 meter) e semanalmente foram monitorados os valores de amônia total, nitrito e pH (Testes colorimétricos, Alfakit, Florianópolis, Brasil).

Desenho experimental: experimento 2 - Dietas práticas

Foram distribuídos randomicamente 15 peixes (143,7 +- 22,7 g, peso inicial) entre 16 tanques experimentais, totalizando 4 réplicas por dieta testada. A densidade inicial correspondeu a 5,4 kg/m³. Os peixes foram pesados individualmente ao início e ao final do experimento (100 dias). Pesagens intermediárias foram descartadas devido a particularidades da espécie (estresse, demora a retornar à alimentação normal após manuseio). Para a análise de composição corporal foram retirados animais de mesmo lote ao início do experimento, e de cada tanque ao final (4 peixes por tanque), eutanasiados em solução de óleo de cravo diluído em água (0,5 ml/L) e mantidos em freezer até a realização das análises.

Para a escolha dos ingredientes e das dietas utilizadas, foi adotado o critério de que os mesmos devessem estar disponíveis no mercado, e serem comumente utilizados na fabricação de dietas e alimentação de peixes no Brasil. Os ingredientes escolhidos incluem produtos de origem animal e vegetal, sendo eles: farinha de peixe, farinha de vísceras de frango, farinha de lula, farinha de sangue, óleo de peixe, hidrolisado de peixe, farinha de trigo, glúten de trigo, lecitina de soja, além de preparado mineral e vitamínico próprio para peixes marinhos. Para a preparação das dietas, os ingredientes secos foram previamente moídos para tamanho menor do que 550 µm, com um moinho de martelos (MCS 450 Moinhos Vieira, Tatuí, Brasil). A composição centesimal dos ingredientes utilizados é apresentado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Composição centesimal e de aminoácidos dos principais ingredientes utilizados na fabricação de dietas experimentais para garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (% matéria úmida).

	Farinha de peixe ²	Farinha de vísceras ³	Farinha de lula ⁴	Farinha de sangue ³	Óleo de peixe ⁵	Glúten de trigo ³	Farinha de trigo ³	Hidrolisado de peixe ⁶
Composição centesimal analisada								
Umidade	7,25	5,02	5,02	7,92	0,17	7,43	13,05	-
Proteína bruta	51,2	43,9	84,4	88,7	0,10	76,3	12,6	65,6
Gordura	12,5	17,3	3,21	0,9	99,0	0,94	1,40	-
Matéria mineral	31,3	31,3	3,17	1,78	0,70	1,19	0,78	6,07
Aminoácidos essenciais Calculado de valores de referência ¹								
Arginina	2,97	3,81	6,38	2,35	-	3,59	0,92	3,12
Histidina	1,51	0,75	2,26	5,01	-	1,89	0,42	2,15
Isoleucina	2,12	1,66	4,39	0,80	-	3,50	0,55	2,09
Leucina	3,29	3,08	7,63	10,3	-	5,95	0,99	3,03
Lisina	3,66	2,45	6,61	7,11	-	4,63	0,62	3,59
Metionina	1,27	1,00	0,97	1,00	-	1,51	0,20	1,20
Treonina	2,00	1,76	3,77	3,80	-	1,51	0,50	1,38
Triptofano	0,49	-	0,94	1,00	-	0,99	0,27	0,60
Valina	2,40	2,27	4,36	5,21	-	3,78	0,74	2,15
Taurina* ⁷	0,39	0,07	0,39	0,10	-	0,00	0,00	0,64

(-) Não analisado.

*Classificado como aminoácido condicionalmente essencial no presente trabalho.

¹Valores calculados a partir da literatura (NRC, 2011; RAGGI, 2016) e corrigidos para os teores de proteína analisados.

²Farinha de resíduos de processamento de pescado, Nicoluzzi indústria de rações Ltda, Penha, SC, Brasil.

³Fornecido por Guabi Nutrição animal, Campinas, SP, Brasil.

⁴Fornecido por Polinutri Alimentos S.A., Osasco, SP, Brasil.

⁵100% óleo de peixe (maioria anchovas, sardinhas, salmão e atum), Omegasur S.A., Mar del Plata, Argentina.

⁶Aquativ, Diana, Even, França.

⁷Sweetmix, Sorocaba, SP, Brasil.

Foram testadas 4 dietas práticas (Tabela 2.3) AquaMar (AQ) – dieta de referência peletizada a frio, AquaMar-T (AQ-T) – mesma composição e fabricação da dieta AQ, sem a inclusão de taurina, Semiúmido (SM) – composta por AQ + peixe fresco (60:40, v:v, respectivamente) e peixe fresco (PF) – composto por cavalinha sem cabeça e vísceras, *Scomber japonicus*, obtido junto a pescadores locais.

Tabela 2.3 - Formulação e composição centesimal (% , matéria úmida) das dietas experimentais utilizadas na alimentação de juvenis de garoupa-verdadeira. Dados de composição centesimal expressados em média (DP), n=3.

Ingrediente %	AquaMar ¹	AquaMar-T ²	Semiúmido ^{2,3}	Peixe fresco ⁴
	(AQ)	(AQ-T)	(SU)	(PF)
Farinha de peixe ⁵	50,0	50,0	30,0	-
Farinha de vísceras ⁶	10,0	10,0	6,00	-
Farinha de lula ⁷	10,0	10,0	6,00	-
Farinha de sangue ⁶	3,00	3,00	1,80	-
Farinha de trigo ⁶	10,5	11,0	6,30	-
Gluten de trigo ⁶	5,00	5,00	3,00	-
Óleo de peixe ⁸	5,00	5,00	3,00	-
Hidrolisado de peixe ⁹	4,00	4,00	2,40	-
Lecitina de soja ⁶	1,00	1,00	0,60	-
Premix mineral e vitamínico ¹⁰	1,00	1,00	0,60	-
Taurina ¹¹	0,50	-	0,30	-
Peixe fresco ⁴	-	-	40,0	100,0
<i>Composição centesimal</i>				
Umidade	5,72 (0,23)	5,41 (0,18)	36,3 (0,28)	72,5 (0,19)
Proteína bruta	51,1 (0,69)	50,7 (0,92)	35,9 (0,62)	20,0 (0,17)
Gordura bruta	12,7 (1,15)	12,9 (1,04)	10,8 (0,38)	4,11 (0,21)
Matéria mineral	20,3 (0,87)	19,9 (0,74)	11,5 (0,06)	1,72 (0,05)
Fibra bruta + NFE*	10,2	11,1	5,50	1,67

(-) não analisado

*Fibra bruta + extrato livre de nitrogênio, calculado pela diferença: 100 – (umidade + proteína bruta + matéria mineral + gordura bruta).

**Classificado como aminoácido condicionalmente essencial

¹Dieta experimental fabricada no laboratório

²Dieta experimental fabricada no laboratório, sem adição de taurina

³ Dieta semiúmida; peixe fresco (predominantemente cavalinha, *Scomber japonicus*): dieta AquaMar (40:60 m/m).

⁴ Peixe fresco picado, cavalinha (*Scomber japonicus*)

⁵ Farinha de resíduo de processamento de peixe Nicoluzzi industria de rações Ltda, Penha, SC, Brasil.

⁶ Fornecido por Guabi Nutrição animal, Campinas, SP, Brazil.

⁷ Fornecido por Polinutri Alimentos S.A., Osasco, SP, Brazil.

⁸ 100% óleo peixe (predominantemente anchova, sardinhas, salmão e atum), Omegasur S.A., Mar del Plata, Argentina.

⁹ Aquativ, Diana, Even, France.

¹⁰ AquaMar USP, fornecido por DSM, São Paulo, SP, Brasil. Fornecido(mg/kg dieta pronta): ácido ascórbico , 250.0; DL-pantotenato de cálcio 125.0; cloreto de colina, 750.0; Inositol, 400.0; ácido fólico 6.0; biotina, 0.6; niacina, 100; vitamina A (6,000.0 UI/kg); vitamina D3 (2,000.0 UI/kg), ; vitamina E, 350.0; vitamina K3, 5.0; vitamina B1, 35.0; vitamina B2, 25.0; vitamina B6, 35.0; vitamina B12, 0.1; Se, 0.5; Cr, 0.5; Fe, 100.0; Cu, 10.0; Zi, 150.0; Mg, 25.0; I, 3.0; Co, 0.5.

¹¹ Sweetmix, Sorocaba, SP, Brasil.

Preparação das dietas experimentais

Os ingredientes foram pesados individualmente para a fabricação, sendo os ingredientes de maior inclusão (>5%) pesados em balança de bancada e os ingredientes

de menor inclusão (<5%) em balança semianalítica, estes foram misturados primeiramente, com uma pequena porção de farinha de trigo e adicionados a uma batedeira planetária industrial (Modelo ES-600, Hobart, OH, EUA, Figura 2.4), onde foram misturados com os demais ingredientes secos por 10 minutos. Após, essa mistura, os ingredientes líquidos, incluindo água destilada quente (aproximadamente 20% do peso total da dieta) foram adicionados e misturados por mais 10 minutos. Essa mistura foi então prensada a frio (45 °C) produzindo péletes de 10 mm (10 mm de diâmetro e 10 mm de largura, afundamento lento), que foram secos em secadora de ar forçado durante uma noite (35 °C a 45 °C, durante 18h).

Figura 2.4 – Processo de preparação das dietas secas: ingredientes previamente homogeneizados em batedeira industrial (A); peletizados a frio em péletes de 10 mm de diâmetro (B); seguido por processo de secagem em câmara adaptada durante 18h.



Fonte – Reprodução acervo pessoal

Após atingir a temperatura ambiente os péletes foram armazenados em sacos plásticos vedados e mantidos em freezer (-15 °C) até a sua utilização. A dieta semiúmida foi preparada a partir da mistura da dieta AQ, adicionado de peixe fresco moído na proporção de 60% e 40% de peso úmido, respectivamente, e posteriormente prensada a frio no tamanho de 10 mm, os péletes úmidos foram estocados em freezer (-15 °C), e

retirados no dia de uso para descongelamento. De mesmo modo, a dieta PF foi mantida em freezer e sempre retirada anteriormente ao seu uso na alimentação, sua preparação foi feita retirando cabeça, vísceras e nadadeiras de peixe fresco (cavalinha) e cortado manualmente em pequenos pedaços (10 mm) para o uso. A composição de aminoácidos para as dietas AQ e PF são apresentados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Composição de aminoácidos (% ,dieta seca) das dietas experimentais para juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*.

	AquaMar (AQ)	Peixe fresco (PF)
<i>Aminoácidos essenciais</i>		
Arginina	2,92	4,28
Histidina	1,04	3,11
Isoleucina	1,41	3,19
Leucina	3,68	5,32
Lisina	2,73	5,84
Metionina	1,13	2,12
Fenilalanina	1,70	2,74
Treonina	1,79	3,33
Triptofano*	0,28	0,49
Valina	1,89	3,62
Taurina*	1,04	0,57
<i>Aminoácidos não essenciais</i>		
Cistina	0,85	1,56
Tirosina	1,23	2,37
Serina	1,89	2,80
Glicina	4,62	3,89
Ácido aspártico	3,02	7,07
Ácido glutâmico	6,32	9,50
Prolina	3,21	2,64
Alanina	3,11	4,32
Soma dos aminoácidos	43,4	68,7

*Considerado como condicionalmente essencial no presente estudo.

A alimentação foi realizada uma vez ao dia, sete dias na semana, no período da manhã (08:00), sempre por um mesmo tratador, sendo assim definida a partir da observação dos animais durante o período de aclimatação (1 semana) e considerando os resultados do primeiro teste realizado. A sequência de alimentação entre os tanques

foi sempre realizada de forma aleatória, sendo feito duas rodadas, de modo a confirmar a saciedade aparente dos peixes.

Parâmetros de qualidade da água como temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido foram monitorados duas vezes ao dia (09:00 a.m. e 16:00 p.m.)

Cálculos de desempenho

Ao início de cada um dos experimentos os peixes foram submetidos a um banho de água doce de 5 minutos (ROUMBENDAKIS et al., 2013), como profilaxia e retirada de possíveis parasitas. Os animais foram pesados individualmente ao início e ao final do experimento em balança semianalítica digital (Sartorius CPA 22025, Goettingen - Alemanha), pesagens intermediárias não foram realizadas devido a particularidades da espécie (estresse, demora a retornar à alimentação após manejo). O consumo de ração foi medido diariamente para utilização em cálculos do fator de conversão alimentar, custo de produção e traçar o perfil alimentar diário da espécie.

O desempenho alimentar e de crescimento de juvenis de garoupas foram calculadas utilizando as seguintes equações.

Ganho de peso (%) = (peso final – peso inicial) /peso inicial * 100.

TCE (% dia⁻¹) = (ln peso final – ln peso inicial) /dias *100

Produção (kg/m³) = peso final total por tanque *1000/volume do tanque

Fator de conversão alimentar (FCA)= Consumo total de ração/ (peso final total-peso inicial total).

O FCA é uma medida de produtividade animal, calculado pela razão entre o volume consumido de alimento e a biomassa produzida, quanto menor for o valor dessa razão, maior é a eficiência alimentar.

Sobrevivência (%) = 100* (número de peixes final /número de peixes inicial)

Gasto com ração por kg produzido (R\$/kg) = Preço da dieta*FCA,

Onde os preços das dietas fabricadas foram calculados baseados nos valores médios praticados pela indústria e com base nos ingredientes utilizados, (preços de 6,81

e 6,02 R\$/kg para as dietas AQ e AQ-T respectivamente), preço do peixe fresco utilizados foi baseado em valores do mercado de peixe local (2,67 R\$/kg), e o custo do SU (5,13 R\$/kg) foi calculado pelos valores anteriores na proporção da mistura de preparação da dieta.

Composição centesimal de aminoácidos em juvenis de garoupa-verdadeira, cálculos de retenção de nutrientes

A partir dos valores de composição corporal obtidos ao início e ao final do experimento de dietas práticas foram calculados o percentual de retenção de nutrientes (ERN, todos tratamentos) e aminoácidos (AQ e PF) de acordo com os cálculos descritos a seguir (adaptado STOREBAKKEN; SHEARER; ROEM, 1998):

$$\text{ERN (\%)} = 100 * [(Pf * Nf) - (Pi * Ni)] / (Cdieta * Ndieta)$$

Onde Pf corresponde ao peso final dos peixes, Pi ao peso inicial, Nf ao conteúdo final do nutriente na carcaça, Ni ao conteúdo inicial na carcaça, Cdieta ao consumo de ração durante o período de experimento e Ndieta ao teor do nutriente presente na dieta.

Estimativa da exigência de aminoácidos essenciais

Foram utilizadas duas diferentes metodologias para estimar a exigência de aminoácidos essenciais (AAE) de juvenis de garoupa-verdadeira. Essas duas metodologias baseiam-se na composição corporal dos animais, alimentados por dietas de alto rendimento. No caso, foram escolhidas as dietas AQ e PF, para fins de comparação.

Método 1: Foi traçado o perfil de aminoácidos do corpo de juvenis de garoupa e utilizado para o cálculo da razão A/E, que consiste em: $A/E = [(AAE_{ind}/AAE_{total}) * 1000]$, sugerido por ARAI (1981), onde AAE_{ind} é o teor de cada aminoácido essencial na carcaça do animal em peso seco, e AAE_{total} corresponde ao teor total de aminoácidos na carcaça animal, também em peso seco. A exigência de aminoácidos é então calculada a partir de um valor pretérito já conhecido para a espécie/família (exigência de lisina ou metionina). Para o cálculo de exigência foi utilizado o valor definido de 2,8% de lisina em

dietas secas para garoupa (*Epinephelus* spp., NRC 2011), segundo a fórmula sugerida por KAUSHIK (1998), utilizando as razões A/E calculadas anteriormente:

AAExigência=

$[(\text{Exigência de lisina} * \text{A/E de cada aminoácido essencial}) / (\text{A/E calculado para lisina})]$

Método 2: O segundo método utilizado para o cálculo da exigência de aminoácidos também está relacionado ao teor corporal do animal, e é calculado a partir da seguinte equação:

$\text{AAExigência} = [(\% \text{PBdieta} * \text{Q} * \text{Z}) / 10000]$

Onde %PBdieta corresponde ao valor de proteína bruta (PB) da dieta, Q corresponde ao somatório dos aminoácidos essenciais mais cistina e tirosina (valor em %), perfazendo o valor de 35% da PB exigida pela espécie, e Z corresponde porcentagem de cada aminoácido essencial em relação ao somatório dos demais aminoácidos essenciais, incluindo cistina e tirosina (TACON, 1989)

Análises químicas

Amostras de ingredientes, dietas preparadas e carcaça utilizadas para análises foram coletadas e sempre estocadas em freezer (-15 °C). Para a realização de análise todas as amostras passaram por processo de preparação, que envolveu a moagem para homogeneização, seguido de secagem em estufa (103 °C) até atingir peso constante, a partir desse tratamento foram tomados os valores do teor de umidade das amostras. Após essa secagem uma nova moagem foi realizada, e por fim as amostras foram acondicionadas em embalagens herméticas no freezer, até o seu uso.

As análises de composição centesimal de ingredientes, dietas e peixes foram realizados no próprio Laboratório de Aquicultura (LAM), sendo quantificados por metodologias padrões, descritas em AOAC (2005). A análise da matéria mineral foi realizada pelo método gravimétrico, diferença do peso antes e após a queima em mufla (600 °C por 4 horas), sendo as amostras retiradas do forno e resfriados à temperatura ambiente em dessecador para a apuração do teor mineral. O teor de proteína bruta foi obtido a partir da análise do nitrogênio total nas amostras, de acordo com o método Kjeldahl, utilizando digestão ácida (H₂SO₄) em bloco digestor (Kjeltec 8200, Foss, DK) a 420 °C e catalisado pela inclusão de sulfato de cobre no processo, seguido pela

destilação em equipamento específico (kjeltec 8200, Foss) com água destilada, hidróxido de sódio (40% p:v), ácido bórico (30%), e a presença de indicadores (verde de bromecrasol e vermelho de metila). Após a recuperação do nitrogênio no processo de destilação, o volume obtido foi titulado com ácido clorídrico padronizado (0,1 N) até atingir o “ponto de viragem”. Para chegar ao valor de proteína bruta das amostras, o valor obtido de nitrogênio na amostra foi multiplicado pelo fator empírico de 6,25 (AOAC- 0976.05). O teor de gordura foi obtido a partir da extração de lipídeos em equipamento específico (ST255, Soxtec, FOSS), utilizando como solvente o éter de petróleo a temperatura de 235 °C, e medido a partir do peso recuperado de gordura das amostras.

O conteúdo de aminoácidos nas dietas e peixes (tratamentos AQ e PF) foi analisado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em laboratório comercial (CBO Análises Laboratoriais, Campinas, SP, Brasil), com derivatização em pré-coluna de fenilsotiocianato (WHITE; HART; FRY, 1986; HAGEN; FROST; AUGUSTIN, 1989). A análise do triptofano ocorreu de forma separada, após preparo com hidrólise alcalina utilizando óxido de lítio (LUCAS; SOTELO, 1980).

Cálculos estatísticos

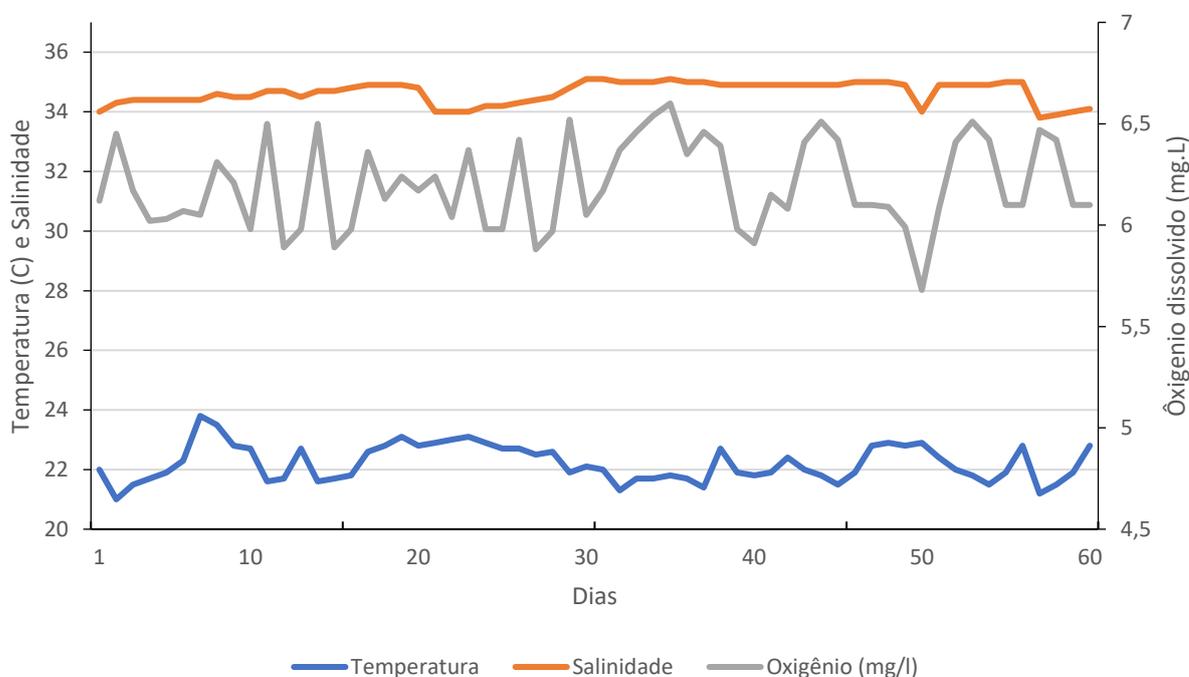
Nos dois experimentos foram utilizados o delineamento inteiramente casualizado. Cada tanque foi considerado como uma unidade experimental, e o valor médio das quadruplicatas para cada tratamento foi utilizado para as análises estatísticas. Todos os resultados obtidos foram submetidos a testes de normalidade de Shapiro-Wilk e para homogeneidade das variâncias foi utilizado o teste de Levene. Satisfeitas as premissas, os dados foram submetidos à análise de estatística paramétrica. Para as análises de variância foram utilizados teste ANOVA de um fator, e dois fatores, conforme a adequação aos dados. Observadas diferenças entre as médias, os dados foram submetidos a análise pós-hoc de Tukey, utilizando IBM SPSS Statistics for Windows, versão 20.0 (IBM Corp., Armonk, NT). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ (ZAR, 1984).

RESULTADOS

Experimento 1 – Frequência alimentar e densidade de estocagem

O primeiro experimento com duração de 60 dias foi realizado durante o outono, sem controle externo da temperatura d'água, estando sujeito ao clima local. As flutuações diárias desse parâmetro, bem como da salinidade e do oxigênio dissolvido são apresentados na Figura 2.5. A temperatura não apresentou grandes flutuações durante o período, com um valor médio de 22,0 °C, de mesmo modo, a salinidade se manteve estável (média de 34,6 ppt), sendo sempre que necessário (>35 ppt) corrigida por adições de água doce. Os valores de oxigênio dissolvido se mantiveram sempre em níveis de segurança para a espécie, com média de 6,2 mg/L e concentração sempre acima de 5,50 mg/L. Os valores médios de amônia total e nitrito estiveram sempre em valores considerados ideais, sendo 0,15 mg/L e 0,5 mg/L respectivamente. Para o pH os valores variaram de 7,5 a 8,0, sendo o valor médio de 7,64 para o período.

Figura 2.5 – Variação de temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido medidos durante 60 dias de período experimental com juvenis de garoupa-verdadeira em sistema recirculante de água salgada.



Fonte – Gráfico produzido a partir de dados obtidos no presente estudo.

O desempenho de crescimento e da eficiência na utilização da alimentação são apresentados na Tabela 2.5. Em geral, não foram encontradas diferenças significativas quando comparados os parâmetros de crescimento entre os tratamentos, com uma sugestão de melhor desempenho para os animais alimentado mais vezes ao dia. Por outro lado, os valores de consumo de ração e FCA apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), sendo maior para os tratamentos de baixa densidade com alimentação 2x ao dia (BD2x), ou contínua (BD24h), quando comparado aos tratamentos de alta densidade. Como era esperado, o consumo total de ração foi maior para os tratamentos de alta densidade quando comparado a baixa densidade, principalmente devido a diferença de biomassa entre os tratamentos. De mesmo modo, a produção final foi maior para os tratamentos de alta densidade, graças ao crescimento maior, somado ao maior número de peixes por tanques e praticamente não ter ocorrido mortalidade.

O custo parcial de produção, calculado pelo gasto com alimento, seguiu o mesmo desempenho do FCA sendo no geral melhor para os tratamentos de alta densidade, sendo que apenas o tratamento de baixa densidade e 1 alimentação (BD1x) se equiparou a estes.

Tabela 2.5 – Desempenho de crescimento e alimentar de juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, estocados em duas diferentes densidades (Alta densidade: 95 ind/m³ Baixa densidade: 40 ind/m³) e três diferentes regimes alimentares (uma vez ao dia, 1x/dia; Duas vezes ao dia, 2x/dia; contínuo, 24h) após 60 dias de período experimental, utilizando dieta seca AquaMar.

	Baixa densidade (40 ind/m ³)			Alta densidade (95 ind/m ³)		
	Frequência alimentar			Frequência alimentar		
	1x/dia	2x/dia	24h	1x/dia	2x/dia	24h
Peso inicial	9,45 (1,60)	9,51 (1,24)	9,90 (1,25)	9,57 (0,90)	9,71 (0,94)	9,75 (0,33)
Peso final	18,2 (2,70)	18,8 (1,65)	21,4 (2,06)	20,5 (1,12)	21,2 (1,78)	22,2 (1,69)
Ganho de peso ¹ (%)	94,5 (18,9)	100,1 (28,0)	117,6 (12,8)	115,4 (13,5)	119,0 (4,8)	127,9 (11,2)
TCE ²	1,10 (0,16)	1,14 (0,23)	1,29 (0,10)	1,27 (0,10)	1,30 (0,03)	1,37 (0,08)
Consumo total	208,7 ^a (26,0)	267,5 ^b (22,2)	310,0 ^b (12,9)	434,5 ^c (29,0)	497,9 ^d (33,8)	518,2 ^d (12,5)
Sobrevivência	100 (0,00)	100 (0,00)	100,00	99,3 (0,66)	100 (0,00)	99,3 (0,66)
Produção(kg/m ³) ³	730,4 ^a (108,0)	752,8 ^a (66,1)	858,1 ^a (82,7)	1938,6 ^b (113,5)	2018,8 ^b (170,0)	2101,2 ^b (182,7)
FCA ⁴	1,50 ^{ab} (0,20)	1,85 ^a (0,46)	1,69 ^a (0,19)	1,05 ^b (0,02)	1,13 ^b (0,06)	1,13 ^b (0,19)
Custo da ração por kg de peixe produzido ⁵	10,2 ^{ab} (1,40)	12,6 ^a (3,17)	11,5 ^a (1,29)	7,19 ^b (0,10)	7,73 ^b (0,43)	7,68 ^b (1,31)

Valores em média (DP) para 4 réplicas por tratamento. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

¹ Ganho de peso (%) = (peso final – peso inicial) / peso inicial * 100

² TCE – Taxa de crescimento específico (% dia⁻¹) = (ln peso final – ln peso inicial) / dias * 100.

³ Produção (kg/m³) = (peso total por tanque) * 1000/volume do tanque

⁴ FCA: fator de conversão alimentar = alimento total consumido (g) / [biomassa final (g) – biomassa inicial (g)].

⁵ Custo de ração por kg de peixe produzido (R\$/kg) = preço da dieta * FCA, preços foram considerados como se segue: AQ e AQ-T foram calculados a partir dos preços médios da indústria (R\$/kg 6,81 e 6,02 para AQ e AQ-T respectivamente), preço do peixe fresco utilizado baseado nos valores de mercado de peixe local (2,67 R\$/kg), e o custo do semiúmido (R\$ 5,13/ kg) foi calculado pelos valores anteriores na proporção da mistura de preparação da dieta.

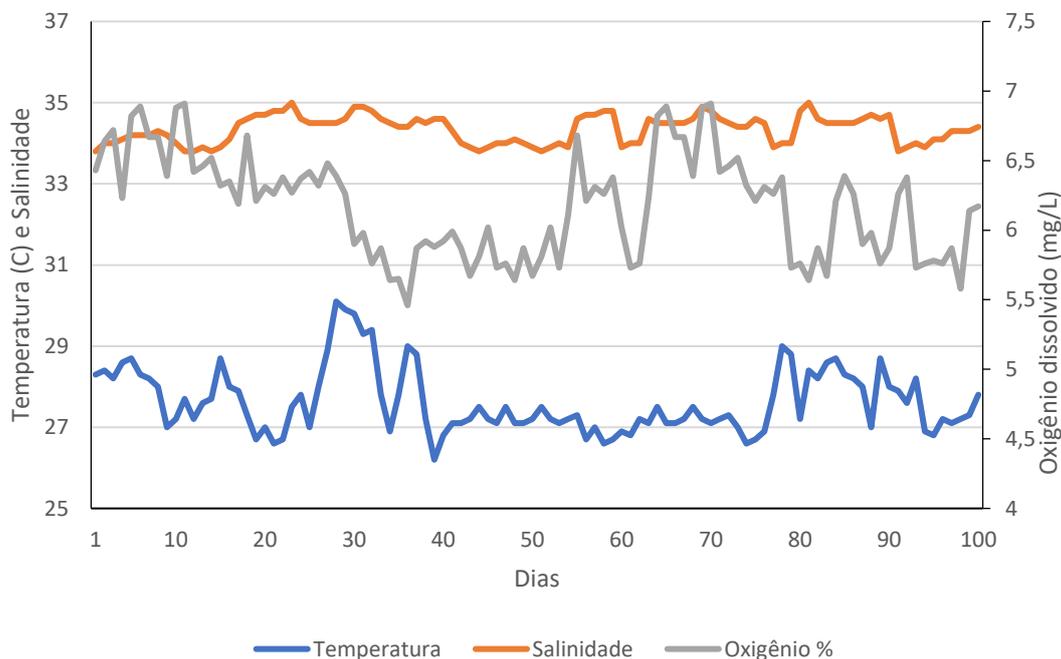
Foi realizada a análise da variância com duas vias, utilizando como variáveis independentes a densidade de estocagem e a frequência alimentar, e esta apontou diferenças significativas ocasionadas por essas duas variáveis. A densidade alta de estocagem teve influência positiva sobre o peso final ($P=0,029$), ganho de peso ($P=0,024$), FCA ($P<0,001$), produção ($P<0,001$), consumo ($P<0,001$) e custo ($P<0,001$). Enquanto que a variável de frequência alimentar afetou apenas o consumo total ($P<0,001$), sendo diferente entre as três frequências. Não foi encontrado em nenhum dos parâmetros analisados a interação entre densidade de estocagem e frequência alimentar ($P>0,05$).

Esses resultados deixam claro que nessas condições de criação, juvenis de garoupa foram afetados positivamente pela densidade de estocagem mais alta, enquanto a frequência alimentar teve pouca ou nenhuma influência sobre o desempenho final. É possível destacar ainda alta sobrevivência dos animais em todos os tratamentos, não sendo registrada mortalidade significativa nem a ocorrência de canibalismo.

Experimento 2 – Dietas práticas

O experimento com dietas práticas com juvenis de garoupas teve duração de 100 dias, e foi realizado durante o período de verão e outono (fevereiro a maio), com a utilização de aquecimento no sistema, com isso a temperatura média foi de 28,3 (+- 1,48) °C, com uma amplitude de pouco mais de 2 °C durante o período experimental. Assim como a temperatura, a salinidade teve pouca variação durante o período experimental, com valor médio de 34,4 (0,8) ppt, e uma amplitude de pouco mais de 1,5 ppt, sendo esta corrigida pela adição de água doce (Figura 2.6). O oxigênio dissolvido se manteve sempre em valores ideais para o cultivo, graças ao suporte de aeração nos tanques, com valor médio de 6,17 (0,43) mg/L, com valor mínimo de 5,40 mg/L no período estudado. A concentração de compostos nitrogenados foi monitorada semanalmente, com valores médios de 0,13 (0,07) e 0,54 (0,21) mg/L para a amônia e o nitrato, respectivamente. A variação de pH esteve entre 7,5 e 8,0 durante todo o período estudado, sendo o valor médio obtido de 7,88 (0,16).

Figura 2.6 – Variação de temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido medidos diariamente, durante 100 dias de período experimental com juvenis de garoupa-verdadeira em sistema recirculante de água salgada.

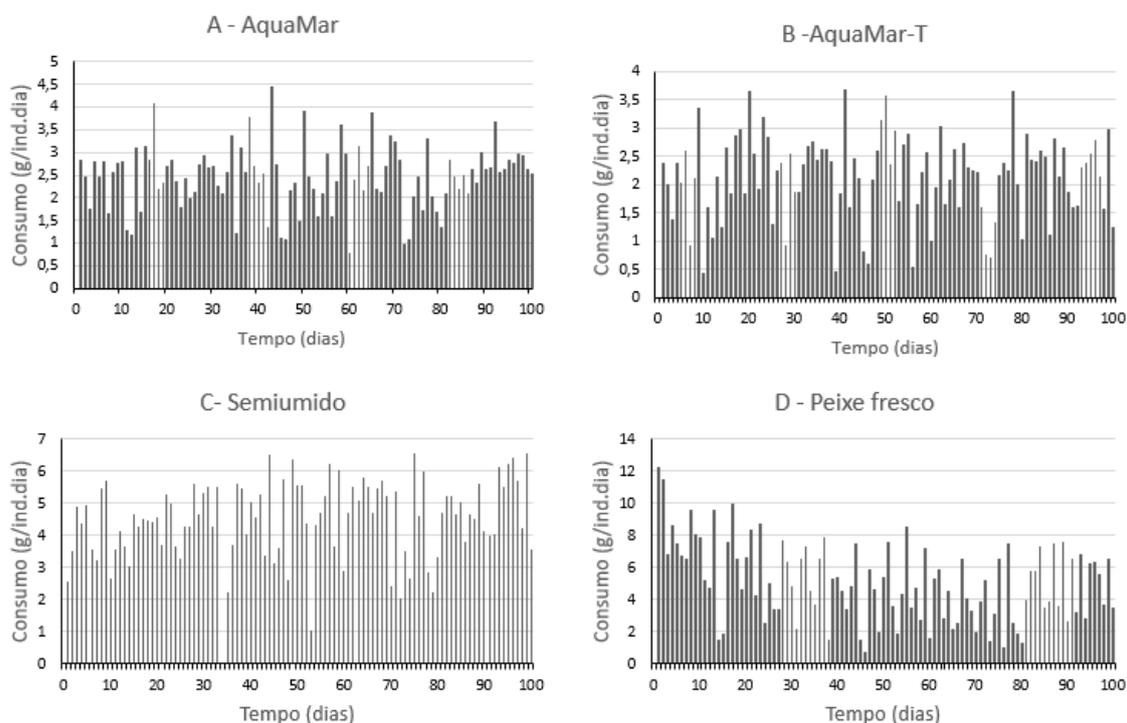


Fonte – Gráfico produzido a partir de dados obtidos no presente estudo.

O padrão de alimentação diário foi monitorado durante todo o experimento, variando consideravelmente durante o período (Figura 2.7, A-D). Em todos os tratamentos é possível observar que o consumo individual de dieta alternou sucessivamente entre períodos de alto e reduzido consumo, sendo que em nenhum dos tratamentos é notado o consumo de alimento estável durante o período. Em geral, foram observados dias com maior consumo, seguido por períodos de 2 a 3 dias de consumo reduzido. Entre os tratamentos, é possível observar que a dieta SU foi a que apresentou relativamente mais dias de consumo reduzido em comparação as outras dietas. A flutuação no consumo de alimento, denotada pelos intervalos de redução de ingestão das dietas testes, observado em todos os tratamentos sugerem um comportamento alimentar descontínuo para juvenis de garoupa, submetidos as presentes condições experimentais.

Ainda a partir da Figura 2.7 de consumo individual diário, é possível aferir que não houve um incremento considerável entre o início e o final de 100 dias de experimento, apesar do crescimento dos animais, e a biomassa final nos tanques ter praticamente dobrado ou chegado próximo a isso em todos os tratamentos.

Figura 2.7 - Consumo individual de alimento de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, alimentado com as dietas AquaMar (A), AquaMar-T (B), Semiúmido (C) e peixe fresco (D), durante 100 dias em sistema de recirculação de água salgada.



Fonte – Gráficos produzidos a partir de dados obtidos no presente estudo.

O desempenho da garoupa alimentada com as diferentes dietas experimentais durante o período experimental de 100 dias é apresentado na Tabela 2.6. A sobrevivência não foi afetada pelos tratamentos, sendo de 100% para todos, demonstrando novamente a aceitação ao cultivo no tipo de sistema utilizado, bem como aos diferentes tipos de dietas propostas. Por outro lado, o peso final e o ganho de peso foram significativamente afetados pelo tratamento dietético ($P < 0,05$). O peso corporal final dos peixes, ganho de peso e taxa de crescimento específico (TCE) foram maiores para os peixes alimentados com as dietas AquaMar (AQ) e o preparado semiúmido (SU), enquanto os peixes alimentados com a dieta não suplementada de taurina (AQ-T), apresentaram menor crescimento, ganho de peso e TCE em comparação as dietas AQ e SU ($P < 0,05$). O consumo de alimento, como era de se esperar foi maior para as dietas de alta umidade, SU e peixe fresco (PF) (teor de umidade de 36,3 e 72,5% respectivamente), quando comparado as dietas secas, porém, utilizando o peso seco para o cálculo de consumo, os peixes alimentados com PF tiveram o menor consumo de dieta no geral, sendo que a dieta SU se manteve acima das dietas secas (AQ e AQ-T).

Os valores de FCA considerando o peso úmido das dietas, foi menor para o tratamento AQ quando comparado aos tratamentos SU e PF, sem diferença significativa quando comparado ao tratamento AQ-T. Ao se considerar o peso seco para o cálculo, a dieta PF foi a que apresentou o menor FCA dentre os tratamentos. O cálculo do custo de ração por quilo produzido de peixe demonstrou que a dieta AQ é a mais vantajosa entre os tratamentos, com valor de R\$ 9,96 de gasto por quilo produzido, valor próximo ao se utilizar a dieta PF, estando bem abaixo dos valores previstos com a utilização das dietas AQ-T e SU, com valores de R\$ 12,73 e 13,83 por quilograma de peixe respectivamente.

Tabela 2.6 - Crescimento e desempenho alimentar de juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, alimentados com diferentes dietas; duas dietas secas (AQ e AQ-T); semiúmido e peixe fresco, após o período de 100 dias de experimento em sistema de recirculação de água salgada.

	AquaMar (AQ)	AquaMar -T (AQ-T)	Semiúmido (SU)	Peixe fresco (PF)
Peso inicial (g)	143,2 (1,14)	142,9 (1,38)	144,8 (3,30)	143,9 (2,37)
Peso final (g)	313,5 ^a (16,5)	242,6 ^b (22,8)	322,0 ^a (50,4)	274,0 ^{ab} (18,5)
Ganho de peso ² (%)	118,9 ^a (12,0)	69,7 ^b (15,5)	121,9 ^a (30,9)	90,5 ^{ab} (15,7)
TCE ² (%/dia)	0,78 ^a (0,05)	0,52 ^b (0,08)	0,79 ^a (0,14)	0,64 ^{ab} (0,08)
Consumo total (kg dieta úmida/m ³)	9,25 ^a (0,39)	7,73 ^a (0,48)	17,1 ^b (1,88)	19,0 ^b (1,55)
Consumo total (kg dieta seca/m ³)	8,74 ^a (0,37)	7,30 ^a (0,45)	10,7 ^b (1,19)	5,14 ^c (0,42)
Consumo diário individual (g, dieta úmida)	2,46 ^a (0,11)	2,05 ^a (0,13)	4,55 ^b (0,50)	5,07 ^b (0,41)
Sobrevivência (%)	100,0	100,0	100,0	100,0
Produção ³ (kg/m ³)	11,7 ^a (0,62)	9,10 ^b (0,86)	12,1 ^a (1,90)	10,3 ^{ab} (0,70)
FCA _{MU} ⁴	1,46 ^a (0,21)	2,12 ^{ab} (0,32)	2,69 ^b (0,65)	3,94 ^c (0,39)
FCA _{MS} ⁵	1,37 ^{ab} (0,20)	2,00 ^c (0,30)	1,69 ^{bc} (0,41)	1,06 ^a (0,10)
Preço/kg de produção ⁶ (R\$/kg)	9,96 (0,28)	12,73 (0,37)	13,83 (0,64)	10,53 (0,19)

Valores em média (DP) para 4 réplicas por tratamento. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

¹ Ganho de peso (%) = (peso final – peso inicial) / peso inicial * 100

² TCE – Taxa de crescimento específico (% dia⁻¹) = (ln peso final – ln peso inicial) / dias * 100.

³ Produção (kg/m³) = (peso total por tanque) * 1000 / volume do tanque

⁴ FCA_{MU}: fator de conversão alimentar = alimento total consumido (g) / [biomassa final (g) – biomassa inicial (g)].

⁵ FCA_{MS}: fator de conversão alimentar baseado no peso seco das dietas

⁶ Custo de ração por quilo produzido (R\$/kg) = preço da dieta * FCA, preços foram considerados como se segue: AQ e AQ-T foram calculados a partir dos preços médios da indústria (6,81 e 6,02 R\$/kg para AQ e AQ-T respectivamente), preço do peixe fresco utilizado baseado nos valores de mercado de peixe local (2,67 R\$/kg), e o custo do semiúmido (R\$ 5,13/ kg) foi calculado pelos valores anteriores na proporção da mistura de preparação da dieta.

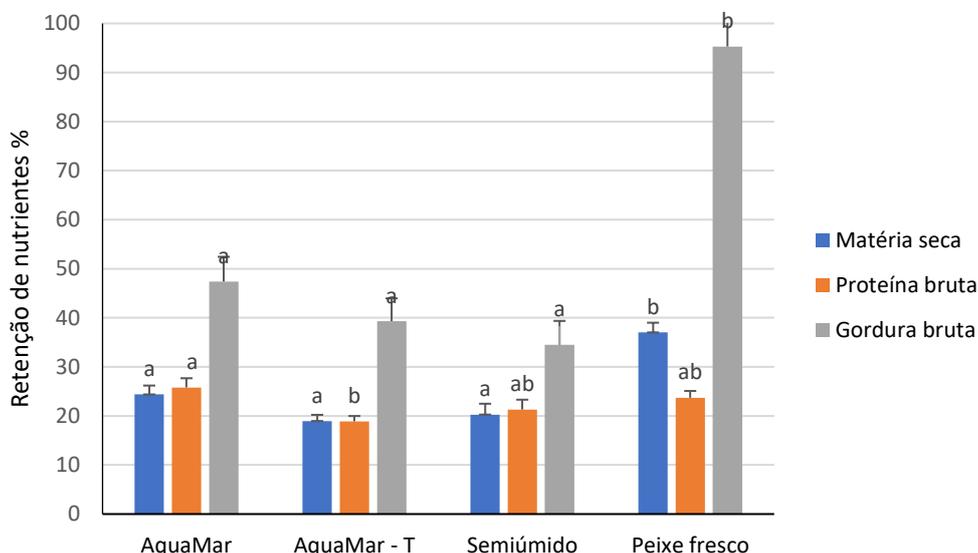
A composição centesimal da carcaça de garoupas antes do experimento e após 100 dias submetidas aos 4 tratamentos alimentares é apresentada na Tabela 2.7. A composição dos peixes ao início do experimento, em geral, possuiu maior teor de umidade, proteína bruta e matéria mineral quando comparado aos peixes alimentados com as dietas experimentais, principalmente quando comparado a dieta PF, que apresentou as menores concentrações desses nutrientes, sendo significativamente menor que o peixe inicial e também aos demais tratamentos. Por outro lado, o teor de gordura apresentou grande aumento nos indivíduos maiores ao final do experimento, principalmente para a dieta PF ($P < 0,05$) que apresentou teores de gordura acima de 30% (matéria seca). Pode se destacar ainda a concentração de proteína nos peixes alimentados com a dieta SU, que apresentou valores de 59,3% de proteína em sua composição, significativamente maior que os demais tratamentos, com um teor de proteína muito próximo ao peixe inicial.

Tabela 2.7 - Composição centesimal do corpo todo (% matéria seca, exceto umidade) de juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, ao início e após 100 dias de experimento alimentados com 4 dietas teste. Composição centesimal é apresentada pela média (DP), n=4.

	Peixe inicial	AquaMar (AQ)	AquaMar-T (AQ-T)	Semiúmido (SU)	Peixe Fresco (PF)
Umidade	71,2 ^a (0,79)	68,8 ^b (0,57)	67,8 ^c (0,45)	68,7 ^{bc} (0,39)	66,0 ^d (0,92)
Proteína bruta	59,1 ^a (0,13)	56,4 ^b (1,57)	55,2 ^b (0,68)	59,3 ^a (2,03)	51,8 ^c (1,33)
Gordura bruta	21,3 ^a (0,90)	24,1 ^{ab} (1,63)	24,4 ^b (2,09)	25,5 ^b (1,98)	30,6 ^c (1,33)
Matéria mineral	18,5 ^a (0,60)	16,4 ^b (0,61)	17,0 ^{ab} (1,04)	16,5 ^b (1,95)	14,0 ^c (1,06)

Foi analisada a eficiência de retenção de matéria seca, proteína bruta e gordura bruta nos animais submetidos as dietas experimentais (Figura 2.8). A eficiência de retenção de gordura foi maior em relação a proteína e matéria seca para todos os tratamentos, enquanto as duas últimas alternaram conforme o tratamento. Comparando a eficiência entre as dietas, a eficiência na retenção de matéria seca e principalmente gordura (>90%) foi significativamente maior ($P < 0,05$) para os animais submetidos ao alimento PF. Já para a proteína não foram encontradas diferenças entre PF e as demais dietas ($P > 0,05$), sendo que, apenas a dieta AQ-T apresentou eficiência significativamente menor, quando comparada a dieta AQ ($P < 0,05$).

Figura 2.8 - Eficiência de retenção corporal para matéria seca, proteína bruta e gordura bruta em juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, alimentados com 4 dietas experimentais, durante o período de 100 dias. Dados são apresentados em média e barras de desvio padrão (n=4). Diferentes letras sobrescritas sobre o mesmo nutriente indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P<0,05$).



Fonte – Gráfico produzido a partir da dados obtidos no presente estudo

A composição corporal de aminoácidos de peixes inicial e submetidos aos tratamentos AQ e PF são apresentados na Tabela 2.8. Os níveis de aminoácidos na carcaça de garoupa foram ligeiramente superiores nos peixes inicial e AQ em comparação ao tratamento PF, como pode ser observado pela soma dos aminoácidos (proteína verdadeira). A composição de individual de aminoácidos foi de 3 a 5% inferior no tratamento PF em relação ao AQ, com pequenas exceções, como para o ácido aspártico e para o triptofano, que foram superiores no tratamento PF. A taurina foi outro aminoácido que esteve fora dessa pequena variação, possuindo um teor mais de 100% superior para os animais alimentados com a dieta AQ, quando comparados a dieta PF, sendo essa muito inferior também ao perfil inicial encontrado.

Tabela 2.8 - Composição corporal de aminoácidos (% matéria seca) de juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, ao início e após 100 dias de experimento alimentados com as dietas AQ e PF.

	Peixe inicial	AquaMar (AQ)	Peixe fresco (PF)
<i>Aminoácidos essenciais</i>			
Arginina	3,55	3,63	3,48
Histidina	1,03	1,01	0,98
Isoleucina	2,11	1,95	1,88
Leucina	3,62	3,42	3,32
Lisina	3,30	3,70	3,53
Metionina	1,53	1,48	1,44
Fenilalanina	2,07	2,03	1,95
Treonina	2,33	2,37	2,30
Triptofano	0,43	0,41	0,44
Valina	2,31	2,17	2,09
Taurina*	0,93	1,05	0,45
<i>Aminoácidos não essenciais</i>			
Cistina	1,21	1,84	1,72
Tirosina	1,53	1,42	1,36
Serina	2,24	2,29	2,24
Glicina	5,45	5,94	5,81
Ácido aspártico	4,56	4,67	4,70
Ácido glutâmico	7,22	6,97	6,78
Prolina	3,23	3,32	3,19
Alanina	3,98	4,12	3,96
Proteína verdadeira (Σ dos aminoácidos)	52,6	53,7	51,6

*Considerado condicionalmente essencial no presente estudo

Na Tabela 2.9 a composição de aminoácidos é expressa pela contribuição individual de cada aminoácido sobre o total de aminoácidos encontrado no corpo inteiro dos animais. Essa tabela além de comprar a carcaça de peixes alimentados com as dietas AQ e PF, também apresenta valores dessa mesma composição para outras espécies de peixes.

Ao comparar os dois tratamentos deste estudo, são observadas algumas diferenças entre eles, sendo que, peixes alimentados com a dieta PF sugerem níveis mais altos de leucina, treonina, triptofano, serina, ácido aspártico entre outros, o que não era observado ao analisar o teor de aminoácidos corporal (Tabela 2.8). Por outro lado, a contribuição de taurina para o teor total de aminoácidos se manteve maior para o tratamento AQ em relação ao PF, sendo ainda mais de 100% superior. Apesar dessas diferenças, a variação entre a composição expressada em % da soma dos aminoácidos

foi pequena entre AQ e PF (exceto taurina). A composição de aminoácidos apresentou maior variação quando comparado a outras espécies de peixes marinhos, principalmente para alguns aminoácidos como a isoleucina, lisina, triptofano e valina, que foram menores na garoupa. Pode-se observar ainda que a concentração de aminoácidos não-essenciais apresentou maior porcentagem em relação ao total na garoupa quando comparada às demais espécies apresentadas.

Apesar de algumas diferenças, de maneira geral, os teores de aminoácidos individuais (em relação a soma de AA) obtidos com a garoupa-verdadeira apresentam alta correlação com os valores apresentados de outras espécies ($R^2 > 0,90$).

Tabela 2.9 - Composição de aminoácidos corporal de juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, e outras espécies de peixes marinhos (valores expresso em % da soma dos aminoácidos).

	Garoupa (AquaMar) ¹	Garoupa (Peixe fresco) ¹	Pampo (<i>Trachinotus marginatus</i>) ²	Salmão do Atlântico (<i>Salmo salar</i>) ³	Bijupirá (<i>Rachycentron canadum</i>) ⁴	Compilado de espécies ⁵
Aminoácidos essenciais						
Arginina	6,75	6,74	6,63	6,61	6,36	6,60
Histidina	1,88	1,90	2,13	3,02	1,93	2,60
Isoleucina	3,63	3,64	2,94	4,41	4,32	4,60
Leucina	6,36	6,43	7,06	7,72	6,32	7,70
Lisina	6,88	6,84	7,93	9,28	8,41	7,90
Metionina	2,75	2,79	3,02	1,83	2,45	2,90
Fenilalanina	3,77	3,78	3,59	4,36	3,52	4,40
Treonina	4,41	4,46	4,00	4,95	4,13	4,70
Triptofano	0,76	0,85	1,04	0,93	1,66	1,10
Valina	4,03	4,05	3,43	5,09	5,22	5,10
Taurina*	1,95	0,87	2,45	-	0,82	-
Aminoácidos não essenciais						
Cistina	3,42	3,33	0,97	0,95	2,45	1,00
Tirosina	2,64	2,63	2,99	3,50	2,87	3,20
Serina	4,26	4,34	4,73	4,61	3,69	4,40
Glicina	11,0	11,3	11,1	7,41	8,35	7,30
Ácido aspártico	8,68	9,10	9,04	9,92	8,10	9,80
Ácido glutâmico	13,0	13,1	13,3	14,3	13,4	15,3
Prolina	6,17	6,18	6,98	4,64	5,04	4,70
Alanina	7,66	7,67	6,77	6,52	6,61	6,60

*Classificado como aminoácido condicionalmente essencial no presente estudo para garoupa-verdadeira

¹ Presente estudo, valores para peixes alimentados com a dieta AquaMar e Peixe fresco.

² TESSER; SILVA; SAMPAIO, 2014.

³ WILSON; COWEY, 1985.

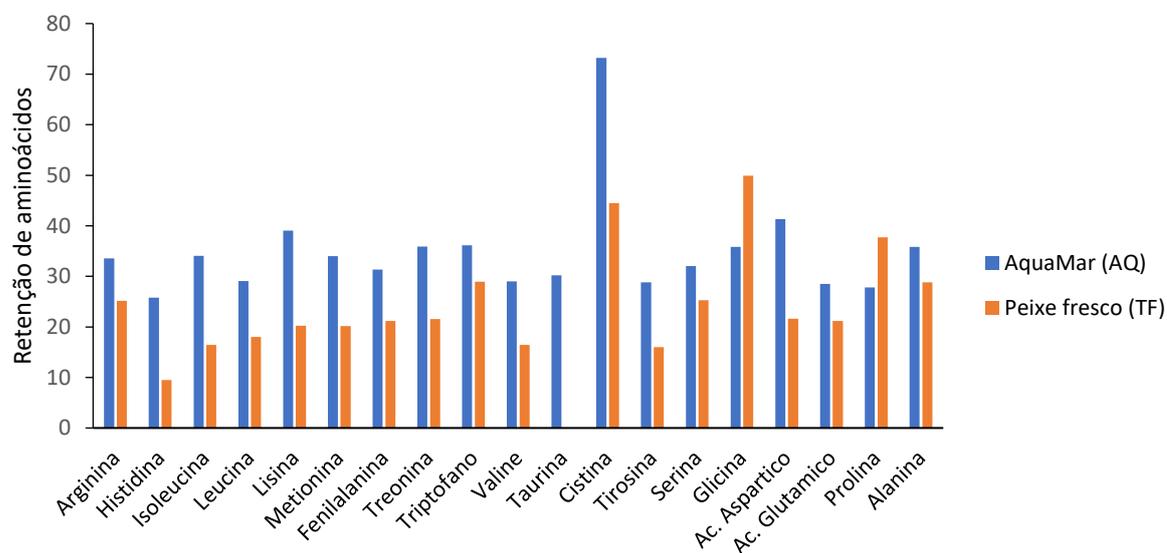
⁴ RAGGI; TACON; LEMOS, 2019.

⁵ Valores médios para um grande compilado de espécies cultivadas (KAUSHIK; SEILIEZ 2010).

(-) não reportado

Assim como para proteína, que a retenção foi ligeiramente melhor para a dieta AQ quando comparada a PF (sem diferença significativa $p>0,05$), a retenção de aminoácidos sugere ser maior para os peixes alimentados com a dieta AQ (Figura 2.9). Os dados mostram uma retenção mínima variando de -0,06% (taurina, PF) até um máximo de 73,2% (cistina, AQ). A retenção média para as dietas AQ e PF foram de 34,8 e 23,3 % respectivamente. Para alguns dos aminoácidos estudados a retenção da dieta AQ foi mais de 100% superior em relação a dieta PF, sendo eles a histidina (172%), isoleucina (106%) e ácido aspártico (103%). Para a lisina (93%), leucina (61%), metionina (68%), valina (76%) e cistina (65%) e tirosina (80%) a retenção foi mais de 50% superior para a dieta AQ. Há ainda que se destacar a alta eficiência de retenção da taurina (30%) para a dieta AQ, contrastando com o valor negativo de retenção (-0,06%) para os animais alimentados com a dieta PF. A eficiência de retenção de aminoácidos para a dieta PF foi superior somente para a glicina e prolina dentre os 19 estudados, entre essenciais e não essenciais.

Figura 2.9 - Eficiência de retenção de aminoácidos (%) em juvenis de garoupa-verdadeira, *Epinephelus marginatus*, alimentados com as dietas AquaMar e peixe fresco, durante o período de 100 dias de experimento em sistema recirculante de água salgada.



*A eficiência de retenção da taurina no tratamento Peixe fresco apresentou valores negativos (-0,06%).

A exigência de aminoácidos em dietas para juvenis de garoupa-verdadeira foi estimada utilizando os valores obtidos pela dieta AQ (melhor aproveitamento e desempenho geral), e o valor quantitativo observado dependeu do método empregado

no cálculo (Tabela 2.10). O método 1, baseado no teor corporal e nas necessidades de lisina resultaram em valores mais baixos de necessidade geral de aminoácidos, quando comparado ao método 2, baseado na soma de aminoácidos corporal e na exigência de proteína bruta. A necessidade de aminoácidos coincidiu com a faixa relatada para outras espécies de garoupa em seis dos dez aminoácidos considerados essenciais, incluindo, arginina, histidina, leucina, lisina, metionina e treonina, sendo a principal diferença encontrada entre as exigências de triptofano, que foram consideravelmente menores quando comparadas a outras espécies de garoupa. Entretanto, quando comparada a exigência de triptofano para a garoupa com a de outra espécie cultivada no Brasil, o bijupirá, os valores foram bem próximos (0,08% em relação ao método 2).

Tabela 2.10 - Estimativa de exigências de aminoácidos em dietas (% de matéria seca) para juvenis de garoupa, *Epinephelus marginatus*, e selecionado de espécies cultivadas.

	<i>Epinephelus marginatus</i>		<i>Trachinotus marginatus</i> ³	<i>Rachycentron canadum</i> ⁴	Epinephelus sp. ⁵	
	Método 1 ¹	Método 2 ²			Min.	Max.
Arginina	2,74	3,39	4,01	1,76	3,09	3,29
Histidina	0,76	0,94	1,29	0,53	0,83	1,23
Isoleucina	1,47	1,82	1,78	1,2	2,19	2,19
Leucina	2,58	3,19	4,27	1,75	3,17	3,37
Lisina	2,8	3,45	4,8	2,33	2,84	3,04
Metionina	1,12	1,38	2,33	1,36	1,37	1,37
Fenilalanina	1,53	1,89	3,99	1,78	1,20	1,20
Treonina	1,79	2,21	2,42	1,14	1,77	1,99
Triptofano	0,31	0,38	0,63	0,46	1,39	1,79
Valina	1,64	2,03	2,08	1,45	2,09	2,29
Taurina	0,78	0,98	-	-	-	-

(-) não analisado

¹ Baseado na composição da carcaça e na exigência de lisina (2.8% da matéria seca (NRC, 2011) sugerido por Kaushik (1998).

² Baseado na soma dos aminoácidos corporal, exigência de proteína bruta e a soma dos aminoácidos essenciais + tirosina + cistina, como sugerido por Tacon (1989).

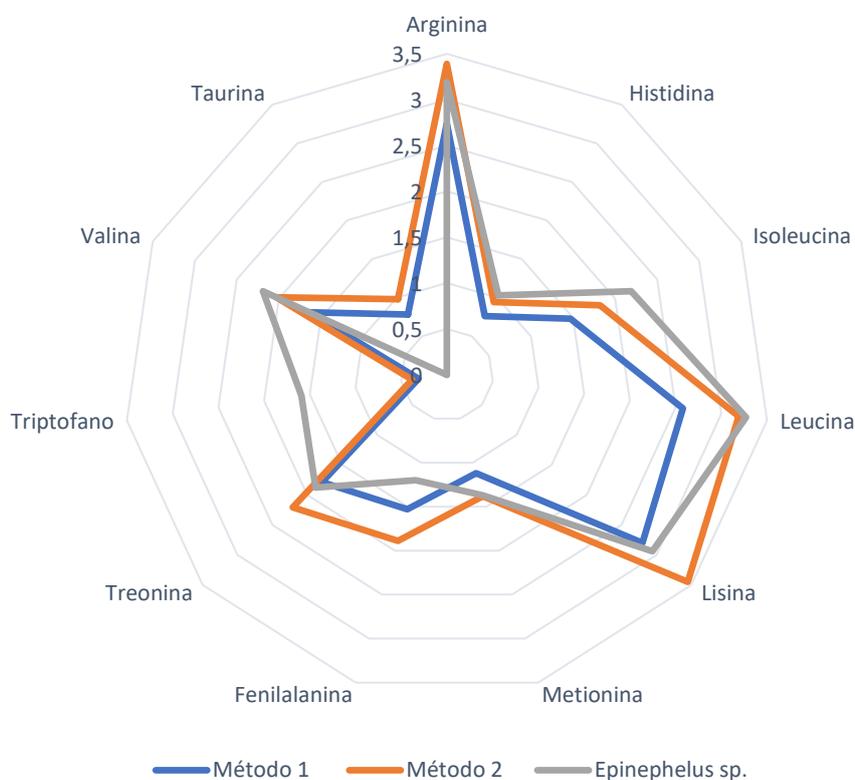
³ Baseado na composição da carcaça e na exigência de lisina (TESSER; SILVA; SAMPAIO, 2014). Exigência de metionina é representada pela soma de metionina mais cistina, e a exigência de fenilalanina é representada pela soma de fenilalanina e tirosina.

⁴ Baseado na composição da carcaça e na exigência de lisina (RAGGI; TACON; LEMOS, 2019). Exigência de metionina é representada pela soma de metionina mais cistina, e a exigência de fenilalanina é representada pela soma de fenilalanina e tirosina.

⁵ Dados obtidos em máximo e mínimo valores para os aminoácidos essenciais indicados para espécies de garoupas, *Epinephelus* sp. (CAI-JUAN; RAMLI; RAHMAN, 2016).

Afim de comparar as diferentes estimativas de exigências, foi elaborado um gráfico do tipo radar (Figura 2.10), em que é possível encontrar uma boa sobreposição de dados entre as estimativas calculadas pelos métodos 1 e 2 no presente estudo, e as estimativas reportadas em literatura para *Epinephelus* spp, principalmente para o segundo método. Nota-se uma diferença principalmente quanto ao triptofano que foi menor no atual estudo, e também à taurina, pois a mesma não apresentou dados pretéritos reportados para garoupa no estudo utilizado.

Figura 2.10 – Gráfico de radar com a comparação de métodos do presente estudo e com a literatura para espécies de garoupa, para a estimativa de exigência de aminoácidos essenciais na dieta (% matéria seca). Método 1, baseado no teor corporal e nas necessidades de lisina (KAUSHIK, 1998), método 2, baseado na soma de aminoácidos corporal e na exigência de proteína bruta (TACON, 1989), *Epinephelus* spp. Baseado em Cai-Juan, Ramli e Rahman, 2016.



Fonte – Figura produzida a partir de dados obtidos no presente estudo, e a partir de dados da literatura (CAI-JUAN; RAMLI; RAHMAN, 2016).

DISCUSSÃO

Sistemas de aquicultura recirculante (RAS, da sigla em inglês Recirculating Aquaculture Systems) estão ganhando mais atenção e interesse, sendo cada vez mais pesquisados e utilizados na criação de animais em ambientes aquáticos. Os RAS são utilizados como sistemas de cultura intensivos e semi-intensivos, onde os animais são estocados em altas densidades e alimentados com dietas comerciais. Esses sistemas possuem grande potencial e apelo sustentável, uma vez que a criação de ambientes estáveis, com reduzido consumo de água e baixa geração de efluentes são princípios norteadores desses sistemas. Os RAS possuem controle da qualidade da água a partir de processos físicos, químicos e biológicos e por serem utilizados como sistemas intensivos de criação, o aumento da biomassa (crescimento dos animais cultivados) acarreta o aumento dos resíduos metabólicos, seguido do aumento ou diminuição das concentrações de uma variedade de constituintes nos sistemas, como compostos nitrogenados, oxigênio e matéria orgânica, onde muito desses podem vir a causar efeitos deletérios no cultivo. Fica claro, portanto a importância de determinação da capacidade e densidades de estocagem ideais para o cultivo, bem como o manejo alimentar adequado, entre outros, que são discutidos a partir de dados obtidos para juvenis de garoupa no presente estudo.

Densidade de estocagem

A densidade de estocagem é considerada uma das peças chaves na aquicultura, não somente em cultivos em RAS, mas em todos os sistemas de criação (ELLIS et al., 2002). A densidade de estocagem ótima além de variar conforme o tipo de sistema empregado, localidade, tamanho dos animais, é sobretudo afetado pela espécie que é trabalhada. Não são claros todos os fatores que afetam a pré-disposição de cada espécie ao adensamento, mas é preconizado que a densidade pode ser aumentada desde que mantidos os níveis de qualidade da água e que não ocorram quedas no desempenho zootécnico da espécie.

Devido a importância e a singularidade de espécie para espécie, muitos estudos avaliaram os efeitos da densidade de criação, sobre aspectos como crescimento,

metabolismo, estresse, dominância, entre outros (MONTERO et al., 1999; SAMAD; ISLAM; KHALEQUE, 2005; MAZLUM, 2007; GARR et al., 2011; ZHU et al., 2011). Apesar de parecer conveniente pela manutenção da qualidade de água, densidades baixas de estocagem não são garantia de boa performance, podendo ocorrer o contrário, dependendo da espécie cultivada (TENG; CHUA, 1978; PIROZZI et al., 2009; SAMAD et al., 2014; SHAO et al., 2019). O primeiro ponto afetado por baixas densidades de estocagem, e também um dos mais importantes, é a produtividade por metro cúbico, que costuma ser reduzido em paralelo a redução de densidades, diminuindo também os lucros devido ao uso ineficiente da capacidade do espaço. Baixas densidades podem ainda ocasionar na diminuição de crescimento, eficiência alimentar, sobrevivência, aumento no estresse, ocorrência de enfermidades e formação de hierarquias de tamanho, principalmente quando a espécie cultivada possuir naturalmente uma pré-disposição a formação de agregações/cardumes (GOMES; SCHLINDWEIN, 2000; SCHWEDLER; JOHNSON, 2000; LAMBERT; DUTIL, 2001). Do mesmo modo, cultivos com o adensamento mal dimensionado, extrapolando a capacidade do sistema, e/ou da natureza da espécie, irão acarretar na piora do desempenho zootécnico do animal, afetando ainda a qualidade da água (RUYETA; BAYON; GROS, 2007; COSTAS et al., 2008; LAIZ-CARRION et al., 2012; SHAO et al., 2019), além de respostas relacionadas ao metabolismo de estresse (COSTAS et al., 2008; LAIZ-CARRION et al., 2012). Logo, fica claro que é importante encontrar um ponto onde seja possível maximizar os lucros e o desempenho do animal, atrelado a minimização dos efeitos deletérios sobre a qualidade da água, sanidade e bem estar dos animais cultivados (ELLIS et al., 2002; ASHLEY, 2007; HERRERA; KUHNEN; SANCHES, 2019).

Resultados de cultivos com diferentes espécies de garoupas apontam que o desempenho e a produtividade podem ser melhorados alterando apenas a densidade de estocagem para essas espécies (TENG; CHUA, 1978; CHUA; TENG, 1978; SALARI et al., 2012; SHAO et al., 2019). Os resultados obtidos no presente estudo apontaram a influência das densidades de estocagem testadas, com melhoras significativas para todos os parâmetros de desempenho para os tratamentos com alta densidade, incluindo ganho de peso, fator de conversão alimentar, e custo de produção. De modo semelhante, Shao et al. (2019) trabalhando com juvenis de uma espécie híbrida de

garoupa (*Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*), obtiveram ganhos no desempenho em densidades de estocagem de 75 a 112 ind/m³, com perda de desempenho em densidades menores, ou muito superiores, estando a densidade de estocagem de melhor desempenho no presente estudo (95 ind/m³) incluído na faixa ideal apontada por Shao et al. (2019).

No presente estudo foi observada uma condição gregária (formação de cardume), principalmente observada nos tratamentos com maior densidade, essa condição possibilitou aos peixes menos movimentação e deslocamento para se manterem coesos e estáveis na coluna d'água. Essa condição é relatada como responsável pela sensação de segurança dos peixes, pela formação de cardumes, e economia metabólica, podendo gerar menos gastos de energia em peixes cultivados (AKSUNGUR et al., 2007; PIROZZI et al., 2009; CHAMBEL et al., 2015). Como resultado, os nutrientes consumidos a partir da alimentação podem ser preferencialmente alocados para o crescimento, fato que corrobora com os dados superiores de crescimento, e principalmente melhor conversão alimentar, obtidos nos tratamentos de alta densidade.

Apesar de juvenis de garoupa-verdadeira terem apresentado pré-disposição ao adensamento, muitos estudos reportam os efeitos negativos devido ao adensamento excessivo (YANG; LIN, 2001; ROWLAND; MIFSUD; NIXON, 2006; COSTAS et al., 2008; MCKENZIE et al., 2012; WANG et al., 2018). Shao et al. (2019) que obtiveram bons resultados com densidade de até 112 ind/m³, relataram perdas de desempenho e aumento nos indicadores de estresse ao se adensar o cultivo acima de 150 ind/m³ (juvenis, peso médio 25 g). É relatado que altas densidades podem também gerar a ocorrência de hierarquias de tamanho (JIA et al., 2016; GUO et al., 2017), que ocorre quando um ou um grupo de animais maiores consegue se alimentar em detrimento de animais menores, acarretando na formação de lotes de tamanhos heterogêneos. No presente estudo o acompanhamento diário do cultivo não observou sinais claros de formação de hierarquias ou dominância para ambas as densidades, assim como o coeficiente de variação do peso final, que pode ser utilizado como indicador do estabelecimento de hierarquias (IRWIN; O' HALLORAN; FITZGERALD, 1999; LAMBERT;

DUTIL, 2001), não apresentou diferenças entre alta e baixa densidade, com um ganho de peso homogêneo dentro dos tanques para ambos os tratamentos.

Outros indicadores que podem definir uma densidade de estocagem inapropriada para uma espécie, como altas taxas de mortalidade e canibalismo (HECHT; PIENAAR, 1993; BARAS; KESTEMONT; MELARD, 2003) não estiveram presentes durante o experimento, sendo que, apenas 2 dos 648 peixes estocados inicialmente não sobreviveram após 60 dias de cultivo. O acompanhamento diário do cultivo permitiu ainda observar que animais estocados em maior densidade apresentavam-se mais coesos e ativos na hora da alimentação, enquanto os animais dos grupos de baixa densidade apresentavam menor pré-disposição durante a alimentação, demorando mais tempo para demonstrar interesse pelo alimento, e se dispersando mais rapidamente.

O estudo e a observação dos animais deixou claro que juvenis de garoupa-verdadeira podem ser consideradas criaturas sociais, e manifestam seu máximo crescimento na presença de um número adequado de outros indivíduos. Apesar de contar com apenas duas densidades, o presente trabalho obteve um resultado relevante e que pode ser considerado na estocagem de juvenis de garoupa-verdadeira, servindo inclusive como ponto de partida para estudos com densidades ainda maiores, visando maiores produtividades em sistemas de recirculação de aquicultura marinha.

Frequência alimentar

Assim como a densidade de estocagem é um fator de importância para o cultivo de peixes, outro ponto de grande relevância e também levantado no primeiro experimento é a frequência alimentar, que pode apresentar influências positivas ou negativas conforme o manejo aplicado. A frequência alimentar é definida pelo número de alimentações diárias fornecidas aos peixes, podendo ser realizada de forma manual por meio de tratadores, ou automatizada por meio de alimentadores. Sua escolha é norteadada por fatores biológicos como a espécie e sua morfologia, hábitos alimentares, fases de criação, produtividade natural, além de estar sujeita também a fatores abióticos como temperatura, qualidade da água e sistemas de criação (LEE; HWANG; CHO, 2000;

HAYASHI et al., 2004; TSUZUKI; BERESTINAS, 2008; WU et al., 2015). A frequência alimentar adotada pode ser responsável pelo sucesso, ou fracasso de um cultivo (BOOTH et al., 2008; TIAN et al., 2015), pois está associada entre outras coisas, ao crescimento, conversão alimentar, sobrevivência e custos de produção (VOLKOFF; PETER, 2006; FURUYA, 2007; LAWRENCE et al., 2012; CUNHA et al., 2013).

O presente estudo trabalhou com três diferentes frequências alimentares, com 1 e 2 alimentações diárias, além do regime de alimentação contínua (24h), e não encontrou diferenças significativas nos parâmetros de desempenho zootécnico estudados. De modo diferente, outro grupo de estudo (SOUSA et al., 2019) trabalhando com a mesma espécie (peso inicial 6,34g) e frequências alimentares de 1, 3, 6, 12 e 18 vezes ao dia, obtiveram resultados positivos para frequências alimentares mais altas, indicando a utilização de 12 refeições diárias para maximizar o ganho de peso e aproveitamento de nutrientes para a espécie, além de citar benefícios a manutenção da qualidade da água. Neste trabalho, Sousa et al. (2019) utilizaram alimentadores automáticos com uma taxa de arraçoamento constante (2,5 % biomassa/dia), o que pode ter sido um ponto importante na diferenciação metodológica e consequentemente dos resultados dos dois trabalhos, uma vez que o presente estudo utilizou alimentações até saciedade aparente (1 e 2x ao dia) e correções diárias (aumento/diminuição, 24h) quando utilizado o alimentador automático. Esses dois tipos de manejo, a saciedade aparente ou porcentagem fixa da biomassa podem ser responsáveis por diferenças no desempenho final dos animais. Os dados de alimentação e principalmente a observação diária do cultivo de juvenis de garoupas no presente estudo (Figura 2.7) deixam claro que os peixes não se alimentaram a uma frequência constante, um dia após o outro. Foram observados dias de baixíssimo apetite, seguido de dias com apetite voraz. Nesse tipo de manejo alimentar, onde o alimento é ofertado até a saciedade aparente é de extrema importância que o alimentador perceba o momento exato em que os peixes perdem o interesse pelo alimento e param de se alimentar, evitando assim o desperdício de ração (FRACALOSSO; CYRINO, 2013). Esse tipo de apetite intermitente encontrado para a espécie dificilmente poderia ser corrigido em alimentações baseada na taxa de biomassa, o que poderia, seguindo o observado no

presente trabalho, acarretar em dias de desperdício de comida, seguido de dias com alimentação insuficiente a todos os animais.

Estudos com outras espécies de peixes demonstraram que baixas frequências alimentares podem ser as mais indicadas para o rendimento do cultivo quando confrontadas com número maiores de refeições diárias (ALANÄRÄ 1992; JOHANSEN; JOBLING, 1998; COSTA-BONFIM et al., 2014). Kohno et al. (1989) em estudo com juvenis de garoupa-do-malabar (*Epinephelus malabaricus*) com manejo alimentar até a saciedade aparente, obtiveram melhor ganho de peso e conversão alimentar utilizando uma alimentação ao dia, quando comparado a frequências maiores. Outros autores relatam ainda resultados positivos ao utilizar regimes com alimentação seguida por períodos de jejum, por exemplo, com frequência alimentar de uma vez a cada dois dias ou três dias, esse tipo de manejo se mostrou adequado para juvenis de garoupa-arábica (*Epinephelus tauvina*) cultivados em tanques-rede (CHUA; TENG, 1978). Esses estudos indicam que algumas espécies de peixe podem se adaptar a regimes de alimentação restrita, aumentando a alimentação em cada refeição (JOBLING, 1982), possibilitando um período maior de jejum posteriormente. Por outro lado, estudos com determinadas espécies apontam também resultados positivos de frequências alimentares com várias refeições diárias (MOREIRA et al., 2015; GUO et al., 2018; BOGIANI et al., 2018). Como foi descrito para o salmão (*Salmo salar*) com melhor desempenho obtido a partir do regime de 4 refeições diárias (SUN et al., 2014), garoupa-de-Hong-Kong (*Epinephelus akaara*) com 6 refeições diárias (KAYANO et al., 1993) e até o mesmo o relatado para juvenis de garoupa-verdadeira (*Epinephelus marginatus*), com 12 refeições diárias (SOUSA et al., 2019), sendo claramente uma disciplina que depende de metodologias, espécies e fases de vida trabalhada.

De maneira geral, a literatura descreve que indivíduos menores, em fase de alevinagem e berçário para juvenis, necessitam de um maior número de refeições diárias, devido ao tamanho do trato digestório, e também para evitar o canibalismo, muito comum nessas fases de cultivo, quando comparado a fase de transição de juvenis e engorda. A adequação a diferentes frequências alimentares foi demonstrada para o bijupirá (*Rachycentron canadum*) onde Moreira et al. (2015) indicaram o melhor desempenho a partir de um regime de 3 refeições diárias para animais com peso inicial

de 15 g, enquanto Costa-Bonfim et al. (2014) relataram não haver diferenças entre tratamentos com 1, 2, 3, 4 ou 6 refeições diárias, para animais com peso de 100 g, indicando 1 refeição diária para espécie, uma vez que o desempenho obtido foi similar aos outros e o regime de alimentação única pode reduzir custos logísticos e de mão-de-obra.

A partir dos resultados obtidos e observações no presente estudo, é indicado o manejo alimentar uma vez ao dia para juvenis de garoupas (peso inicial de 9,5 g) cultivadas em sistema recirculante, ou quando disponível, a utilização de alimentadores automáticos, pois ambos resultaram em desempenhos semelhantes, sendo que, o segundo pode gerar economia de tempo e mão-de-obra, quando disponível.

Experimento 2 – Dietas práticas

Apesar de não existirem estudos específicos que indiquem as exigências nutricionais para a garoupa-verdadeira, é possível tomar como base estudos realizados com espécies congêneres como linha guia para a escolha e formulação de dietas práticas (NRC, 2011).

Autores indicam que o crescimento ideal para garoupas pode ser alcançado com dietas contendo níveis próximos a 50% de proteína bruta, independente da fonte de proteína (LUO et al., 2005a). A inclusão de gordura é utilizada como fonte mais barata de energia, além de prover ácidos graxos essenciais a espécie, Lin e Shiau (2002) conduziram experimento para determinar o nível ótimo de lipídios na dieta de *E. malabaricus* utilizando óleo de peixe e de milho, os resultados apontaram que 9% é o nível ideal para máximo crescimento e eficiência alimentar. Próximo a esse valor, Luo et al. (2005b) em estudos com níveis de inclusão de lipídio (5,16 a 16,05%, utilizando óleo de peixe) relataram níveis ótimos de 10% de lipídios na dieta para prover o máximo crescimento de *E. coioides* cultivadas em tanques rede. No presente estudo as dietas AQ e AQ-T baseadas em farinha e óleo de peixe, apresentaram teores de nutrientes semelhantes às recomendações acima mencionadas para espécies de garoupas (LUO et al., 2005a). Em particular, o estudo atual mostrou que os peixes alimentados com dieta seca AquaMar (AQ) (uma formulação de dieta de referência marinha testada anteriormente para outras espécies de peixes carnívoros marinhos (bijupirá; RAGGI;

TACON; LEMOS, 2019), foi capaz de sustentar um bom desempenho para juvenis de garoupa-verdadeira, sem diferença significativa em comparação com uma dieta de peixe fresco ou a dieta semiúmida. Resultados semelhantes foram observados com a garoupa-pantera (*Cromileptes altivelis*), com melhor desempenho observado com peixes alimentados com uma dieta comercial em comparação com o uso de peixe fresco (*Sardinella* sp.; SHAPAWI; MUSTAFA; NG, 2011). O bom aproveitamento de dietas secas para garoupas também foi descrito por Sim et al. (2005), que relatam um crescimento 75% superior para garoupas alimentadas com dietas peletizadas em comparação ao uso de peixe fresco.

Os valores obtidos para o FCA no presente estudo com a dieta referência de farinha de peixe (AQ) foram menores em comparação com os valores relatados anteriormente para garoupa-verdadeira usando dietas secas ou úmidas (LÓPEZ; CASTELLÓ-ORVAY, 2003; SANCHES; AZEVEDO; COSTA, 2007; RAMOS et al., 2018; SOUSA et al., 2019) e foi semelhante a outras espécies de peixes marinhos de cultivo já consolidados (COMPANY et al., 1999; ROSENLUND et al., 2004; TACON; METIAN, 2015; AAS; YTRESTØYL; ASGARD, 2019; RAGGI; TACON; LEMOS, 2019). Como esperado, os valores obtidos de FCA foram menores para dietas secas em comparação com dietas semiúmidas e peixes fresco, o que está de acordo com o relatado anteriormente para peixes marinhos carnívoros tropicais (BUNLIPATANON et al., 2014; RAGGI; TACON; LEMOS, 2019; MA et al., 2020), incluindo espécies de garoupa (TACON et al., 1991; SIM et al., 2005; SHAPAWI; MUSTAFA; NG, 2011; RAMOS et al., 2018; NUGRAHA; ROZI, 2020; MUYOT et al., 2021).

A dieta semiúmida apresentou bom desempenho, compatível ao uso da dieta AquaMar, porém, o seu uso pode ser restringido por muitos dos problemas descritos também para o uso de rejeito de pesca, em questões como competição com a alimentação humana, dificuldades de abastecimento e armazenamento, transmissão de patógenos, efeitos poluentes sobre a qualidade da água e conversão alimentar elevada (TACON; METIAN, 2009; LEE et al., 2016).

Durante o presente estudo, observações diárias de alimentação confirmaram o aumento de turbidez da água devido ao fracionamento e suspensão de sólidos nos tratamentos semiúmido e peixe fresco, o que está de acordo com o verificado no cultivo do linguado japonês, *Paralithicys olivaceus*, alimentado com dieta semiúmida, que

resultou no aumento da turbidez e níveis de amônio e fósforo dissolvido, afetando o crescimento e a sobrevivência (LEE et al., 2016).

No geral, o uso de dietas secas além de oferecer desempenho igual e por vezes superior ao rejeito de pesca e preparados semiúmidos, não possuem as desvantagens atreladas a esses tipos de alimentação, sendo recomendado o seu uso para a espécie na busca por eficiência e manutenção da qualidade de água do cultivo.

A ausência de mortalidade durante o ensaio confirma a adequação de juvenis de garoupa-verdadeira para o manejo (RAS), demonstrando a resistência da espécie ao cultivo, tanto com dietas secas como úmidas. Essa característica está em acordo com o relatado anteriormente para a garoupa-verdadeira (SANCHES et al., 2014; SOUZA et al., 2014; SOUSA et al.; 2019) e também outras espécies de serranídeos (TACON et al., 1991; SHAPAWI; MUSTAFA; NG, 2011; MILLAMENA, 2002). A espécie é ainda caracterizada como dócil, sedentária e com baixos gastos energéticos (SANCHES et al., 2014). A garoupa-verdadeira é uma espécie emergente no Brasil e com alto valor de mercado agregado (LOBO, 2021), cujo ciclo de produção na região Sudeste é estimado em um ano e meio até atingir 1 kg de peixe. O bom desempenho da garoupa-verdadeira alimentada com a dieta AquaMar corrobora observações recentes de criadores locais (Ilhabela, Brasil) sobre a adequação dessa formulação de dieta para o crescimento da espécie (KERBER, 2020).

Suplementação de taurina

A taurina é considerada um aminoácido condicionalmente essencial na nutrição de peixes (ESPE; RUOHONEN; EL-MOWAFI, 2012; EL-SAYED, 2014). No entanto, algumas espécies, como o linguado-japonês (*Paralichthys olivaceus*), a seriola (*Seriola quinqueradiata*) e o pargo-vermelho (*Pagrus major*), têm síntese limitada de taurina, especialmente durante os estágios larval e juvenil e, portanto, requerem fornecimento exógeno via alimento / ração (TAKEUCHI et al., 2001; TAKAGI et al., 2008; MATSUNARI et al., 2008; KUZMINA; GAVOVSKAYA; RYZHOVA, 2010; EL-SAYED, 2014; SALZE; DAVIS, 2015; WEI et al., 2018). Além disso, vários estudos relatam efeitos benéficos da suplementação de taurina sobre o crescimento e a eficiência alimentar em peixes alimentados com dietas de baixa inclusão de farinha de peixe (GAYLORD; TEAGUE;

BARROWS, 2006; LUNGER et al., 2007; CHATZIFOTIS et al., 2008; TAKAGI et al., 2011; ROSSI; DAVIS, 2012; KOVEN et al., 2016).

Apesar de ser considerada uma excelente fonte de proteína e rica em taurina em comparação com a maioria dos ingredientes da ração, o teor de taurina na farinha de peixe é essencialmente dependente da matéria-prima utilizada (incluindo se produzida a partir de peixes inteiros ou subprodutos de filetagem, espécie e o estágio de vida dos animais utilizados) e a estratégia de processamento empregada (GORMLEY et al., 2007; SALZE; DAVIS, 2015). Embora as 2 dietas secas testadas no presente estudo possuíssem um alto teor de farinha de peixe, a simples suplementação de taurina a 0,5% (dieta AQ) resultou em aumento do desempenho da garoupa e eficiência alimentar em comparação com a dieta AQ-T formulada de forma semelhante, mas não suplementada com taurina, em todos os parâmetros analisados. Estudos anteriores relataram efeitos positivos do fornecimento de taurina mesmo em dietas à base de farinha de peixe, conforme verificado em juvenis de bijupirá, *Rachycentron canadum* (melhor peso final e FCR com 0,5% de inclusão de taurina, 50% de dieta de farinha de peixe – RAGGI; TACON; LEMOS, 2019), juvenis de linguado-japonês, *Paralithicys olivaceus* (aumento de peso e FCR com suplementação de taurina a 1%, em dieta com 62% de farinha de peixe (KIM et al., 2005). Em estudo recente, juvenis de garoupa-alaranjada (*Epinephelus coioides*) alimentada com dietas possuindo diferentes teores de taurina (0,0, 0,5, 1,0 e 1,5%), mostrou efeitos positivos da suplementação de taurina sobre o metaboloma do peixe, melhorando a utilização de energia e a absorção de aminoácidos, além de acelerar o crescimento (SHEN et al., 2019). Uma revisão recente sobre o tópico sugere o benefício da taurina em níveis entre 0,5 e 1,5% da dieta, e estimou o nível de 0,91% de taurina na dieta como um conteúdo dietético médio para o crescimento e metabolismos ideais de algumas espécies de peixes (SAMPATH et al., 2020). O teor total de taurina na dieta AquaMar (AQ) ficou próximo ao nível recomendado na revisão anterior (1,04%) e pode estar relacionado ao bom desempenho dos peixes verificados no presente estudo.

A análise de aminoácidos do Peixe fresco (PF) usada no presente ensaio revelou um conteúdo reduzido de taurina, o Peixe fresco usado foi composto predominantemente por uma única espécie: cavalinha (*Scomber japonicus*). Ao

analisarmos a composição de aminoácidos corporal de juvenis de garoupa nenhuma diferença notável foi encontrada em peixes alimentados com dietas AquaMar (AQ) e Peixe fresco (PF), com exceção do teor de taurina, onde o teor foi mais de 100% superior no tratamento AQ (dieta suplementada com taurina). Este fato combinado com a eficiência de retenção de taurina nula (negativa) verificada no tratamento PF, pode sugerir que juvenis de garoupa-verdadeira possuem capacidade limitada para síntese desse aminoácido, conforme também relatado anteriormente para outras espécies de peixes marinhos (PARK et al., 2002; KIM Et al., 2005; TAKAGI et al., 2008) Portanto, a suplementação dietética de taurina com um nível mínimo total na dieta de 1,0% é recomendada para o crescimento desta espécie.

Estimativa de aminoácidos essenciais

Até o momento, dez aminoácidos foram considerados essenciais para as espécies de garoupas: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (LUO et al., 2005a; MUHAMMADAR et al., 2011). No entanto, é sabido que dietas com teores de aminoácidos desequilibrados podem afetar negativamente a saúde e o desempenho dos peixes de cultivo (LALL; ANDERSON, 2005; BICUDO; CYRINO, 2014), prejudicando a utilização de outros nutrientes dietéticos e resultando em aumento da carga de nutrientes fecais e poluição (BICUDO; CYRINO, 2014; LI et al., 2009). A determinação das necessidades de aminoácidos por dose-resposta usando dietas semi-purificadas tem sido amplamente relatada em espécies de peixes (NRC, 2011), apesar do tempo experimental relativamente longo de avaliação e dos altos custos que esse método geralmente emprega, além de fornecer a estimativa de apenas um aminoácido em cada período de testes. Tendo em vista a importância de quantificar a necessidade de aminoácidos essenciais em condições práticas de cultivo, a análise de perfil de aminoácidos do corpo inteiro tem sido usada como referência, pois possui uma boa correlação com as necessidades de aminoácidos da dieta (COWEY; TACON, 1983; WILSON; POE, 1985; PERES; OLIVA-TELES, 2008), a um custo comparativamente menor. Diferentes metodologias são relatadas para a estimativa da necessidade de aminoácidos em espécies de peixes, muitas delas com base na composição do corpo inteiro do animal

(TACON, 1989; KAUSHIK, 1998, MEYER; FRACALLOSSI, 2005). Embora limitado na determinação do gasto de aminoácidos durante o metabolismo de manutenção (WILSON; POE, 1985), os métodos baseados nos perfis de nutrientes do corpo são considerados uma ferramenta importante e prática por participantes da indústria e pesquisadores, especialmente na falta de estudos anteriores de dose-resposta (BICUDO; CYRINO, 2014).

Com exceção do triptofano, o presente estudo encontrou requisitos individuais de aminoácidos semelhantes aos relatados anteriormente para espécies de garoupa cultivadas na Ásia (CAI-JUAN; RAMLI; RAHMAN, 2016). Além disso, essas estimativas são comparáveis ao conteúdo nutricional de dietas comerciais atualmente usadas para alimentar juvenis de garoupa-tigre, *Epinephelus fuscoguttatus*, (MUHAMMADAR et al., 2011). A avaliação dose-resposta das necessidades dietéticas de aminoácidos não é abundante (não há nenhum aminoácido determinado para a garoupa-verdadeira), e tem se concentrado principalmente em espécies de garoupa cultivadas na Ásia. Os níveis ideais de metionina na dieta para garoupa híbrida (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) foram determinados por estudos de dose-resposta a 1,45% (LI ET al., 2020) enquanto a necessidade de arginina (WU et al., 2018), leucina (ZHOU et al., 2019) e isoleucina (ZHOU et al., 2020) para este mesmo híbrido foram relatados como 3,65, 3,25 e 1,98% da dieta, respectivamente. Embora determinados para outras espécies de garoupa, esses valores de requisitos são comparáveis aos estimados no presente estudo para juvenis de garoupa-verdadeira, principalmente os valores obtidos de acordo com a metodologia sugerida por TACON (1989), confirmando o potencial da composição corporal para a determinação quantitativa de requisitos de aminoácidos.

O exercício de comparação entre o perfil de aminoácidos corporal de garoupa entre as duas dietas (AQ e PF) e também entre diferentes espécies marinhas (Tabela 2.9) demonstrou alta correlação ($R^2 > 0,9$) entre as espécies, como também já descrito anteriormente para outros peixes marinhos (RAGGI; TACON; LEMOS, 2019), denotando o caráter conservativo do perfil de aminoácidos entre espécies marinhas. Entretanto, diferente do perfil de aminoácidos do corpo, as exigências de aminoácidos apresentam maiores variações dentre espécies (COWEY; TACON, 1983), como foi verificado na tabela de estimativa de exigências de EAA obtidos para garoupa-verdadeira e quando

comparamos este às exigências para o selecionado de espécies ($R^2 < 0,7$, Tabela 2.10), indicando a importância do estudo singular para cada espécie.

CONCLUSÕES

Os resultados dos dois experimentos realizados com a garoupa-verdadeira indicam a aceitação da espécie a ambientes de cultivo recirculantes de água marinha, como proposto no estudo. Demonstram ainda ótima aceitação ao alimento artificial em forma de rações peletizadas, e que estudos sobre manejo e nutrição devem ser contínuos e serão benéficos para o desenvolvimento do cultivo da espécie no Brasil.

Em resumo, o primeiro experimento demonstrou a importância da investigação do correto manejo da espécie para o sucesso do cultivo, e o pleno desenvolvimento de juvenis de garoupa em sistema recirculante de água salgada. O estudo verificou também que segundo as condições de cultivo adotadas, a frequência alimentar não produziu efeitos significativos sobre o rendimento da espécie, podendo ser adotada 1 refeição diária até a saciedade aparente para um desempenho satisfatório. Por outro lado, a densidade de estocagem inicial foi crucial para o melhor desempenho, sendo recomendado o uso de densidades próximas a 90 peixes por metro cúbico nessa fase de criação da garoupa-verdadeira, visando o bem estar e o melhor aproveitamento zootécnico dos animais.

Os resultados do segundo experimento demonstraram mais uma vez o desempenho satisfatório de juvenis de garoupa-verdadeira em sistemas de tanque de recirculação de água, alimentados com ração peletizada, com produção de peixes igual ou superior à obtida com peixes alimentados com ração seca em comparação ao peixe fresco. Além disso, os resultados com a suplementação de taurina sugerem que a suplementação com esse aminoácido resulta em melhor crescimento e eficiência alimentar em uma dieta à base de farinha de peixe, recomendando a inclusão desse aminoácido para satisfazer teores próximos de 1,0% de taurina na dieta. Os resultados deste estudo e a confrontação com a literatura existente, indicam que as necessidades estimadas de aminoácidos da garoupa-verdadeira com base na composição corporal do animal podem ser usadas como um bom ponto de partida para a formulação de dietas

práticas para essa espécie, até que determinações mais precisas dos nutrientes necessários à dieta estejam disponíveis.

Produção científica realizada e potencial

Parte das informações contidas nesse capítulo (experimento 2) foram publicadas em revista internacional arbitrada, como se segue:

COELHO, R; LEMOS, D.; TACON, A. G. J. Performance of juvenile dusky grouper (*Epinephelus marginatus* Lowe, 1834) fed different practical diets in an indoor water-recirculation system. **Aquaculture Nutrition**, v.1, p.1, 2021.

Há ainda um segundo manuscrito, em preparação, referente ao experimento 1, envolvendo densidades de estocagem e frequência alimentar da garoupa-verdadeira, como descrito a seguir:

COELHO, R.; LEMOS, D. Effect of stocking density and feeding frequency on the growth of dusky grouper (*Epinephelus marginatus* Lowe, 1834) in an indoor water-recirculation system. **Aquaculture Research**, (Em preparação).

REFERÊNCIAS

- AAS, T. S.; YTRESTØYL, T.; ASGARD, T. Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2016. **Aquaculture Reports**, v. 14, p. 1-10, 2019.
- AKSUNGUR, N.; AKSUNGUR, M.; AKBULUT, B.; KUTLU, I. Effects of stocking density on growth performance survival and food conversion ratio of turbot (*Psetta maxima*) in the net cages on the Southeastern coast of the Black Sea. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.7, p. 147-152, 2007.
- ALANÄRÄ A. The effect of time-restricted demand feeding on the feeding activity, growth and feed conversion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 108, n. 3-4, p. 357–368, 1992.
- ANDRADE, A. B.; MACHADO, L. F.; HOSTIM-SILVA, M.; BARREIROS, J. P. Reproductive biology of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 3, p. 373- 382, 2003.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (17th ed.). Arlington, VA: Author, 2000.
- ARAI, S. A. Purified test diet for coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, fry. **Bulletin of the Japan Society of Science of Fish**, v. 47, p. 547–550, 1981.
- ASHLEY, P. J. Fish welfare: current issues in aquaculture. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 104, n. 3, p. 199–235, 2007.
- BARAS, E.; KESTEMONT, P.; MELARD, C. Effect of stocking density on the dynamics of cannibalism in sibling larvae of *Perca fluviatilis* under controlled conditions. **Aquaculture**, v. 219, n. 1-4, p. 241-25, 2003.
- BERTONCINI, A. A.; MACHADO, L.F.; HOSTIM-SILVA, M.; BARREIROS, J. P. Reproductive biology of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 3, p. 373–381, 2003.
- BEZERRA, T. R. Q.; DOMINGUES, E. C.; MAIA FILHO, L. F. A.; ROMBENSO, A. R.; HAMILTON, S.; CAVALLI, R. O. Economic analysis of cobia (*Rachycentron canadum*) cage culture in large- and small-scale production systems in Brazil. **Aquaculture International**, v. 24, p. 609–622, 2016.
- BICUDO, A. J. A; CYRINO, J. E. P. Evaluation of methods to estimate the essential amino acids requirements of fish from the muscle amino acid profile. **Latin American Journal Aquatic Research**, v. 42, n. 1, p. 271-275, 2014.
- BOGIANI, S. A.; DE CASTRO C. S.; MIYAMOTO, E. M. F.; DE OLIVEIRA, C.; AGOSTINHO, C. A. Comparison between two feeding rates and three feeding frequencies for hybrid surubims reared in cages. **Revista Caatinga**, v.31, n. 3, p. 767-772, 2018.
- BOOTH, M. A.; TUCKER, B. J.; ALLAN, G. L; FIELDER, D. S. Effect of feeding regime and fish size on weight gain, feed intake and gastric evacuation in juvenile Australia snapper *Pagrus auratus*. **Aquaculture**, v. 282, n. 1-4, p. 104-110, 2008.

- BUNLIPATANON, P.; SONGSEECHAN, N.; KONGKEO, H.; ABERY, N. W.; SILVA, S. S. Comparative efficacy of trash fish versus compounded commercial feeds in cage aquaculture of Asian seabass (*Lates calcarifer*) (Bloch) and tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) (Forsskål). **Aquaculture Research**, v. 45, n. 3, p. 373–388, 2014.
- CAI-JUAN, S.; RAMLI, R.; RAHMAN, R. A. Nutrients Requirements and Composition in A Grouper Fish Feed Formulation. **The European Proceedings of social & Behavioral Sciences**, v. 14, p. 60-66, 2016.
- CAVALLI, R.O.; HAMILTON, S. Piscicultura marinha no Brasil com ênfase na produção do beijupirá, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p.64-69, 2009.
- CAVALLI, R. O.; DOMINGUES, E. C.; HAMILTON, S. Development of open ocean marine fish farming in Brazil: possibilities and constraints. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 155–164, 2011.
- CHAMBEL, J.; SEVERIANO, V.; BAPTISTA, T.; MENDES, S.; PEDROSA, R. Effect of stocking density and different diets on growth of Percula Clownfish, *Amphiprion percula* (Lacepede, 1802). **SpringerPlus**, v. 4, n. 183, p. 1-7, 2015.
- CHATZIFOTIS, S.; POLEMITOU, I.; DIVANACH, P.; ANTONOPOULOU, E. Effect of dietary taurine supplementation on growth performance and bile salt activated lipase activity of common dentex, *Dentex dentex*, fed a fish meal/soy protein concentrate based diet. **Aquaculture**, v. 275, n. 1-4, p. 201–208, 2008
- CHUA, T. E.; TENG, S. K. Effects of feeding frequency on the growth of young estuary grouper, *Epinephelus tauvina* (Forskål), cultured in floating net-cages. **Aquaculture**, v. 14, p. 31-47, 1978.
- CHUA, T. E.; TENG, S. K. Economic production of estuary grouper, *Epinephelus salmoides* Maxwell, reared in floating net cages. **Aquaculture**, v. 20, p. 187-228, 1980.
- COMPANY, R.; CALDUCH-GINER, S. A.; PEREZ-SANCHEZ, J.; KAUSHIK, S. Protein sparing effect of dietary lipids in common dentex (*Dentex dentex*): A comparative study with sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquatic Living Resources**, v. 12, n. 1, p. 23-30, 1999.
- COSTA-BOMFIM, C. N.; PESSOAL, W. V.; N., OLIVEIRA, R. L. M.; FARIAS, J. L.; DOMINGUES, E. C.; HAMILTON, S.; CAVALLI, R. The effect of feeding frequency on growth performance of juvenile cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 30, n. 1, p. 135– 139, 2014.
- COSTAS, B.; ARAGÃO, C.; MANCERA, J. M.; DINIS, M. T.; CONCEIÇÃO, L. E. C. High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. **Aquaculture**, v. 39, n. 1, p. 1-9, 2008.
- COWEY, C. B.; TACON, A. G. J. Fish nutrition—Relevance to invertebrates. In G. D. Pruder, C. J. Langdon, & D. E. Conklin (Eds.), Proceedings of the second international conference on aquaculture nutrition. Rehoboth Beach, Delaware. Special publication n. 2 (p. 13–30). Baton Rouge, LA: World Mariculture Society, Louisiana State University, 1983.

CRAIG, M. T.; SADOVY, M. Y. J.; HEEMSTRA, P. C. Groupers of the World - A Field and Market Guide. National Inquiry Services Centre (NISC), Grahamstown, South Africa, 403 pp., 2011.

CUNHA, M. E.; RÉ, P.; QUENTAL-FERREIRA, H.; GAVAIA, P. J.; POUSÃO-FERREIRA. Larval and juvenile development of dusky grouper *Epinephelus marginatus* reared in mesocosms. **Journal of Fish Biology**, v. 83, n.3, p.448-465, 2013.

DOMINGUES, E. C.; HAMILTON, S.; BEZERRA, T. R. Q.; CAVALLI, R. O. Viabilidade econômica da criação do beijupirá em mar aberto em Pernambuco. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 40, n. 2, p. 237-249, 2014.

ELLIS, T.; NORTH, B.; SCOTT, A. P.; BROMAGE, N. R.; PORTER, M.; GADD, D. The relationships between stocking density and welfare in farmed Rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v.61, N. 3, p. 493-531, 2002.

EL-SAYED, A. F. M. Is dietary taurine supplementation beneficial for farmed fish and shrimp? A comprehensive review. **Reviews in Aquaculture**, v. 6, n. 4, p. 241–255, 2014.

ESPE, M.; RUOHONEN, K.; EL-MOWAFI, A. Effect of taurine supplementation on the metabolism and body lipid-to-protein ratio in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture Research**, v. 43, n. 3, p. 349–360, 2012.

FAO. Food and Aquaculture Organization of the United Nation. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. p. 224, 2020.

FOGLIARINI, C. O.; FERREIRA, C. E. L.; BORNHOLDT, J.; BARBOSA, M. C.; GIGLIO, V. J.; BENDER, M. G. Telling the same story: Fishers and landing data reveal changes in fisheries on the Southeastern Brazilian Coast. **PLoS One**, v. 16, n. 6, p. 1-21, 2021.

FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J.E.P. **Nutriaqua**: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. 375p. ed. 2013, 2013.

FURUYA, W. M. Redução do impacto ambiental por meio da ração. In: SEMINÁRIO DE AVES E SUÍNOS – 7. SEMINÁRIO DE AQUICULTURA, MARICULTURA E PESCA, 2. **Anais...** Belo Horizonte. 2007. p.121-139, 2007.

GARR, A. L.; LOPEZ, H.; PIERCE, R.; DAVIS, M. The effect of stocking density and diet on the growth and survival of cultured Florida apple snails, *Pomacea paludosa*. **Aquaculture**, v. 311, n. 1-4, p. 139-145, 2011.

GAYLORD, T. G.; TEAGUE, A. M.; BARROWS, F. T. Taurine supplementation of all-plant protein diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37, n. 4, p. 509–517, 2006.

GLAMUZINA, B.; GLAVIĆ, N.; SKARAMUCA, B.; KOŽUL V. Induced sex reversal of dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe). **Aquaculture Research**, v. 29, n. 8, p. 563– 567, 1998a.

GLAMUZINA, B.; GLAVIĆ, N.; SKARAMUCA, B.; KOŽUL V. Preliminary studies on reproduction and early life stages in rearing trials with dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). **Aquaculture Research**, v. 29, n. 10, p. 769– 771, 1998b.

GOMES, S. Z.; SCHLINDWEIN, A. P. Efeitos de períodos de cultivo e densidades de estocagem sobre o desempenho do catfish (*Ictalurus punctatus* sp) nas condições climáticas do litoral de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1266-1272, 2000.

GORMLEY, T. R.; NEUMANN, T.; FAGAN, J. D.; BRUNTON, N. P. Taurine content of raw and processed fish fillets/portions. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 5-6, p. 837–842, 2007.

GUO, H. Y.; DONG, X. Y.; ZHANG, X. M.; ZHANG, P. D.; LI, W. T. Survival, growth and physiological responses of juvenile japonese flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck & Schelegel, 1846) exposed to different dissolved oxygen concentrations and stocking densities. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 33, n. 4, p. 731-739, 2017.

GUO, Z.; CUI, J.; LI, M.; LIU, H.; ZHANG, M.; MENG, F.; SHI, G.; WANG, R.; HE, X.; ZHAO, Y. Effect of feeding frequency on growth performance, antioxidant status, immune response and resistance to hypoxia stress challenge on juvenile dolly varden char *Salvelinus malma*. **Aquaculture**, v. 486, p. 197-201, 2018.

HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, p. 912-916, 1989.

HARMELIN, J. G.; HARMELIN-VIVIEN, M. A review on habitat, diet and growth of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). **Marine Life**, v. 9, n. 2, p. 11-20, 1999.

HAYASHI, C.; MEURER, F.; BOSCOLO, W. R.; LACERDA, C. H. L.; KAVATA, L. C. B. Freqüência de arraçoamento para alevinos de lambari do rabo-amarelo (*Astyanax bimaculatus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 21–26, 2004.

HECHT, T.; PIENAAR, A. G. A review of cannibalism and its implications in fish larviculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 24, n. 2, p. 246-261, 1993.

HEEMSTRA, C. P.; RANDALL, J.E. FAO; Species catalogue. Groupers of the word (Family Serranidae, Subfamily Epinephelinae, An Annotated and Illustrated Catalogue of the Grouper, Rockcod, Hind, Coral grouper Lyretail Species. FAO Fisheries Synopsis, v. 16, p. 186-189, 1993.

HERRERA, L. A.; KUHNEN, V. V.; SANCHES, E. G. Does intensive feeding frequency affect growth performance of common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792)? **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 3, p. 505– 509, 2019.

IRWIN, S.; O' HALLORAN, J.; FITZGERALD, R.D. Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). **Aquaculture**, v. 178, n. 1-2, p. 77-88, 1999.

JIA, R.; LIU, B.; FENG, W.R.; HAN C.; HUANG, B.; LEI, J. L. Stress and immune responses in skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) under different stocking densities. **Fish Shellfish Immunology**, v. 55, p. 131-139, 2016.

JOBLING, M. Some observations on the effects of feeding frequency on the food intake and growth of plaice, *Pleuronectes platessa* L. **Journal of Fish Biology**, v. 20, p. 431-444, 1982.

JOHANSEN S. J. S.; JOBLING, M. The influence of feeding regime on growth and slaughter traits of cage-reared Atlantic salmon. **Aquaculture International**, v. 6, p. 1-17, 1998.

KAPETSKY, J. M.; AGUILAR-MANJARREZ, J.; JENNESS, J. A global assessment of offshore mariculture potential from a spatial perspective. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper no. 549. FAO, Rome, p. 181, 2013.

KAUSHIK, S. J. Whole-body amino acid composition of European seabass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Psetta maxima*) with an estimation of their IAA requirement profiles. **Aquatic Living Resources**, v. 11, n. 5, p. 355–358, 1998.

KAUSHIK, S. J.; SEILIEZ, I. Protein and amino acid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 3, p. 322-332, 2010.

KAYANO, Y.; YAO, S.; YAMAMOTO, S.; NAKAGAWA, H. Effects of feeding frequency on the growth and body constituents of young red-spotted grouper, *Epinephelus akaara*, **Aquaculture**, v. 110, n. 3–4, p. 271-278, 1993.

KERBER, C. E.; AZEVEDO SILVA, H. K.; SANTOS, P.A.; SANCHES, E. G. Reproduction and larviculture of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) in Brazil. **Journal of Agricultural Sciences and Technology**, v. 2, p. 229-234, 2012.

KERBER, C. E. (2020). Piscicultura Marinha: Um mar de oportunidades para o Brasil. Youtube, disponível em 08 ago, 2021, http://www.youtube.com/watch?v=ZkO_3zvq400&t=4530s, 2021.

KIM, S. K.; TAKEUCHI, T.; AKIMOTO, A.; FURUITA, H.; YAMAMOTO, T.; YOKOYAMA, M.; MURATA, Y. Effect of taurine supplemented practical diet on growth performance and taurine contents in whole body and tissues of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fisheries Science**, v. 71, p. 627–632, 2005.

KOHNO, H.; TRIÑO, A.; GEROCHI, D.; DURAY, M. Effects of feeding frequency and amount of feeding on the growth of the grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Philippine Journal of Science**, v. 118, n. 1, 89-100, 1989.

KONGKEO, H.; WAYNE, C.; MURDJANI, M.; BUNLIPTANON, P.; CHIEN, T. Current practices of marine finfish cage culture in China, Indonesia, Thailand and Viet Nam. In Z Merican (ed.) **Aquaculture Asia Magazine**, v. 15, p. 32– 40. Aqua Research Pte Ltd., Singapore, 2010.

KOVEN, W., PEDUEL, A., GADA, M., NIXON, O. & UCKO, M. Taurine improves the performance of white grouper juveniles (*Epinephelus Aeneus*) fed a reduced fish meal diet. **Aquaculture**. v. 460, p. 8-14, 2016.

KUZMINA, V. V.; GAVROVSKAYA, L. K.; RYZHOVA, O. V. Taurine. Effect on exotrophia and metabolism in mammals and fish. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 46, n.1, p. 19-27, 2010.

LAIZ-CARRIÓN, R.; VIANA, I. R.; CEJAS, J. R.; RUIZ-JARABO, I.; JEREZ, S.; MARTOS, J. A.; EDUARDO, A. B.; MANCERA, J. M. Influence of food deprivation and high stocking density on energetic metabolism and stress response in red porgy, *Pagrus pagrus* L. **Aquaculture International**, v. 20, n. 3, p. 585-599, 2012.

LALL, S. P. & ANDERSON, S. Amino acid nutrition of salmonids: dietary requirements and bioavailability, In: Montero D, Basurco B, Nengas I, Alexis M, Izquierdo M (eds). Mediterranean fish nutrition, Cahiers Options Méditerranéennes. v. 63, p. 73–90, 2005.

LAMBERT, Y.; DUTIL, J.D. Food intake and growth of adult Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and size-grading. **Aquaculture**, v. 192, p. 133-147, 2001.

LAWRENCE, C.; BEST, J.; JAMES, A.; MALONEY, K. The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture**, v. 368-369, p. 103-108, 2012.

LEE, S.; MONIRUZZAMAN, M.; BAE, J.; SEONG, M.; SONG, Y.; DOSANJH, B.; BAI, S. C. Effects of extruded pellet and moist pellet on growth performance, body composition, and hematology of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 19, n. 32, 1-6, 2016.

LEE, S. M.; HWANG, U. G.; CHO, S. H. Effects of feeding frequency and dietary moisture content on growth, body composition and gastric evacuation of juvenile Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*). **Aquaculture**, v. 187, p. 399–409, 2000.

LI, P.; MAI, K.; TRUSHENSKI, J.; WU, G. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 43-53, 2009.

LI, X. J.; UM, W.; WU, X. Y.; DONG, Y.; ZHOU, Z. Y.; WANG, X.; MA, L. The optimum methionine requirement in diets of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂): Effects on survival, growth performance, gut micromorphology and immunity. **Aquaculture**, v. 520, p. 1-10, 2020.

LIAO, I. C.; LEAÑO, E. M. The Aquaculture of Groupers. Asian Fisheries Society, World Aquaculture Society, Fisheries Society of Taiwan, National Taiwan Ocean University, Quezon City, Philippines, 241 pp, 2008.

LIN, Y. H.; SHIAU, S. Y. Dietary lipid requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, and effects on immune response. **Aquaculture**, v. 225, n. 1, p. 243-250, 2002.

LIN, Y. H.; LU, R. M. Dietary taurine supplementation enhances growth and nutrient digestibility in giant grouper *Epinephelus lanceolatus* fed a diet with soybean meal. **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 1-4, 2020.

LISBOA, V., ELOY, H. R. F.; CATTER, K. M.; VIDIGAL, R. C. A. B.; SOUZA, R. L. M.; MATIAS, J. F. N. Piscicultura marinha brasileira: desafios e perspectivas do seu desenvolvimento no estado do Ceará. **Sistemas & Gestão**, v. 15, n. 2, p. 113–122, 2020.

LOBO, E. LIVE IFC BRASIL – Mercado do Pescado: Cenários e Perspectivas. Youtube, 16, mar. 2021. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=KxWTarTp3sE&t=126s>> acessado in: 17 ago 2021, 2021.

LÓPEZ, V. G.; CASTELLÓ-ORVAY, F. Preliminary data on the culture of juveniles of the dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). **Hidrobiológica**, v. 13, n. 3, p. 321-327, 2003.

LÓPEZ, V. G.; CASTELLÓ-ORVAY, F. Foods habits of grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) and *Epinephelus costae* (Steindachner, 1878) in the Mediterranean Coast of Spain. **Hidrobiológica**, v. 15, n. 1, p. 27-34, 2005.

LUCAS, B.; SOTELO, A. Effect of different alkalies, temperatures and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and food. **Analytical Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 192-197, 1980.

LUNGER, A. N.; MCLEAN, E.; GAYLORD, T. G.; KUHN, D.; CRAIG, S. R. Taurine supplementation to alternative dietary proteins used in fish meal replacement enhances growth of juvenile coho (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquaculture**, v. 271, n. 1-4, p. 401-410, 2007.

LUO, Z.; LIU, Y. J.; MAI, K. S.; TIAN, L. X. Advances in the Study on nutrients requirements of grouper (*Epinephelus* sp.) a Review. **Journal of Ocean University of China**, v. 4, n. 2, p. 93-98, 2005a.

LUO, Z.; LIU, Y. J.; MAI, K. S.; TIAN, L. X.; LIU, D. H.; TAN, X. Y.; LIN, H. Z. Effect of dietary lipid level on growth performance, feed utilization and body composition of grouper (*Epinephelus coioides*) juveniles fed isonitrogenous diets in floating netcages. **Aquaculture International**, v. 13, p. 257-269, 2005b.

MA, Y.; XU, C.; LI, M.; CHEN, H.; YE, R.; ZHANG, G.; XIE, D.; NING, L.; WANG, S.; SUN, L.; WANG, Y.; LI, Y. Diet with a high proportion replacement of fishmeal by terrestrial compound protein displayed better farming income and environmental benefits in the carnivorous marine teleost (*Trachinotus ovatus*). **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 1-8, 2020.

MARINO, G.; AZZURRO, E.; FINOIA, M. G.; MESSINA, M. T.; MASSARI, A.; MANDICH, A. Recent advances in induced breeding of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). **Cahiers Options Méditerranéennes**, v. 47, p. 215-226, 2000.

MATSUNARI, H.; YAMAMOTO, T.; KIM, S. K.; GOTO, T.; TAKEUCHI, T. Optimum dietary taurine level in casein-based diet for juvenile red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries Science**, v. 74, n. 2, p. 347-353, 2008.

MAZLUM, Y. Stocking density affects the growth, survival, and cheliped injuries of third instars of narrow-clawed crayfish, *Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823 juveniles. **Crustaceana**, v. 80, n. 7, p. 803, 815, 2007.

MCKENZIE, D. J.; HÖGLUND, E.; DUPONT-PRINET, A.; LARSEN, B. K.; SKOV, P.V.; PEDERSEN, P. B.; JOKUMSEN, A. Effects of stocking density and sustained aerobic exercise on growth, energetics and welfare of rainbow trout. **Aquaculture**, v. 338-341, p. 216-222, 2012.

MELLO, P. H. ; Araújo, B. C. ; CAMPOS, M. F. ; RODRIGUES-FILHO, J. A. ; GARCIA, C. E. O. ; MOREIRA, R. G. Embryonic and larval development and fatty-acid profile of

Epinephelus marginatus spawned in captivity: Tools applied to captive rearing. **JOURNAL OF FISH BIOLOGY**, v. 92, p. 1126-1148, 2018.

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

MILLAMENA, O. S. Replacement of fish meal by animal by-product meals in a practical diet for grow-out culture of grouper *Epinephelus coioides*. **Aquaculture**, v. 204, n. 1-2, p. 75-84, 2002.

MONTERO, D.; IZQUIERDO, M. S.; TORT, L.; ROBAINA, L.; VERGARA, J. M. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 53-60, 1999.

MOREIRA, C. B.; ROMBENSO, A. N.; CANDIOTTO, F. B.; TSUZUKI, M. Y. Feeding frequency affects growth of juvenile cobia *Rachycentron canadum* cultured in near-shore cages. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 41, n. 2, p. 219-226, 2015.

MUHAMMADAR, A. A.; MAZLAN, A. G.; SAMAT, A.; MUCHLISIN, Z. A.; SIMON, K. D. Crude protein and amino acids content in some common feeds of tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) juvenile. **AAFL Bioflux**, v. 4, n. 4, p. 499-504, 2011.

MUYOT, F. B.; MAGISTRADO, M. L.; MUYOT, M. C.; MUTIA, M. T. M. Growth Performance of the Mangrove Red Snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) in Freshwater Pond Comparing Two Stocking Densities and Three Feed Types. **The Philippine Journal of Fisheries**, v. 28, n. 1, p. 1-17, 2021.

NRC – National Research Council (2011). Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academies Press, Washington, DC, p.376, 2011.

NUGRAHA, M.; ROZI, R. The effect of giving commercial feed, beloso trash fish (*Saurida tumbil*), kurisi trash fish (*Nemipterus nematophorus*), and mixed trash fish on growth of cantang grouper (*Epinephelus fuscoguttatus-lanceolatus*) in floating net cage. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, v. 441, p. 1-5, 2020.

OTTOLENGHI, F.; SILVESTRI, C.; GIORDANO, P.; LOVATELLI, A.; NEW, M. B. Capture-Based Aquaculture. The Fattening of Eels, Groupers, Tunas and Yellowtails. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 308 pp, 2004.

PARK, G. S.; TAKEUCHI, T.; YOKOYAMA, M.; SEIKAI, T. Optimal dietary taurine level for growth of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fisheries Science**, v. 68, n. 4, p. 824–829, 2002.

PERES, H.; OLIVA-TELES, A. Lysine requirement and efficiency of lysine utilization in turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. **Aquaculture**, v. 257, n. 1-4, p. 283-290, 2008.

PETERSEN, E. H.; CHINH, D. T. M.; DIU, N. T.; PHUOC, V. V.; PHUONG, T. H.; DUNG, N. V.; DAT, N. K.; GIANG, P. T.; GLENCROSS, B. D. Bioeconomics of grouper, Serranidae: Epinephelinae, culture in Vietnam. **Reviews in Fisheries Science**, v. 21, n. 1, p. 49– 57, 2013.

PIERRE, S.; GAILLARD, S.; PREVOT-D'ALVISE, N.; AUBERT, J.; ROSTAING-CAPAILLON, O.; LEUNG-TACK, D.; GRILLASCA, J. P. Grouper aquaculture: Asian success and Mediterranean trials. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, v.18, n. 3, p. 297–308, 2008.

PIROZZI, I., BOOTH, M., PANKHURST, P. The effect of stocking density and repeated handling on the growth of juvenile mullet, *Argyrosomus japonicus* (Temminck & Schlegel 1843). *Aquaculture International*, v. 17, p. 199-205, 2009.

POLLARD, D.A.; AFONSO, P.; BERTONCINI, A. A.; FENNESSY, S.; FRANCOUR, P.; BARREIROS, J. "*Epinephelus marginatus*." The **IUCN Red List of Threatened Species 2018**. Edição: IUCN. 2018.

RAGGI, T. **Feeding and nutrition of tropical farmed fish and shrimp: pellet water stability, in vitro protein digestion, comparison of inert markers, evaluation of practical feeds, and dietary amino acid requirement**, 2016, p. 280. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

RAGGI, T.; TACON, A. G. J.; LEMOS, D. Feeding of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*: Evaluation of practical feeds, comparison of commercial fishmeal replacers, and estimation of essential amino acid requirements. *Journal of World Aquaculture Society*, v. 50, n. 2, p. 317, 335, 2019.

RAMOS, F. M.; SANCHES, E. G.; FUJIMOTO, R. Y.; COTTENS, K. F.; CERQUEIRA, V. R. Growth of juvenile dusky grouper *Epinephelus marginatus* at three different diets. **Boletim do Instituto De Pesca**, v. 38, n. 1, p. 81–88, 2018.

RICO, M. R.; ACHA, M. Southernmost occurrence of *Epinephelus marginatus* in the south-west Atlantic. *Journal of Fisheries Biology*, v. 63, n. 6, p. 1621-1624, 2003.

RIMMER, M. A.; SUDJA, W.; INDRADAJA, D.; GIRI, N. A.; LAINING, A. Compound feeds for grouper aquaculture – why has adoption been so poor? **Aquaculture Asia-Pacific Magazine**, v. 12, p. 25-28, 2016.

RIMMER, M. A.; GLAMUZINA, B. A review of grouper (Family Serranidae: Subfamily Epinephelinae) aquaculture from a sustainability science perspective. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 1, p. 58– 87, 2019

RODRIGUES FILHO, J.A.; SANCHES, E.G.; GARCIA, C.E.O.; PANNUTI, C.V.; SEBASTIANI, E.F.; MOREIRA, R.G. Threatened fishes of the world: *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Serranidae: Epinephelinae). *Environmental Biology of Fishes*, v. 85, p. 301– 302, 2009.

RODRIGUES-FILHO, J. A.; GARCIA, C. E. O.; CHEHADE, C.G.; SANCHES, E. G.; BORELLA, M. I.; LO NOSTRO, F. L.; ARAÚJO, B. C.; BRANCO, G. S.; MOREIRA, R. G. Gonadal remodeling and hormonal regulation during sex change of juvenile dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Teleostei, Serranidae), an endangered protogynous hermaphrodite fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.46, p. 1809–1824. 2020.

ROSENLUND, G.; KARLSEN, O.; TVEIT, K.; MANGOR-JENSEN, A.; HEMRE, G. I. Effect of feed composition and feeding frequency on growth, feed utilization and nutrient

retention in juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua* L. **Aquaculture Nutrition**, v. 10, n. 6, p. 371-378, 2004.

ROSSI, W. JR.; DAVIS, D. A. Replacement of fishmeal with poultry by-product meal in the diet of Florida pompano *Trachinotus carolinus* L. **Aquaculture**, v. 338–341, p. 160–166, 2012.

ROUMBEDAKIS, K.; MARCHIORI, N. C.; PASETO, Á.; GONÇALVES, E. L. T.; LUQUE, J. L.; CEPEDA, P. B.; MARTINS, M. L. Parasite fauna of wild and cultured dusky-grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) from Ubatuba, Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 73, n. 4, p. 871–878, 2013.

ROWLAND, S. J.; MIFSUD, C.; NIXON, M. Effects of stocking density on the performance of the Australian freshwater silver perch (*Bidyanus bidyanus*) in cages. **Aquaculture**, v. 253, n. 1–4, p. 301–308, 2006.

RUYETA, J. P. L.; BAYON, N. L.; GROS, S. How to assess fin damage in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*? **Aquatic Living Resources**, v. 20, n. 2, p. 191–195, 2007.

SADOVY, Y. Regional Survey of fry/Fingerling Supply and Current Practices for Grouper Mariculture: Evaluating Current Status and Long-Term Prospects for Grouper Mariculture in Southeast Asia, pp. 120. University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China, 2000.

SALARI, R.; SAAD, C.R.; KAMARUDIN, M.S.; ZOKAEIFAR, H. Effects of different stocking densities on tiger grouper juvenile (*Epinephelus fuscoguttatus*) growth and a comparative study of the flow-through and recirculating aquaculture system. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 26, p. 3765-3771, 2012.

SALZE, G.P.; DAVIS, A. Taurine: a critical nutrient for future fish feeds. **Aquaculture**, v. 437, p. 215–229, 2015.

SAMAD, M. A.; ISLAM, M. A.; KHALEQUE, M. A. Effect of stocking density on the growth and survival rate of Magur (*Clarias batrachus*) fry in laboratory and nursery ponds. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 2, p. 338-344, 2005.

SAMAD, A. P. A.; HUA, N. F.; CHOU, L. M. Effect of stocking density on growth and feed utilization of grouper (*Ephinephelus coioides*) reared in recirculation and flow-through water system. **African Journal of Agriculture Research**, v. 9, n. 9, p. 812-822, 2014.

SAMPAIO, L. A.; ONO, E.; ROUTLEDGE, E. A. B.; CORREIA, E. S.; MORAES-VALENTI, P. M. C., MARTINO, R. C. Brazilian aquaculture update. **World Aquaculture**, v. 41, p. 35-39/41/67-68, 2010.

SAMPATH, W. W. H. A.; RATHNAYAKE, R. M. D. S.; YANG, M.; ZHANG, W.; KANGSEN, M. Roles of dietary taurine in fish nutrition. **Marine Life Science & Technology**, v. 2, p. 360-375, 2020.

SANCHES, E. G.; AZEVEDO, V. G.; COSTA, M. R. Criação da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei, Serranidae) alimentada com rejeito de pesca e ração úmida em tanques-rede. **Atlântica, Rio Grande**, v. 29, n. 2, p. 121-126, 2007.

SANCHES, E.G.; OLIVEIRA, I.R.; SERRALHEIRO, P.C. Crioconservação do sêmen da garoupa-verdadeira *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Teleostei, Serranidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, p. 389-399, 2009.

SANCHES, E. G.; SILVA, F. C.; LEITE, J. R.; SILVA, P. K. A.; KERBER, C. E.; SANTOS, P. A. Can fish oil incorporation in diet improve the growth performance of dusky grouper *Epinephelus marginatus*? **Boletim do Instituto De Pesca**, v. 40, n. 2, p. 147–155, 2014.

SCHWEDLER, T. E.; JOHNSON, S. K. Responsible care and health maintenance of fish in commercial aquaculture Animal Welfare Information Center Bulletin, Winter 1999/2000, v. 10, p. 3-4, 2000.

SHAO, T.; CHEN, X.; ZHAI, D.; WANG, T.; LONG, X.; LIU, Z. Evaluation of the effects of different stocking densities on growth and stress responses of juvenile hybrid grouper ♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus* in recirculating aquaculture systems. **Journal of Fish Biology**, v. 95, n. 4, p. 1022-1029, 2019.

SHAPAWI, R.; MUSTAFA, S.; NG, W. K. A comparison of the growth performance and body composition of the humpback grouper, *Cromileptes altivelis* fed on farm-made feeds, Commercial feeds or trash fish. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 6, n.5, p. 523-524, 2011.

SHEN, G.; WANG, S.; DONG, J.; FENG, J.; XU, J.; XIA, F.; WANG, X.; YE, J. Metabolic effect of dietary taurine supplementation on grouper (*Epinephelus coioides*): a 1H-NMR-based metabolomics study. **Molecules**, v. 24, n. 12, p. 1-16, 2019.

SHIAU, S. Y.; LAN, C. W. Optimum dietary protein level and protein to energy ratio for growth for grouper (*Epinephelus malabaricus*). **Aquaculture**, v. 145, p. 259 -266, 1996.

SHIAU, S. Y.; LIN, Y. H. Carbohydrate utilization and its protein-sparing effect in diets for grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Animal Science**, v. 73, n. 2, p. 299-304, 2001.

SILVA, F. C.; KUHNEN, V. V.; SANCHES, E. G. Refrigerated storage of dusky grouper *Epinephelus marginatus* sperm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1557– 1564, 2018.

SIM, S. Y.; RIMMER, M.; WILLIAMS, K.; TOLEDO, J. D.; SUGAMA, K.; RUMEGAN, I.; WILLIAMS, K. C.; PHILLIPS, M. J. A practical guide to feeds and feed management for cultured groupers. Bangkok: NACA, 18p., 2005.

SIM, S. Y. **Grouper aquaculture in three Asian countries**. PhD thesis, Deakin University, Australia, 254 p., 2006

SOUSA, O. M.; OLIVEIRA, N. Y.; KUHNEN, V. V.; SANCHES, E. G. Feeding frequency for dusky grouper *Epinephelus marginatus* juveniles with automatic feeding system. **Aquaculture Research**. v. 50, n. 10, p. 3009–3016, 2019

SOUZA, R. S. R.; ANNUNCIACÃO, W. F.; LINS, S. M.; SANCHES, E. G.; MARTINS, M. L.; TSUZUKI, M. Y. Can barber goby *Elacatinus figaro* control *Neobenedenia melleni* infections on dusky grouper *Epinephelus marginatus*? **Aquaculture Research**, v. 45, n. 4, p. 619–628, 2014.

SPANDRI, V. C.; TAKATSUKA, V.; SOUSA, O. M.; KUHNEN, V. V.; SANCHES, E. G. Can compensatory growth be used as feed management for dusky grouper? **Aquaculture Research**. V. 52, n. 6, p. 2891-2895, 2020.

SPEDICATO, M. T.; LEMBO, G.; DI MARCO, P.; MARINO, G. Preliminary results in the breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). In Marine Aquaculture Finfish Species Diversification. pp. 131–148. CIHEAM, Zaragoza, 1995.

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

SUN, G.; LIU, Y.; QIU, D.; YI, M.; LI, X.; LI, Y. Effects of feeding rate and frequency on growth performance, digestion and nutrients balances of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in recirculating aquaculture systems (RAS). **Aquaculture Research**, v. 47, n. 1, p. 176-188, 2014

TACON, A. G. J. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados: manual de capacitación. Organización de las Naciones Unidas para Agricultura y la Alimentación (FAO), Brasilia, 572 pp., 1989

TACON, A. G. J.; RAUSIN, N.; KADARI, M.; CORNELIS, P. The food and feeding of tropical marine finfish in floating net cages: Asian seabass, *Lates calcarifer* (Bloch) and the Brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.). **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 22, n. 2, p. 165–182, 1991.

TACON, A. G. J.; METIAN, M. Fishing for aquaculture: non-food use of small pelagic forage fish – a global perspective. **Reviews in Fisheries Science**, v. 17, n. 3, p. 305–317, 2009.

TACON, A. G. J.; METIAN, M. Feed Matters: Satisfying the Feed Demand of Aquaculture. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 23, n. 1, p. 1-10, 2015

TAKAGI, S.; MURATA, H.; GOTO, T.; ENDO, M.; YAMASHITA, H.; UKAWA, M. Taurine is an essential nutrient for yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed non-fish meal diets based on soy protein concentrate. **Aquaculture**, v. 280, n. 1–4, p. 198–205, 2008.

TAKAGI, S.; HISASHI, M.; GOTO, T.; HATATE, H.; ENDO, M.; YAMASHITA, H. Role of taurine deficiency in inducing green liver symptom and effect of dietary taurine supplementation in improving growth in juvenile red sea bream *Pagrus major* fed non-fishmeal diets based on soy protein concentrate. **Fisheries Science**, v. 77, p. 235–244, 2011.

TAKEUCHI, T.; PARK, G. S.; SEIKAI, T.; YOKOYAMA, M. Taurine content in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* T. & S. and red sea bream *Pagrus major* T. & S. during the period of seed production. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 1, p. 244–248, 2001.

TENG, S.K.; CHUA, T.E. Effect of stocking density on the growth of estuary grouper, *Epinephelus salmoides* Maxwell, cultured in floating net-cages. **Aquaculture**, v. 15, p. 273-287, 1978.

- TESSER, M. B.; SILVA, E. M.; SAMPAIO, L. A. Whole-body and muscle amino acid composition of Plata pompano (*Trachinotus marginatus*) and prediction of dietary essential amino acid requirements. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 27, n. 4, p. 299–305, 2014.
- TIAN, H. Y.; ZHANG, D. D.; LI, X. F.; ZHANG, C. N.; QIAN, Y. LIU, W.B. Optimum feeding frequency of juvenile blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*. **Aquaculture**, v. 437, p. 60-66, 2015.
- TSUZUKI, M. Y.; BERESTINAS, A. C. Desempenho de juvenis de robalo-peva *Centropomus parallelus* com diferentes dietas comerciais e frequências alimentares. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 4, 535-541, 2008.
- TUCKER, J. W. JR. Grouper Culture. In AM Kelly, J Silverstein (eds) Aquaculture in the 21st Century, American Fisheries Society, Symposium 46, Bethesda, MD, p, 307-338, 2005.
- TUPPER, M.; SHERIFF, N. Capture-based aquaculture of groupers. In A Lovatelli, PF Holthus (eds) Capture-Based Aquaculture. Global Overview. FAO Fisheries Technical Paper. No. 508, Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, p. 217-253, 2008.
- VALENTI, W. C.; BARROS, H. P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G. W.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture reports**, v. 19, p. 1-18 2021.
- VI, N. T. T.; QUANG, V. V. Q.; THAO, L. T. T. T.; HOA, T. T. H. H.; THINH, T. C. Availability of grouper (Serranidae) fingerlings and seed in the coral reef of Son Tra Peninsula, central Viet Nam. In S Wilkinson (ed.) Aquaculture Asia, Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand, p. 15-21, 2015.
- VOLKOFF, H.; PETER, R. E. Feeding Behavior of fish and Its Control. **Zebrafish**, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2006.
- WANG, Y.; CHI, L.; LIU, Q.; XIAO, Y.; MA, D.; XIAO, Z.; MA, D.; XIAO, Z.; XU, S.; LI, J. Effects of stocking density on the growth and immunity of Atlantic salmon *Salmo salar* reared in recirculating aquaculture system (RAS). **Journal of Oceanology and Limnology**, v. 37, p. 350–360, 2018.
- WEI, Y.; LIANG, M.; XU, H.; ZHENG, K. Taurine alone or in combination with fish protein hydrolysate affects growth performance, taurine transport and metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 1–10, 2018.
- WHAYLEN, L.; PATTENGILL-SEMMENS, C. V.; SEMMENS, B. X.; BUSH, P. G.; BOARDMAN, M. R. Observations of a Nassau grouper, *Epinephelus striatus*, spawning aggregation site in Little Cayman, Cayman Islands, including multi-species spawning information. **Environmental Biology of Fishes**, v.70, p. 305-313, 2004.
- WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the waters Pico-tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 8, p. 170–177, 1986.
- WILSON, R. P.; COWEY, C. B. Amino acid composition of whole-body tissue of rainbow trout and Atlantic salmon. **Aquaculture**, v.48, p. 373–376, 1985.

WILSON, R. P.; POE, W. E. Relationship of whole body and egg essential amino acid patterns in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 80, p. 385–389, 1985.

WU, Y.; HAN, H.; QIN, J.; WANG, Y. Effect of feeding frequency on growth, feed utilization, body composition and waste output of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*) reared in net pens. **Aquaculture Research**, v. 46, n. 6, p. 1436–1443, 2015.

Wu, M. J.; Wu, X. Y.; Lu, S. D.; Gao, Y. J.; Yao, W.; Li, X. J.; Dong, Y.; Jin, Z. B. Dietary arginine affects growth, gut morphology, oxidation resistance and immunity of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂) juveniles. **British Journal of Nutrition**, v. 120, n. 3, p. 269–282, 2018.

YANG, Y.; LIN, C. K. Effects of biomass of caged Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and aeration on the growth and yields in an integrated cage-cum-pond system. **Aquaculture**, v.195, n. 3–4, p. 253–267, 2001.

ZAR, J. H. Biostatistical analysis, 2nd edn. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1984.

ZHOU, Z. Y.; WANG, X.; WU, X. Y.; GAO, Y. J.; LI, X. J.; DONG, Y.; YAO, W. Effects of dietary leucine levels on growth, feed utilization, neuro-endocrine growth axis and TOR-related signaling genes expression of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂). **Aquaculture**, v. 504, p. 172–181, 2019.

ZHOU, Z. Y.; WU, X. Y.; LI, X. J.; DONG, Y.; WANG, X.; MU, W.; GATLIN, D. M.; ZHANG, Y. The optimum dietary isoleucine requirement of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂). **Aquaculture Nutrition**, v. 26, n. 4, p. 1295-1310, 2020.

ZHU, Y. J.; YANG, J. W.; CHEN, W.; YI, J. F.; LIU, W. C.; ZHAO, J. H. An evaluation of stocking density in the cage culture efficiency of Amur sturgeon *Acipenser schrenckii*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, n. 2, p 545-549, 2011.