

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**FONTES E NÍVEIS DE LIPÍDIOS EM DIETAS PARA
GIRINOS DE RÃ-TOURO**

Donovan Filipe Henrique Pinto
Engenheiro de pesca

Jaboticabal, São Paulo

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**FONTES E NÍVEIS DE LIPÍDIOS EM DIETAS PARA
GIRINOS DE RÃ-TOURO**

Donovan Filipe Henrique Pinto
Engenheiro de pesca

Orientadora: Dra. Marta Verardino De Stéfani

Jaboticabal, São Paulo

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**FONTES E NÍVEIS DE LIPÍDIOS EM DIETAS PARA
GIRINOS DE RÃ-TOURO**

Donovan Filipe Henrique Pinto

Orientadora: Dra. Marta Verardino De Stéfani

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Jaboticabal, São Paulo

2018

P659f Pinto, Donovan Filipe Henrique
Fontes e níveis de lipídios em dietas para girinos de rã-touro/
Donovan Filipe Henrique Pinto. -- Jaboticabal, 2018
iv, 68 p. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2018

Orientadora: Marta Verardino De Stéfani

Banca examinadora: Dalton José Carneiro, Eduardo Gianini
Abimorad, João Batista Kochenborger Fernandes, Hellen Buzollo
Pazzini.

Bibliografia

1. *Lithobathes catesbeianus*. 2. Lipídio digestível. 3. Nutrição. 4.
Óleo. 5. Ranicultura. 6. Ácidos graxos. I. Título. II. Jaboticabal-Centro
de Aquicultura.

CDU 636.95

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

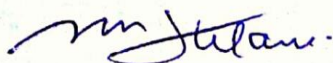
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Fontes e níveis de lipídios em dietas para
girinos de rã-touro

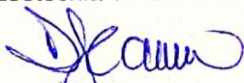
AUTOR: DONOVAN FILIPE HENRIQUE PINTO

ORIENTADORA: MARTA VERARDINO DE STÉFANI

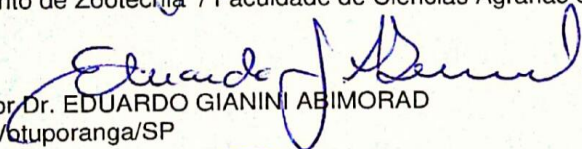
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AQUICULTURA,
pela Comissão Examinadora:



Prof. Dra. MARTA VERARDINO DE STÉFANI
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



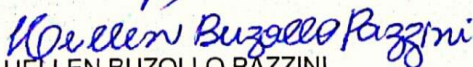
Prof. Dr. DALTON JOSÉ CARNEIRO
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal/ UNESP



Pesquisador Dr. EDUARDO GIANINI ABIMORAD
. / APTA / Votuporanga/SP



Prof. Dr. JOÃO BATISTA KOCHENBORGER FERNANDES
Laboratório de Peixes Ornamentais / Centro de Aquicultura - CAUNESP



Prof. Dra. HELLEN BUZOLLO PAZZINI
. / Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP, São José do Rio Preto-SP

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2018.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio e consentimento desde sempre. À Luize, pessoa que me dá sentido à vida e com qual amo compartilhar cada momento e sentimento, todo meu amor e admiração.

Agradecimentos

Agradeço a todos que participaram direta e indiretamente da execução deste projeto. A orientação, aprendizagem, paciência e cuidados dispensados no decorrer do processo de produção científica pela Professora Marta Verardino De Stéfani.

A viabilização de parte da pesquisa pelos Professores Dalton José Carneiro e João Batista Kochenborger Fernandes. À colaboração e desenvolvimento da pesquisa de Cleber Fernando Menegasso Mansano, Thiago M. Torres Do Nascimento, Bruno Tadeu Marotta Lima e Rudã Fernandes Brandão Santos.

Aos membros das bancas de avaliação, Professores João Batista Kochenborger Fernandes, Dalton José Carneiro, Eduardo Gianini Abimorad, Thiago M. Torres Do Nascimento e Hellen Buzollo Pazzini, por todos os apontamentos e colaborações prestadas.

Ao apoio técnico daqueles ligados ao setor de Ranicultura e Laboratório de Ornamentais CAUNESP, Marcio Roberto Reche e Valdecir Fernandes de Lima. Assim como toda atenção e assistência dos funcionários da pós-graduação Veralice Capato e David Lorente.

À Poitara, empresa fornecedora de parte dos ingredientes utilizados na pesquisa. Assim como todo apoio e infraestrutura cedidos pelos laboratórios Lana (Laboratório de análises de nutrição animal – FCAV), Laboratório de Ciências Avícolas da Unesp (FCAV) e Laboratório de Metabolismo e Reprodução em Organismos Aquáticos (Universidade de São Paulo).

Aos infinitos debates, companheirismo e apoio prestados por Bruno Henrique Sardinha de Souza, Felipe Escudeiro Pavani e Steffan Edward Octávio Oliveira. Por fim, àqueles que me facultaram sustento emocional e material para galgar este caminho: meus pais (Fábio Francisco Pinto e Eunice Ap. Henrique Pinto), irmãos (Fábio Francisco Pinto Jr. e Gustavo Louis Henrique Pinto) e a minha amada esposa e companheira (Luize Predebon).

Apoio Financeiro

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq –
por parte do auxílio concedido na forma de Bolsa de Doutorado.

(Processos Nº 141775/2017-3 e Nº 140193/2018-9).

Sumário

CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1. Hábito alimentar de girinos de rã-touro	2
2. Digestibilidade	3
3. Fontes de óleo na alimentação animal (lipídios dietéticos).....	4
3.1. Óleo de milho	7
3.2. Óleo de canola	8
3.3. Óleo de girassol	9
3.4. Óleo de linhaça	10
3.5. Óleo de peixe	11
3.6. Óleo de salmão	12
4. Deposição corporal	12
5. Referências bibliográficas	14
Manuscrito 1 – Fontes e métodos de determinação da digestibilidade de lipídios em girinos de rã-touro.....	24
Resumo	25
Abstract.....	26
1. Introdução	27
2. Materiais e Métodos.....	28
2.1. Material biológico e condições experimentais	28
2.2. Dietas experimentais.....	30
2.3. Manejo alimentar e coleta de fezes.....	32
2.4. Processamento das amostras e análises laboratoriais	33
2.5. Delineamento experimental.....	33
2.6. Método de análise.....	34
2.7. Análise estatística	34
3. Resultados	35

3.1. Coeficiente de digestibilidade aparente do lipídio (CD_{LIP}) dos diferentes óleos	35
4. Discussão	36
5. Conclusão	38
6. Referências bibliográficas	39
Manuscrito 2 – Níveis e fontes de lipídios para girinos de rã-touro:	
desempenho e composição corporal	42
Resumo	43
Abstract.....	44
1. Introdução	45
2. Materiais e Métodos.....	46
2.1. Condições experimentais e animais utilizados.....	46
2.2. Dietas experimentais.....	47
2.3. Parâmetros de desempenho	51
2.4. Processamento das amostras e análises laboratoriais	51
2.5. Análise estatística	52
2.6. Delineamento experimental.....	53
3. Resultados	53
3.1. Desempenho e composição corporal	53
3.2. Composição dos ácidos graxos corporais.....	58
4. Discussão	63
5. Conclusão	65
6. Referências Bibliográficas	66

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A ranicultura, definida como a criação racional de rãs, é uma atividade zootécnica e econômica, cujo crescimento ocorreu na última década, em virtude de evoluções tecnológicas e, principalmente, do gradativo aperfeiçoamento das instalações e técnicas de manejo (CRIBB et al., 2013). É uma atividade em expansão em vários países, principalmente Brasil, China, Cuba, Equador, Indonésia, México, Taiwan e Tailândia (TEIXEIRA et al., 2001). O Brasil possui um imenso potencial de competição no cenário global por ter alcançado *know how* na produção em cativeiro, detendo tecnologias como, produção intensiva, parque agroindustrial, ampla rede de pesquisa e clima favorável (LIMA e CRUZ, 2000; CARDOZO JR., 2014).

Originária da América do Norte, a rã-touro gigante (*Lithobates catesbeianus*), introduzida no Brasil em 1935, habituou-se bem ao clima tropical, apresentando desenvolvimento precoce e ciclo de produção reduzido comparado ao local de origem (LIMA e AGOSTINHO, 1992; CRIBB et al., 2009). Se adaptou satisfatoriamente aos diferentes manejos físicos e alimentares de cada região, o que permitiu seu cultivo nacionalmente (CRIBB et al., 2013).

Na ranicultura, a fase de criação de girinos é muito importante, pois dela resultará, após a metamorfose, imagos em condições ideais que atendam aos índices zootécnicos satisfatórios na fase de recria (SEIXAS FILHO et al., 1998). Atualmente, são utilizadas rações comerciais para a alimentação dos girinos (ALBINATI et al., 2000). Estas podem causar deficiências nutricionais nos animais, levando a baixos resultados de desempenho (SEIXAS FILHO et al., 2011), heterogeneidade dos lotes (BARBOSA et al., 2005), além do aumento na mortalidade (HIPÓLITO et al., 2007).

A alimentação representa cerca de 57% do custo de produção de rãs no Brasil (LIMA e AGOSTINHO, 1992). Portanto, pesquisas são necessárias para o desenvolvimento de uma dieta adequada às exigências nutricionais dos girinos e que diminuam os custos da produção, e redução de nutrientes ao meio ambiente (N e P).

1. Hábito alimentar de girinos de rã-touro

Os girinos de rã-touro apresentam um tubo digestório longo, sem distinção anatômica do estômago, e o intestino chega a ser seis vezes maior que o próprio girino na fase de maior desenvolvimento (OLIVEIRA-BAHIA, 2007), classificando-o de acordo com Bértin (1958) com hábito alimentar onívoro.

Segundo Just et al. (1981), os girinos anuros apresentam três métodos básicos de alimentação: (1) filtração de partículas em suspensão; (2) ingestão de algas ou plantas aquáticas vasculares; (3) consumo de matéria animal morta ou viva. Portanto, como “filtradores”, os girinos ingerem organismos em suspensão (algas, protozoários, bactérias, partículas finas de plantas vasculares), e o tamanho das partículas variam de 0,1 µm até partículas maiores de acordo com a abertura da boca.

O bombeamento da água pela boca e a captura do alimento pelos girinos anuros foi descrita por Seale e Wassersug (1979). Assim, a água que entra na boca é movida pela ação entre o bombeamento dos músculos e do esqueleto cartilaginoso na parte inferior da cavidade bucal saindo através do espiráculo. O velo, uma porção não-muscular móvel, divide a cavidade oral de todos os girinos (exceto em pipídeos) em uma cavidade bucal anterior e uma cavidade faríngea posterior. Partículas alimentares maiores são aprisionadas pela cavidade bucal anterior e partículas menores são aprisionadas no muco segregado pela superfície branquial. O alimento preso é transportado através de cílios para o esôfago.

Todos os girinos herbívoros e carnívoros utilizam-se de bicos córneos e dentes labiais para triturar os alimentos mecanicamente e, em seguida, utilizam o aparelho de filtração para prender o alimento para a digestão (JUST et al., 1981). Independentemente de como obtém o alimento, girinos anuros possuem uma forma de “controlar” a fome, diminuindo drasticamente a taxa de movimento dos alimentos através do intestino durante os períodos de inanição, permitindo maiores taxas de assimilação (WASSERSUG, 1975).

A maioria dos girinos possuem várias enzimas digestivas, incluindo pepsina, amilase e lipase (ALTIG et al., 1975). Uma vez que eles não têm celulase, muito material vegetal passa através do trato alimentar intacto (JUST et al., 1981). A atividade da lipase

atinge um pico em *Xenopus* nos estágios 54 e 56 de Nieuwkoop e Faber (1967), e diminui para um mínimo no final do clímax da metamorfose, correspondendo ao período em que ocorre pouca alimentação. Após a metamorfose, a atividade enzimática aumenta gradualmente até atingir o nível adulto (JUST et al., 1981). Mesmo comportamento foi observado para a lipase em girinos de rã-touro, onde sua atividade foi verificada no quimo desde o estágio 25 de Gosner (1960), aumentando na fase pré-metamórfica possivelmente devido à melhor funcionalidade do pâncreas, e pelo maior requerimento para o desenvolvimento dos membros posteriores (SEIXAS FILHO et al., 2008).

É comum em girinos anuros, alguns crescerem e se metamorfosearem enquanto a maioria permanece atrofiada (SALTHER e MECHAM, 1974). Isso pode ocorrer mesmo com alta disponibilidade de alimentos, porque os girinos maiores: (1) produzem uma substância que impede o crescimento dos girinos pequenos; (2) são filtradores mais eficientes e assim competem com os menores por alimento; (3) impedem animais menores de acessarem o alimento (STEINWASCHER, 1978).

2. Digestibilidade

Estudos de digestibilidade avaliam a disponibilidade dos nutrientes e energia de ingredientes e dietas, os quais são fundamentais para a formulação de dietas nutricional, econômica e ambientalmente eficientes (FRACALOSSO et al., 2013). Para as diferentes espécies, cada ingrediente possui uma disponibilidade energética, conforme suas particularidades na fisiologia digestiva (DEGANI e REVACH, 1991).

O método normalmente mais utilizado para a determinação da digestibilidade dos nutrientes em animais aquáticos é o método indireto, onde a coleta de fezes é parcial, a alimentação do animal é voluntária e, envolve o uso de um indicador na dieta, como o óxido de cromo (III), substância inerte e indigestível. Nesse método, o ingrediente teste deve ser incorporado junto com uma dieta referência que atendeu às exigências nutricionais da espécie (FRACALOSSO et al., 2013). Cho et al. (1985) recomendaram o uso de 70% da dieta referência mais 30% do ingrediente teste para simular condições práticas de alimentação. Em trabalhos com girinos de rã-touro para determinação da

digestibilidade do óleo foi utilizado 90% da dieta referência e 10% do ingrediente teste (ALBINATI et al., 2000; SECCO et al., 2005).

Com o método indireto (método da substituição), foi determinada a digestibilidade da proteína e energia de diferentes ingredientes utilizados em dietas para girinos de rã-touro, entre eles o óleo de soja que apresentou coeficiente de digestibilidade aparente da energia bruta (CD_{EB}) de 70% (SECCO et al., 2005). Para rãs-touro pós-metamorfoseadas foram determinados os coeficientes de digestibilidade aparente do lipídio de diferentes fontes de óleo, onde os óleos de peixe e de soja apresentaram os maiores valores, 97% e 95,8%, respectivamente (ZHANG et al., 2016).

De acordo com Henn et al., (2006), quando a inclusão do ingrediente-teste é uma pequena porção da dieta fornecida aos animais, a multiplicação do erro pode ser substancial. Ao contrário, se a inclusão for elevada, pode haver interferência na eficiência digestiva dos animais, alterando os resultados. Para evitar esses problemas, Henn et al. (2006) utilizaram o método da proteína e da gordura digestível para determinar a energia digestível das farinhas de sangue e de vísceras para suínos. Nesta metodologia, o coeficiente de digestibilidade aparente do nutriente é calculado através de análise de regressão, onde a inclinação da reta (valor de b) corresponde ao valor do coeficiente de digestibilidade do nutriente, sendo uma boa alternativa ao método de substituição no cálculo da digestibilidade de ingredientes que não podem ser adicionados em altos níveis em dietas.

3. Fontes de óleo na alimentação animal (lipídios dietéticos)

Os lipídios, juntamente com as proteínas e carboidratos, constituem a principal classe de macronutrientes necessários para produção de energia, formação e desenvolvimento de células e tecidos, permitindo o crescimento e a manutenção da homeostase em todos os organismos vertebrados (TURCHINI et al., 2010). Em virtude das proporções de carbono, hidrogênio e oxigênio nas gorduras serem maiores que nos carboidratos, fornecem 2,25 vezes mais energia por quilo, na oxidação (ANDRIGUETTO et al., 2002). Dentro de certos limites, o aumento do nível de lipídios nas dietas melhora

a utilização dos alimentos, exercendo efeito poupador de proteína, para a produção de energia (DU et al., 2008).

Os lipídios são constituídos de ácidos graxos, os quais são classificados em função do comprimento e do grau de insaturação (número de duplas ligações) da cadeia de carbono (LEHNINGER et al., 1995). Os ácidos graxos do grupo ômega 6, são assim chamados por apresentarem a primeira insaturação (dupla ligação), na cadeia carbônica, no sexto átomo de carbono, a partir do lado oposto ao do carbono carboxílico (COOH). É transformado pelo organismo humano no ácido araquidônico, C_{20:4} e, desta transformação, resultam, além do ácido araquidônico, pequenas quantidades de outros ácidos graxos poli-insaturados semelhantes ao primeiro (GURR, 1995). Diversos ácidos graxos poli-insaturados não podem ser produzidos endogenamente, por isso são chamados de essenciais, ou seja, são oriundos apenas da dieta (WAITZBERG, 2006).

Os ácidos graxos de ocorrência mais comum encontrados em peixes (Tabela 1) contêm números pares de átomos de carbono (C₁₂-C₂₄), em cadeias lineares, com um grupo carboxilo terminal e ligações etilênicas, geralmente sob a configuração cis (TURCHINI et al., 2010). A composição de ácidos graxos das reservas lipídicas geralmente se assemelha à do alimento (COWEY et al., 1976).

Os ácidos graxos da dieta são absorvidos no intestino e rearranjados na forma de triglicerídeos. Como lipídios, que não são miscíveis com a água, para que possam ser transportados num meio predominantemente aquoso, como é o sangue, faz-se necessária a estabilização dos mesmos por camadas de fosfolipídios e proteínas. Essas partículas resultantes são as chamadas lipoproteínas (BNF, 1994). Após a absorção de ácidos graxos nas células, eles se tornam ligados a baixo peso molecular (12 -15 kDa) (GLATZ et al., 1997).

Tabela 1 - Ácidos graxos comumente encontrados em tecidos de peixe.

Nome sistemático	Nome comum	Designação abreviada
Ácidos graxos saturados		
Dodecanóico	Láurico	24:0
Tetradecanóico	Mirístico	14:0
Hexadecanóico	Palmítico	16:0
Octadecanóico	Esteárico	18:0
Eicosanóico	Araquídico	20:0
Docosanóico	Beénico	22:0
Tetracosanóico	Lignocérico	24:0
Ácidos graxos monoinsaturados		
7-hexadecanóico	Palmitoleico	16:1n-7
cis-9-octadecenóico	Oleico	18:1n-9
11-octadecenóico	Vaccénico	18:1n-7
9-eicosenóico	Gondóico	20:1n-11
11-eicosenóico	Gadoleico	20:1n-9
11-docosanóico	Cetoleico	22:1n-11
13-docosanóico	Erúcico	22:1n-9
15-tetracosanóico	Lignocérico	24:1n-9
Ácidos graxos poliinsaturados		
9-12-octadecadienoico	Linoleico	18:2n-6
6,9,12-octadecatrienóico	Alfalinolênico	18:3n-6
8,11,14-eicosatrienóico	Gamalinolênico	20:3n-6
5,8,11,14-eicosatetraenóico	Araquidônico	20:4n-6
7,10,13,16-docosatetraenóico	Adrênico	22:4n-6
4,7,10,13,16-docosapentaenóico	Docosapentaenóico	22:5n-6
9,12,15-octadecatrienóico	Alfalinolênico	18:3n-3
6,9,12,15-octadecatrienóico	Estearidônico	18:4n-3
8,11,14,17-eicosatetraenóico	Eicosatetraenóico	20:4n-3
5,8,11,14,17-eicosapentaenóico	Timnodônico	20:5n-3
7,10,13,16,19-docosapentaenóico	Clupanodônico	22:5n-3
4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico	Cervônico	22:6n-3

*Fonte: Turchini et al., (2010)

Nos últimos anos, há uma busca por novas fontes de óleo na indústria de alimentação animal que substituam as originadas do extrativismo de fontes naturais, como o óleo de peixe marinho (TRUSHENSKI e LOCHMANN, 2009, TURCHINI et al., 2010). Os óleos de peixe são tipicamente caracterizados por uma matriz de ácidos graxos que variam em comprimento de cadeia de C12 a C24, porém, os ácidos graxos principais presentes em concentrações maiores incluem 14:0, 16:0, 16:1n-7, 18:1n-9, 20:5n-3 e 22:6n-3 (TURCHINI et al., 2010). Com relação aos óleos de origem vegetal, a época, o local, as condições climáticas e as características genéticas da planta utilizada

influenciam no perfil dos ácidos graxos, porém, a maioria dos óleos utilizados comercialmente são fontes de ácidos graxos importantes, como é o caso do girassol que possui grandes concentrações de ácido linoleico, C18:2n-6 (LEITE et al., 2005).

Segundo Pupa (2004), com o aperfeiçoamento dos métodos de extração de óleos, reduziu-se o teor de extrato etéreo nos resíduos normalmente utilizados na composição das dietas e, gradativamente o número de componentes de rações vêm sofrendo uma extração prévia de gordura. Tais métodos eficientes usados atualmente, para a extração dos materiais gordurosos da farinha de peixe e das sementes oleaginosas resultam em uma carência de ácidos graxos nos componentes da dieta, a qual pode ser compensada pela adição de fonte de óleo ou gordura.

Em particular, espécies de peixes que possuem proporções muito elevadas (> 5%) de 20:1n-9 (gadoleico) e 22:1n-11 (cetoleico), é indicativo de uma dieta rica em zooplâncton (copépodes, euphausiids e calanoida) que contêm abundância de ésteres de cera (ACKMAN, 2008). No entanto, a composição de ácidos graxos dos óleos de peixe individuais variam consideravelmente, influenciado por fatores como idade, tamanho, espécie, estado reprodutivo, localização geográfica, e a época do ano quando pescado (TURCHINI et al., 2010).

Com relação a girinos de rã-touro, não há estudos sobre a utilização de diferentes fontes de óleo em sua dieta, bem como sua influência no desempenho dos animais. Para rãs-touro pós-metamorfoseadas foi observado que os óleos de soja e de dendê na proporção de 5,2% na dieta podem substituir totalmente o óleo de peixe, não afetando o desempenho dos animais (ZHANG et al., 2016).

3.1. Óleo de milho

Os óleos de sementes têm demandas extensas tanto para alimentação animal, para o consumo humano, como para aplicações industriais (KYARI, 2008). O óleo de milho é obtido por um processo da recuperação de óleo a partir do germe de milho, envolvendo o pré-tratamento do germe por reidratação, condicionamento e, opcionalmente, descamação. Isto é seguido por extrusão, que é a operação central na preparação do germe de milho para recuperação do óleo (MAZA, 2001).

No Brasil, a utilização primária da produção de milho é para a alimentação animal (84%), principalmente avicultura e suinocultura, e 11% é consumido pela indústria, para diversos fins. Seu uso industrial não se restringe a alimentos. Ele é largamente utilizado na produção de elementos espessantes, colantes e na produção de óleos (MENEGALDO, 2011). O óleo de milho tem elevada concentração de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) essenciais, tais como ácido linoleico (46-60%), pouco ácido linolênico (1%), monoinsaturados (24,2% de ácido oleico), saturados (12,7% de ácido palmítico e esteárico), não contém colesterol e altas concentrações de tocoferol e antioxidantes carotenoides (WEBER et al., 1987).

As plantas geneticamente modificadas aumentaram o teor de óleo de 6,5 para 11%, melhorando a disponibilidade de energia na alimentação animal. Tal modificação genética produzem grande variedade de óleos com diferentes composições de ácidos graxos, no entanto, o óleo de milho transgênico possui propriedades semelhantes às da contrapartida isogênica (SHATTA et al., 2016).

3.2. Óleo de canola

Canola é a marca registrada da “Canola Council of Canada” para a semente, óleo e derivados de cultivares de colza, com baixo teor de ácido erúico e glicosinolatos (CGC, 2017). Diferente da maioria dos óleos vegetais, o problema do óleo de canola é o teor de clorofila, que requer um processamento extra e esforço analítico, e certas limitações no comportamento de cristalização quando altamente hidrogenadas. Em escala comercial, certos processamentos com a utilização de ácidos são necessários para a produção do óleo bruto degomado, possibilitando aplicar refinação física ao óleo (MAG, 1983).

O óleo de canola é um potencial candidato para fornecer energia suficiente na forma de ácidos graxos monoenoícos mantendo altas taxas de crescimento à medida em que possui níveis moderados de 18:2 (n-6) e 18:3 (n-3), em proporção de 2:1 e uma abundância de 18:1 (n-9). A proporção de 18:2 (n-6) / 18:3 (n-3) no óleo de canola torna-o benéfico para a saúde humana, bem como para a saúde dos peixes (ACKMAN, 1990).

É um substituto efetivo do óleo de peixe para o salmão do Atlântico, permitindo taxas de crescimento e eficiência alimentar semelhantes, sem efeitos aparentes sobre a

saúde dos peixes. No entanto, a inclusão do óleo de canola em níveis superiores a 50% dos lipídios suplementares resulta em diminuições significativas da relação PUFA (n-3) / (n-6) e das concentrações de EPA e DHA na carne do peixe, reduzindo consideravelmente assim os benefícios nutricionais do peixe para o consumidor humano. Isso não impede o uso de níveis mais elevados de óleo de canola em dietas para o salmão do Atlântico, desde que usados em tempo apropriado antes da comercialização (BELL et al., 2001).

3.3. Óleo de girassol

O óleo de girassol é originado através da planta anual da família das Asteraceae (*Helianthus annuus*). Obtido por prensagem mecânica a frio, é considerado uma boa fonte de vitamina E (58 mg/ 100g de óleo) e de polifenóis (TURATTI et al., 2001). Os objetivos principais do melhoramento genético desta espécie devem ser, além da obtenção de cultivares com elevado teor de óleo, a aquisição de um farelo que também possua boa qualidade nutricional (MANDARINO, 1992)

A composição química das sementes de qualquer genótipo de girassol varia amplamente com o local de produção, clima, fertilizantes e até mesmo com a posição da semente (LEITE et al., 2005). A utilização do óleo de girassol pelas indústrias é dada de acordo com a composição dos ácidos graxos, pois dois tipos de óleo podem ser obtidos, um com elevado teor de ácido oleico (80-90%) e outro com elevado teor de ácido linoleico (70-80%). Esses dois tipos de óleos possuem diferentes utilidades industriais, e mantêm suas composições de ácidos graxos, apesar das variações de ambiente (MANDARINO, 1992).

Quanto ao teor de vitaminas, o caroço apresenta: Vitamina A (50 UI), tiamina (1,96mg/100g), riboflavina (0,23mg/100g) e niacina (5,4 mg/100g). A energia contida no caroço é da ordem de 560 Kcal/100g e, dos carboidratos totais, 3,8 g/100g são representadas pela fibra bruta. O teor percentual médio de água, proteína e gordura total em base seca das sementes de girassol, são de 4,8%, 24% e 47,3%, respectivamente (LEITE et al., 2005).

De maneira geral, a semente de girassol possui cerca de 45 a 65% de óleo em sua composição (GRUNVALD et al., 2014). O óleo de girassol é essencialmente constituído por triacilgliceróis (98 a 99%). Tem um elevado teor em ácidos graxos insaturados (cerca de 83%), e em vitamina E (alfa-tocoferol), mas um reduzido teor em ácido linolênico ($\leq 0,2\%$). É essencialmente rico em ácido graxo essencial, ácido linoleico (cerca de 60%) que auxilia na redução do colesterol plasmático (IOCCA et al., 2015).

3.4. Óleo de linhaça

A linhaça (*Linum usitatissimum* L.) é a semente do linho, planta pertencente à família das Lináceas, que tem sido cultivada há cerca de 4000 anos nos países mediterrâneos (GALVÃO et al., 2008). Dentre os alimentos funcionais, a linhaça é reconhecidamente uma das maiores fontes de ácidos graxos essenciais ω -3 e ω -6, possuindo ainda diversos nutrientes como as fibras e os compostos fenólicos, conhecidos por exercerem atividade antioxidante (MAYES, 1994). A presença de compostos com potencial antioxidante em alimentos como a linhaça desponta como uma alternativa natural contra os efeitos oxidativos dos radicais livres sobre os alimentos, uma vez que a utilização segura de antioxidantes sintéticos como o butil hidroxitolueno (BHT) tem sido questionada (devido à problemas de solubilidade, aparecimento de sabores estranhos, como “off-flavors”, e caráter toxicológico) (GALVÃO et al., 2008).

Entre os componentes da linhaça há tanto fibras solúveis quanto insolúveis (NORTHROP, 2004). Rica em ácidos graxos essenciais, com elevado teor de lipídios (32 a 38%), sendo que destes 50 a 55% são do ácido graxo insaturado α -linolênico (18:3n-3), pertencente à família ω 3 (GÓMEZ, 2003). Contém ainda ácido linoleico (da família ω 6) e ácidos graxos monoinsaturados e saturados (GALVÃO et al., 2008).

O óleo é usado pelas indústrias na fabricação de tintas, vernizes e resinas, já o farelo é vendido para fábricas de rações animais. Há também o desenvolvimento de processos que incluem o óleo de linhaça em rações, de forma que os produtos para consumo humano como a carne, ovos, leite, possam estar enriquecidos com ácidos graxos ω 3 (TURATTI, 2002).

3.5. Óleo de peixe

Com relação ao óleo e a farinha de peixe, ambos são produtos obtidos simultaneamente em escala industrial a partir de diversas espécies e subprodutos da pesca marinha. Podem ser utilizados principalmente como ingredientes na formulação de dietas para alimentação animal e fonte de ω -3 para consumo humano (EFSA, 2010; TURCHINI et al., 2010).

Os óleos provenientes de peixes marinhos contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa ω -3, que são oriundos do ácido graxo linolênico advindo de fontes primárias na alimentação dos peixes. Sua composição específica em ácidos graxos ω -3 justifica a grande utilização em nutrição humana. Os principais ácidos graxos desta classe são o eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA), podendo representar cerca de 26% dos ácidos graxos presentes em óleos de peixe. A utilização de ácidos graxos da série ω -3 apresenta grande influência no metabolismo dos triacilgliceróis, nos níveis de colesterol LDL, além da interferência na agregação plaquetária, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares (STANSBY, 1990; GRUNDY, 1994).

Muitos estudos sobre a substituição de óleo de peixe na dieta foram realizados, e, em geral, esta substituição com fontes lipídicas convencionais parece ser possível quando o ácido graxo essencial atinge o mínimo adequado ao crescimento (SARGENT et al., 1999; MILLER et al., 2007; TURCHINI et al., 2010). O óleo de peixe pode ser substituído, parcial ou totalmente, por óleos vegetais, podendo causar alterações nos perfis de ácidos graxos, e está intimamente relacionado ao teor de lipídios das espécies de peixes (TURCHINI et al., 2010). Estudos com salmão do Atlântico não demonstram efeito no filé e no teor de lipídios quando o óleo de peixe foi substituído por óleos vegetais, entretanto o conteúdo de gordura abdominal foi alterado (TORSTENSEN et al., 2011).

3.6. Óleo de salmão

Este óleo é normalmente, obtido através de salmões (*Salmo salar* L.) provindos de cultivos, e tem se tornado disponível devido ao crescimento de sua produção. Atualmente, a Noruega lidera as pesquisas com esse óleo, que tem sido utilizado principalmente na indústria de alimentos pet (HAUMANN, 1998; HARALDSSON e HJALTASON, 2001).

A composição percentual de ácidos graxos nos lipídios totais dos filés de salmão *in natura*, apresentam um total de 17 ácidos graxos, sendo 30,55% de ácidos graxos saturados, onde o maior percentual (18,04%) foi encontrado para o ácido palmítico (16:0). Dentre os ácidos graxos monoinsaturados, o ácido predominante foi o oleico (18:1 n-9) apresentando percentual de 18,32%. Quanto à quantidade de ácido cervônico (DHA - 22:6n-3) foi de 17,50%, sendo que a quantia dos ácidos graxos poliinsaturado totais (AGPI) encontrados foi 37,90%. Além desses, foram encontrados no salmão outros ácidos graxos pertencentes às famílias n-6 e outros n-3 em quantidade apreciável e suficiente para uma boa fonte de ácidos graxos essenciais (TONIAL et al., 2010).

4. Deposição corporal

Os componentes básicos avaliados na composição corporal, tais como proteína, gordura, minerais e água, podem estar disponíveis temporariamente no sangue, acumulados pelo animal ou originados do catabolismo tecidual incorporados (ex.: músculos) (VARGAS et al., 2005). A determinação da composição corporal é importante em estudos que avaliam a regulação do crescimento (LANNA et al., 1995), para a compreensão da eficiência dos sistemas de produção (PAULINO, et al., 2009), avaliação dos alimentos e/ou crescimento corporal (BONILHA et al., 2007).

Diversos estudos demonstram que dietas ricas em lipídios levam ao aumento da deposição de gordura em peixes (STOWELL e GATLIN, 1992; ARZEL et al., 1994; LEE et al., 2002). Também foi observado que a composição de ácidos graxos dos lipídios dietéticos podem alterar a composição corporal ou ácidos graxos do músculo em muitas

espécies de peixes carnívoros ou herbívoros (GREENE e SELIVONCHICK, 1990; HUANG et al., 2001; HIGGS et al., 2006; DU et al., 2008; TURCHINI, et al., 2010).

Robalos (*Scophthalmus maximus* L.) alimentados com dietas ricas em proteínas, observou-se que a mesma foi depositada principalmente como fonte de energia; entretanto, quando alimentados com dietas ricas em lipídios menos energia foi depositada como forma de proteína e proporcionalmente maior quantidade como reservas lipídicas (BROMLEY, 1980). Em girinos de rã-touro alimentados com ração comercial contendo 55% de proteína bruta, observou-se que a deposição de proteína corporal foi maior comparada à deposição de gordura, o que pode ser atribuído ao requerimento maior deste nutriente pelos girinos (MANSANO et al., 2013). Os autores também verificaram que a taxa máxima de deposição de gordura corporal foi mais tardia (41,3 dias) do que as taxas máximas de proteína (36,2 dias), água (37,1 dias) e sais minerais (35,2 dias).

Para girinos, a deposição de nutrientes é importante, pois serão necessários durante o clímax da metamorfose, onde o indivíduo cessa sua alimentação, reabsorvendo parte dos nutrientes da cauda por apoptose (JUST et al., 1981; ISHIZUYA-OKA et al., 2010). Espera-se que a utilização de fontes de óleo na dieta de girinos de rã-touro, ocorra um maior depósito de proteína e energia corporal, nutrientes essenciais durante a metamorfose.

Como para girinos de rã-touro não há estudos sobre a utilização de diferentes fontes de óleo em sua dieta, o objetivo do presente estudo foi comparar duas metodologias na determinação da digestibilidade dos lipídios de diferentes fontes de óleo de origem vegetal e animal, bem como o desempenho e composição corporal de girinos de rã-touro.

5. Referências bibliográficas

- ACKMAN R.G. Canola Fatty Acids - An ideal mixture for health, nutrition, and food use. In: Shahidi F. (eds). **Canola and Rapeseed**. Springer, Boston, MA, 1990, p.81-98.
- ACKMAN, R.G. Fatty acids in fish and shellfish. In: CHOW, C.K., **Fatty acids in foods and their health implications**, 2008. 3ª edição, Boca Raton, FL (USA). CRC Press. 1296p.
- ALBINATI, R.C.B.; LIMA, S.L.; TAFURI, M.L.; DONZELE, J.L. Digestibilidade aparente de dois alimentos protéicos e três energéticos para girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.2151-2156, 2000.
- ALTIG, R.; KELLY, J.P.; WELLS, M.; PHILLIPS, J. Digestive enzymes of seven species of anuran tadpoles. **Herpetologica**, v.31, n.1, p.104-108, 1975.
- ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J.S.; SOUZA, G.A.B.F.A. **Nutrição animal: as bases e os fundamentos da nutrição animal os alimentos**. 4 ed. Editora: Nobel. São Paulo, SP. 2002. 395p.
- ARZEL, J.; LOPEZ, F.X. M.; MÉTAILLER, R.; STÉPHAN, G.; VIAU, M.; GANDEMER, G.; GUILLAUME, J. Effect of dietary lipid on growth performance and body composition of brown trout (*Salmo trutta*) reared in seawater. **Aquaculture**, v.123, n.3-4, p.361-375, 1994.
- BARBOSA, J.M.; SILVEIRA, A.M.; GOMIDE, C.A. Crescimento heterogêneo de girinos de rã-touro alimentados com diferentes rações. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.10, p.1015-1019, 2005.
- BELL, J.G.; MCEVOY, J.; TOCHER, D.R.; MCGHEE, F.; CAMPBELL, P.J.; SARGENT, J.R. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. **Journal of Nutrition**, v.31, n. 5, p.1535-1543, 2001.

- BÉRTIN, L. Appareil digestif. In: Grassé, P. P. (ed.). **Traité de zoologie, anatomie, systématique, biologie**, v.13, n.2, p.1249-1301, 1958.
- BONILHA, S.F.M.; PACKER, I.U.; FIGUEIREDO, L.A.D.; RESENDE, F.D.D.A.; ALLEONI, G.F.; RAZOOK, A.G. Efeito da seleção para peso pós-desmame sobre a composição corporal de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n.5, p.1282-1287, 2007.
- BNF – BRITISH NUTRITION FOUNDATION. **Unsaturated fatty acids: nutritional and physiological significance: the report of the British Nutrition Foundation's Task Force**. London: Chapman & Hall, 1994. 211p.
- BROMLEY, P.J. Effect of dietary protein, lipid and energy content on the growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture**, v.19, n.4, p.359-369, 1980.
- CGC – CANADIAN GRAIN COMMISSION, Official Grain Grading Guide. **Canadian Grain Commission** (ISSN 1704-5118). Winnipeg, 2017.
- CARDOZO JUNIOR, F. Principais cultivos: O pulo da rã. In: **1º Anuário estatístico brasileiro da pesca e aquicultura: 2014**. Ministério da Pesca e Aquicultura. Brasília, DF: ACEB/MPA, 2014, p.50-51.
- CHO, C.Y.; COWEY, C.B.; WATANABE, T. **Finfish nutrition in Asia: methodological approaches to research and development**. IDRC, Ottawa, ON, CA, 1985. 154p.
- COWEY, C.B.; ADRON, J.W.; OWEN, J.M.; ROBERTS, R.J. The effect of different dietary oils on tissue fatty acids and tissue pathology in turbot *Scophthalmus maximus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry**, v.53, n.3, p.399-403, 1976.
- CRIBB, A. Y. Avaliação e transferência de tecnologia: os contornos de um projeto de dinamização da inovação na cadeia da rã. In: **CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL**, 47f., 2009, Porto Alegre. Anais... Brasília, DF: SOBER, Ref. trabalho 221, 2009.

- CRIBB, A.Y.; AFONSO, A.M.; MOSTÉRIO, C.M.F. **Manual técnico de ranicultura**. Ed. Embrapa. Brasília, DF, 2013. 73p.
- DEGANI, G.; REVACH, A. Digestive capabilities of three commensal fish species: carp, *Cyprinus carpio* L., tilapia, *Oreochromis aureus* X *O. niloticus*, and African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchel 1822). **Aquaculture and Fisheries Management**, v.22, n.4, p.397-403, 1991.
- DU, Z.Y.; CLOUET, P.; HUANG, L.M.; DEGRACE, P.; ZHENG, W.H.; HE, J.G.; TIAN, L.X.; LIU, Y.J. Utilization of different dietary lipid sources at high level in herbivorous grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): mechanism related to hepatic fatty acid oxidation. **Aquaculture Nutrition**, v.14, n.1, p.77-92, 2008.
- EFSA (European Food Safety Authority). Scientific opinion on fish oil for human consumption. Food hygiene, including rancidity. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). **EFSA Journal**, v.8, n.10, p.1874-1922, 2010.
- FRACALOSSO, D.M.; RODRIGUES, A.P.O.; SILVA, T.S.C.; CYRINO, J.E.P. Técnicas experimentais em nutrição de peixes. In: **FRACALOSSO, D.M.; CYRINO, J.E.P. (Eds.). Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2013, p.37-63.
- GALVÃO, E.L.; SILVA, D.C.F. da; SILVA, J.O. da; MOREIRA, A.V.B.; SOUSA, E.M.B.D. de. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. **Food Science and Technology**, v.28, n.3, p.551-557, 2008.
- GLATZ, J.F.C.; LUIKEN, J.J.F.P.; VAN NIEUWENHOVEN, F.A.; VAN DER VUSSE, G.J. Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of fatty acids. In: BAZINET, R.C., **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.57, n.1, p.3-9, 1997.

- GÓMEZ, M.E.D.B. **Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta. I. Estabilidade oxidativa.** 2003. 149 f. Tese - (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, Universidade de São Paulo – USP, 2003.
- GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v.16, n.3, p.183-190, 1960.
- GREENE, D.H.; SELIVONCHICK, D.P. Effects of dietary vegetable, animal and marine lipids on muscle lipid and hematology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.89, n.2, p.165-182, 1990.
- GRUNDY, S. M. **Nutrition and Disease Update: Heart Disease**, Ed. KRITCHEVSKY, D. e CARROLL, K.K. The American Oil Chemists' Society (AOCS). Champaign, Illinois – USA, 1994, 279p.
- GRUNVALD, A. K.; CARVALHO, C. G. P. de; OLIVEIRA, A. C. B; PIRES, J. L. F.; CARVALHO, H. W. L.; OLIVEIRA, I. R. Adaptabilidade e estabilidade de híbridos de girassol convencional e alto oleico na Região Sul do Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 57, p.217-223, 2014.
- GURR, M.I. **Role of fats in food nutrition**. 2. Ed. London: Elsevier. 1995. 207p.
- HARALDSSON G.G.; HJALTASON, B. Fish oils as sources of polyunsaturated fatty acids. In: GUNSTONE, F.D. **Structured and modified lipids**, New York, Ed. Marcel Dekker, Inc., p.313-350, 2001.
- HAUMANN, B.F. Alternative sources for n-3 fatty acids. **Journal of Internal Medicine**, v.9, p.1108-1119, 1998.
- HENN, J.D.; RIBEIRO, A.M.L.; KESSLER, A.M. Comparação do valor nutritivo de farinhas de sangue e de farinhas de vísceras para suínos utilizando-se o método da proteína e

- gordura digestíveis e o método de substituição. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1366-1372, 2006.
- HIPOLITO, M.; RIBEIRO FILHO, O.P.; BACH, E.E. Aspecto bioquímico em fígados de *Rana catesbeiana* (SHAW, 1802) submetidas a diferentes dietas. **ConScientiae Saúde**, v.6, n.1, p.49 - 56, 2007.
- HIGGS, D.A.; BALFRY, S.K.; OAKES, J.D.; ROWSHANDELI, M.; SKURA, B.J.; DEACON, G. Efficacy of an equal blend of canola oil and poultry fat as an alternate dietary lipid source for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in sea water. I: effects on growth performance, and whole body and fillet proximate and lipid composition. **Aquaculture Research**, v.37, n.2, p.180-191, 2006.
- HUANG, C.H.; SHYONG, W.J.; LIN, W.Y. Dietary lipid supplementation affects the body fatty acid composition but not the growth of juvenile river chub, *Zacco barbata* (Regan). **Aquaculture Research**, v.32, n.12, p.1005-1010, 2001.
- IOCCA, A.F.S.; DALCHIAVON, F.C.; MALACARNE, B.J.; CARVALHO, C.G.P. Avaliação do teor e produtividade de óleo em genótipos de girassol. In: **REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE GIRASSOL, 21.; SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE A CULTURA DO GIRASSOL, 9., 2015**, Londrina. Anais... Londrina: Embrapa Soja, 2015.
- ISHIZUYA-OKA, A.; HASEBE, T.; SHI, Y.B. Apoptosis in amphibian organs during metamorphosis. **Apoptosis**, v.15, n.3, p.350-364, 2010.
- JUST, J.J.; KRAUS-JUST, J.; CHECK, D.A. Survey of chordate metamorphosis. In: Lawrence, G. **Metamorphosis: a problem in developmental biology**, 1981, p.265-326.
- KYARI M.Z. Extraction and characterization of seed oils. **International Agrophysics Journal**, n.22, p.139-142, 2008.

- LANNA, D.P.D.; BOIN, C.; ALLEONI, G.F.; LEME, P.R. Estimation of carcass and empty body composition of zebu bulls using the composition of rib cuts. **Scientia Agricola**, v.52, n.1, p.189-197, 1995.
- LEE, S.M.; JEON, I.G.; LEE, J.Y. Effects of digestible protein and lipid levels in practical diets on growth, protein utilization and body composition of juvenile rockfish (*Sebastes schlegelii*). **Aquaculture**, v.211, n.1, p.227-239, 2002.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Lipídios. **In: Princípios de bioquímica**. 2ª edição, São Paulo: Sarvier, 1995, p.280-300.
- LEITE, R.M.V.B.C.; BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C. DE. **Girassol no Brasil**. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2005. 641p.
- LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. **A tecnologia de criação de rãs**. Viçosa. MG, Ed: UFV, 1992. 168p.
- LIMA, S. L.; CRUZ, T. A. **Ranicultura: comercialização e condições de mercado**. Seção do site intitulado "Ranicultura". UFV – Universidade Federal de Viçosa, 2000. Disponível em: <http://arquivo.ufv.br/dta/ran/merc.htm>. Acesso em: 03/07/2017.
- MAG, T.K. Canola oil processing in canada. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.60, n.2, p.380-384, 1983.
- MANDARINO, J.M.G. **Características bioquímicas e nutricionais do óleo e do farelo de girassol**. Londrina: Embrapa-CNPSO (Documento, n.52), 1992. 25 p.
- MANSANO, C.F.M.; STÉFANI, M.V.; PEREIRA, M.M.; MACENTE, B.I. Deposição de nutrientes na carcaça de girinos de rã-touro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.8, p.885-891, 2013.
- MAYES, P. A. Lipídios de Importância Fisiológica. **In: Harper: Bioquímica**. 7 ed. São Paulo: Atheneu, 1994, p.142-154.

- MAZA, A., inventor; BESTFOODS, cessionário. **Process for recovery of corn oil from corn germ**. United States patent US6201142B1. 2001 Mar 13.
- MENEGALDO, J.G. A importância do milho na vida das pessoas. **Agrosoft Brasil**. Embrapa Meio-Norte. 2011. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/888767/1/Importanciamilho.pdf>>. Acesso em: 27 de Novembro 2017.
- MILLER, M.R., NICHOLS, P.D.; CATER, C.G. Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium sp. L* oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar L*) diets. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.148, p.382-392, 2007.
- NIEUWKOOP, P.D.; FABER, J. **Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin): a systematic and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis**. Amsterdam, Ed. Elsevier (North Holland Publishing), 1967. 252p.
- NORTHRUP, C. **A sabedoria da Menopausa: criando saúde física e emocional, curando-se durante a mudança**. São Paulo: Ed. Gaia, 2004. 528p.
- OLIVEIRA-BAHIA, V.R.L. **Morfologia e enzimologia do sistema digestório dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o desenvolvimento e metamorfose**. 2007. 148f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP, 2007.
- PAULINO, P.V.R.; VALADARES FILHO, S.D.C.; DETMANN, E.; VALADARES, R.F.D.; FONSECA, M.A.; MARCONDES, M.I. Deposição de tecidos e componentes químicos corporais em bovinos Nelore de diferentes classes sexuais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.12, p.2516-2524, 2009.
- PUPA, J.M.R. Óleos e gorduras na alimentação de aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.1, n.1, p.69-73, 2004.

- SALTHER, S.N.; MECHAM, J.S. Reproductive and courtship patterns. **Physiology of the Amphibia**, v.2, p.309-521, 1974.
- SARGENT, J.R.; BELL, J.G.; McEVOY, L.; TOCHER, D.R.; ESTEVEZ, A. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. **Aquaculture**, v.177, n.1-4, p.191-199, 1999.
- SEALE, D.B.; WASSERSUG, R.J. Suspension feeding dynamics of anuran larvae related to their functional morphology. **Oecologia**, v.39, n.3, p.259-272, 1979.
- SECCO, E.M.; STÉFANI, M.V.; VIDOTTI, R.M. Apparent digestibility of different ingredients in diets for bullfrog *Rana catesbeiana* tadpoles. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.36, n.1, p.135-140, 2005.
- SEIXAS FILHO, J. T.; PEREIRA MELLO, S.C.R.; SILVA, J.M.F.; THOMAS, J.E.; MELO, C.M.S. Efeito de níveis de energia e proteína bruta no desempenho de girinos (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.4, p.664-669, 1998.
- SEIXAS FILHO, J.T.; OLIVEIRA, M.G.A.; MOURA, G.S.; GARCIA, S.L.R.; LANNA, E.T.A.; SILVA, L.N. Desempenho e atividades enzimáticas em girinos de rã-touro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.11, p.1617-1624, 2008.
- SEIXAS FILHO, J.T.; NAVARRO, R.D.; SILVA, L.N.; SOUZA, L.N. Alimentação de girinos de rã-touro com diferentes níveis de proteína bruta, **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n.2, p.250-256, 2011.
- SHATTA, A.A.; RAYAN, A.M.; EL-SHAMEI Z.S.; GAB-ALLA, A.A.; MOUSSA, E.A. Comparative study of the physicochemical characteristics of oil from transgenic corn (Ajeeb YG) with its non-transgenic counterpart. **Austin Food Sciences**, v.1, n.5, p. 1-5, 2016.

- STEINWASCHER, K. The effect of coprophagy on the growth of *Rana catesbeiana* tadpoles. **Copeia**, n.1, p.130-134, 1978.
- STANSBY, M. E. **Fish oils in nutrition**. New York: Van Nostrand Reinhold (Ed.), 1990. 313p.
- STOWELL, S.L.; GATLIN, D.M. Effects of dietary pantothenic acid and lipid levels on growth and body composition of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v.108, n.1-2, p.177-188, 1992.
- TEIXEIRA, R. D.; MELLO, S.C.R.P.; SANTOS, C.A.M.L.D. **The world market for frog legs**. FAO/GLOBEFISH. Research Programme. Kuala Lumpur, Malaysia: INFOFISH (FAO), v.68, 2001, 44p.
- TONIAL, I.B.; OLIVEIRA, D.F.; BRAVO, C.E.C.; SOUZA, N.E. de; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J.V. Caracterização físico-química e perfil lipídico do salmão (*Salmo salar* L.). **Alimentos e Nutrição**, v.21, n.1, p.93-98, 2010.
- TORSTENSEN, B.E.; ESPE, M.; STUBHAUG, I.; LIE, Ø. Dietary plant proteins and vegetable oil blends increase adiposity and plasma lipids in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **British Journal of Nutrition**, v.106, n.5, p.633-647, 2011.
- TRUSHENSKI, J.T.; LOCHMANN, R.T. Potential, implications and solutions regarding the use of rendered animal fats in aquafeeds. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v.4, n.4, p.108-128, 2009.
- TURATTI, J. M. A importância dos ovos numa dieta saudável. **Óleos e Grãos**. São Caetano do Sul, v. 9, n. 59, p.22-24, 2001.
- TURATTI, J.M.; GOMES, R.A.R.; ATHIÉ, I. **Lipídeos: aspectos funcionais e novas tendências**. Campinas: ITAL, 2002. 78p.

TURCHINI, G.M.; NG, W.K.; TOCHER, D.R. (Eds.) **Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds**. CRC Press, 2010. 551p.

VARGAS, G.D.; DIONELLO, N.L.; BRUM, P.A.R.; RUTZ, F.; FIALHO, F.B. Modelo de simulação do crescimento e desenvolvimento de frangos de corte: descrição e implementação. **Ciência Rural**, v.35, n.2, p.440-445, 2005.

WAITZBERG, D.L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2006. 1860p.

WASSERSUG, R.J. The adaptive significance of the tadpole stage with comments on the maintenance of complex life cycles in anurans. **American Zoologist**, v.15, n.2, p.405-417, 1975.

WEBER E.J.; WATSON, S.A.; RAMSTAD, P.E. **Corn: Chemistry and Technology**. St. Paul-MN: Ed. American Association of Cereal Chemists, 1987. 605p.

ZHANG, C.X.; HUANG, K.K.; LE LU, K.; WANG, L.; SONG, K.; ZHANG, L.; E LI, P. Effects of different lipid sources on growth performance, body composition and lipid metabolism of bullfrog *Lithobates catesbeiana*. **Aquaculture**, v.457, p.104-108, 2016.

**Manuscrito 1 – Fontes e métodos de determinação da digestibilidade de lipídios
em girinos de rã-touro**

Donovan Filipe Henrique Pinto; Cleber Fernando Menegasso Mansano; Thiago Matias
Torres do Nascimento; Marta Verardino De Stéfani

Centro de Aquicultura; Universidade Estadual Paulista; Via de Acesso Prof. Paulo Donato
Castellane s/n, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.
E-mail: donovan_fhpinto@hotmail.com

Normas de referências, de acordo ao periódico “Aquaculture”

Resumo

A adequação e a identificação da biodisponibilidade dos nutrientes da dieta a uma determinada espécie é realizada através de ensaios de digestibilidade. Porém, o método utilizado pode superestimar ou subestimar seus resultados. Neste sentido, objetivou-se avaliar o coeficiente de digestibilidade aparente do lipídio (CD_{LIP}) de quatro óleos de origem vegetal (milho, linhaça, canola e girassol) e dois de origem animal (resíduos de peixe e salmão) para girinos de rã-touro, comparando-se o método do lipídio digestível com o método clássico de substituição. Foram utilizados 5.400 girinos de rã-touro ($3,5g \pm 1,6$) alimentados com as diferentes dietas contendo óxido de cromo III como marcador inerte. O método de coleta de fezes utilizado foi o da decantação. Para o método do lipídio digestível foram formuladas três dietas-testes com diferentes porcentagens de inclusão de óleo (3, 6 e 9%) onde o CD_{LIP} foi calculado através de análise de regressão, sendo seu valor correspondente à inclinação da reta (valor de b), observando-se os seguintes valores: óleos de canola – 59,7%; milho – 62,5%; girassol – 76,4%; linhaça – 76,0%; salmão – 57,6% e resíduos de peixe – 64,0%. Com o método geralmente utilizado, o da substituição de 9% do ingrediente teste, os valores dos CD_{LIP} dos diferentes óleos foram: canola – 59,0%; milho – 60,6%; girassol – 75,1%; linhaça – 74,5%; salmão – 55,1% e resíduos de peixe – 66,5%. Não houve diferença significativa entre os CD_{LIP} de ambas metodologias, concluindo-se que ambas metodologias podem ser utilizadas para a determinação do CD_{LIP} dos diferentes óleos. Entre os óleos avaliados o de girassol e linhaça tiveram melhor aproveitamento da gordura pelos girinos.

Palavras-chave: *Lithobates catesbeianus*, lipídio digestível, nutrição, óleo

Manuscript 1 – Fat digestibility of different sources of oils for bullfrog tadpoles: comparison of methodologies

Abstract

The adequacy and identification of the bioavailability of the nutrients of the diet to a given species is carried out through digestibility assays. However, the method used may overestimate or underestimate its results. The objective of this study was to evaluate the lipid apparent digestibility coefficient (CD_{LIP}) of four vegetable oils (corn, linseed, canola and sunflower) and two animal sources (fish and salmon residues) for bullfrog tadpoles, comparing the method of digestible lipid with the classic method of substitution. A total of 5,400 bullfrog tadpoles ($3.5g \pm 1.6$) were fed with different diets containing chromium oxide III as an inert marker. The stool collection method used was the decantation method. For the digestible lipid method, three diets-tests were formulated with different percentages of oil inclusion (3, 6 and 9%), where the CD_{LIP} was calculated by regression analysis, and its value corresponding to the slope of the line (value of b), with the following values being observed: canola oils - 59.7%; corn - 62.5%; sunflower - 76.4%; linseed - 76.0%; salmon - 57.6% and fish waste - 64.0%. With the method generally used, the substitution of 9% of the test ingredient, the CD_{LIP} values of the different oils were: canola - 59.0%; corn - 60.6%; sunflower - 75.1%; linseed - 74.5%; salmon - 55.1% and fish waste - 66.5%. There was no significant difference between the CD_{LIP} of both methodologies, concluding that both methodologies can be used for the determination of the CD_{LIP} of the different oils. Among the available oils, sunflower and linseed oil had better use of fat by tadpoles.

Key-words: *Lithobates catesbeianus*, digestible lipid, nutrition, oil

1. Introdução

A digestibilidade é um dos aspectos de maior relevância para avaliar os ingredientes adequados para a formulação de dietas para uma espécie animal (Luo et al., 2008). A biodisponibilidade de nutrientes em dietas para peixes é definida principalmente como digestibilidade, descrevendo assim, a fração do nutriente ou da ração ingerida que não é excretada nas fezes (NRC, 2011). Sem os dados de digestibilidade dos nutrientes os nutricionistas arriscam-se em superdosagens ou subdosagens, o que pode influenciar negativamente o desempenho dos animais (Gonçalves e Carneiro, 2003).

Para a determinação da digestibilidade de nutrientes de diferentes ingredientes, normalmente utiliza-se o método de substituição de 30% da dieta basal pelo ingrediente teste, tanto em trabalhos com girinos de rã-touro (Albinati et al., 2000; Secco et al., 2005) como na fase pós-metamórfica (Zhang et al., 2015; Mansano et al., 2017ab). Entretanto, para o óleo de soja foi utilizado 10% de substituição (Albinati et al., 2000; Secco et al., 2005).

No caso de ingredientes como o óleo, que não pode ser incluído em altos níveis em dietas, por interferir na eficiência digestiva dos animais, pode-se utilizar um método alternativo, o método do lipídio digestível, onde o coeficiente de digestibilidade aparente do lipídio (CD_{LIP}) é calculado por meio de análise de regressão (Henn et al., 2006). Para suínos, observou-se que o método de substituição subestimou os valores de energia digestível da farinha de sangue (Henn et al., 2006).

Como os óleos são importantes fontes de energia para girinos de rã-touro, o objetivo do presente estudo foi comparar o método do lipídio digestível com o método clássico de substituição na determinação do coeficiente de digestibilidade do lipídio de quatro óleos de origem vegetal (milho, linhaça, canola e girassol) e dois de origem animal (resíduos de peixe e salmão).

2. Materiais e Métodos

O experimento foi realizado no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, com duração de 58 dias.

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, (Protocolo nº 013336/14), e foram conduzidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.1. Material biológico e condições experimentais

Foram utilizados 5400 girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) oriundos do Setor de Ranicultura do Caunesp, no estágio 26 da tabela de Gosner (1960) e com peso médio inicial de $3,5 \pm 1,6$ g.

Os girinos foram mantidos em aquários experimentais para alimentação, constituídos de caixas de PVC com 90 litros de água, na densidade de 1,5 girinos / litro. Para facilitar a transferência dos animais para os coletores de fezes, foram confeccionados cestos com armação de aço e tela de PVC (malha 10 mm) colocados no interior dos aquários (Figura 1).

Para as coletas de fezes foram utilizados aquários coletores, cilíndricos com fundo cônico e com capacidade de 120 litros (110 L útil). Na parte inferior de cada aquário, utilizou-se registro de esfera acoplado a tubo de Falcon (50 ml), mantido em caixa de isopor com gelo durante as coletas (Figura 2).

A água utilizada nos aquários era proveniente de poço artesiano localizado no Câmpus, com renovação diária de 200%. Para a manutenção da qualidade da água, os aquários de alimentação foram sifonados diariamente para a retirada de fezes e ração não consumida do fundo. Os aquários de coleta de fezes eram esvaziados e limpos diariamente para evitar a fixação de resíduos nas paredes e sobras de fezes em decomposição.



Figura 1. Aquário de alimentação com os cestos.



Figura 2. Aquário coletor acoplado com tubo de Falcon, mantido em caixa de isopor com gelo.

A temperatura da água foi aferida diariamente utilizando termômetro analógico com enchimento em mercúrio (Hg) do tipo capela, de máxima e mínima. Os parâmetros de qualidade da água foram aferidos semanalmente utilizando sonda multiparâmetro HORIBA (Série U-50), tais como: pH, sólidos totais dissolvidos (TDS g/L), oxigênio dissolvido (OD mg/L), porcentagem de oxigênio dissolvido (%) e condutividade elétrica ($\mu\text{S/cm}$).

Os parâmetros de qualidade da água observados durante o período experimental (Tabela 1) foram adequados para o desenvolvimento dos girinos, de acordo com, Sipaúba-Tavares et al. (2008), Cribb et al. (2013) e Seixas Filho et al. (2017).

Tabela 1. Média dos parâmetros da qualidade de água no período experimental.

Parâmetros		
Temperatura (°C) mínima e máxima	21,5 ± 3	26,5 ± 3
pH		7,4
Sólidos totais dissolvidos (mg L ⁻¹)		0,1
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)		5,4
Porcentagem de oxigênio dissolvido (%)		69,0
Condutividade elétrica (µS cm ⁻¹)		21,5

2.2. Dietas experimentais

Para a determinação da digestibilidade aparente dos lipídios dos diferentes tipos de óleos de origem vegetal (milho, linhaça, canola e girassol) e animal (resíduos de peixe e salmão) foi formulada uma dieta referência farelada com 32% de proteína bruta (Tabela 2).

Para o preparo da dieta referência (DR), os ingredientes foram moídos e peneirados em malha de 0,35mm, misturados em misturador automático em “Y”. Posteriormente, a DR foi separada em porções iguais para ser incorporado o óleo e o marcador inerte (0,5% de óxido de cromo III). As dietas foram armazenadas em freezer (-20°C) durante todo período experimental.

Tabela 2. Fórmula e composição centesimal da dieta referência (DR).

Ingredientes (%)	Número internacional (NRC 2011)	(%) Inclusão
Farinha de Peixe (63,87% PB) ¹	5 – 02 – 012	15,00
Farinha de Visceras (63,65% PB) ²	5 – 03 – 798	8,60
Farelo de Soja (49,42% PB) ³	5 – 04 – 604	14,00
Milho (7,14% PB) ³	4 – 02 – 935	34,00
Farelo de Trigo (16,11% PB) ⁴	4 – 05 – 190	27,88
Antioxidante (Bht) ⁵		0,02
Suplemento mineral e vitamínico ⁶		0,50
Composição Analisada (% na MS)		
Matéria seca (%) ^a		91,18
Proteína Bruta (%) ^b		32,31
Energia Bruta (kcal kg ⁻¹) ^c		4629
Matéria Mineral (%) ^d		6,42
Extrato Etéreo (%) ^e		4,86

¹ Salmon fishmeal - Pesquera Pacific Star S.A; ² Frangos Canção – Gonçalves e Tortola S/A; ³ Bunge Brasil belonging to Bunge Limited; ⁴ Moinho Pacífico Indústria e Comércio Ltda; ⁵ Hidroxitolueno butilado;

⁶ Umidade (%) 2,0, Cinzas (%) 71,6442, Vitamina A (min) 35.000 U.I., Vitamina D3 (min) 2.000 U.I., Vitamina E (min) 120 U.I., Vitamina K3 (min) 800 mg, Ácido fólico (min) 10 mg, Biotina (min) 10 mg, Tiamina (B1) (min) 25 mg, Riboflavina (B2) (min) 35 mg, Piridoxina (B6) (min) 40 mg, Vitamina B 12 (min) 100 mcg, Niacina (min) 350 mg, Acido Pantotênico (min) 150 mg, Colina (min) 2.500 mg, Cobre (min) 25 mg, Ferro (min) 150 mg, Manganês (min) 75 mg, Selênio (min) 1 mg, Zinco (min) 140 mg, Mananoligossacarídeo (min) 60 mg.

^a Determinada em estufa a 105°C por 12 horas; ^b Determinada pelo método de Dumas em aparelho Leco 528 LC (Etheridge et al., 1998); ^c Determinada em bomba calorimétrica; ^d Determinada em mufla (600°C) por 4 horas; ^e Determinada pelo aparelho ANKOM XT15 (AOCS, 2005)

No método de determinação do lipídio digestível (Henn et al., 2006), para cada fonte de óleo foram formuladas três dietas testes (DT) com diferentes porcentagens de inclusão de óleo (3, 6 e 9%) mais uma dieta com 0% de inclusão (DR) (Tabela 3).

No método de substituição foi utilizado a DT com 9% de cada fonte de óleo e 0,5% de óxido de cromo III (Tabela 3).

Tabela 3. Fórmula e composição das dietas teste.

Fontes	Número internacional (NRC 2011)	Fórmulas (%)			Composição Analisada (% na MS)			
		NI	DR	Cr ₂ O ₃	MS	MM	EE	EB
			(%)		(%)	(%)	(%)	(kcal kg ⁻¹)
DR		-	99,5	0,5	91,1	6,4	4,9	4629
Óleo de milho ¹ (8355 kcal kg ⁻¹)	4 – 07 – 882	3	96,5	0,5	92,0	6,1	8,6	4817
		6	93,5	0,5	92,2	5,8	11,2	4924
		9	90,5	0,5	92,8	5,9	14,7	5072
Óleo de linhaça ² (7305 kcal kg ⁻¹)	4 – 14 – 502	3	96,5	0,5	92,0	6,4	8,5	4814
		6	93,5	0,5	92,4	6,1	11,7	4938
		9	90,5	0,5	92,6	6,0	14,6	5110
Óleo de canola ¹ (7868 kcal kg ⁻¹)	4 – 06 – 144	3	96,5	0,5	92,2	6,2	8,2	4783
		6	93,5	0,5	92,0	6,0	12,1	4938
		9	90,5	0,5	92,2	5,8	15,0	5125
Óleo de girassol ¹ (7244 kcal kg ⁻¹)	4 – 20 – 833	3	96,5	0,5	92,2	6,1	8,3	4802
		6	93,5	0,5	92,2	6,1	11,7	4963
		9	90,5	0,5	92,5	5,9	14,8	5106
Óleo de peixe ² (9320 kcal kg ⁻¹)	7 – 08 – 048	3	96,5	0,5	92,1	6,5	8,8	4799
		6	93,5	0,5	92,3	6,0	11,4	4933
		9	90,5	0,5	92,9	5,9	14,8	5066
Óleo de salmão ² (9323 kcal kg ⁻¹)	*	3	96,5	0,5	92,3	6,3	9,1	4783
		6	93,5	0,5	92,2	5,8	11,4	4944
		9	90,5	0,5	92,2	5,7	14,8	5110

Onde: NI= níveis de inclusão, DR= dieta referência, MS= matéria seca, EB= energia bruta, MM= matéria mineral, EE= extrato etéreo.

¹ Cargill do Brasil; ² Campestre Ind. e Com. De Óleos Vegetais LTDA; * Salmão de produção.

Foi estabelecido um período de quatro dias para adaptação à dieta referência e às condições do sistema, sendo administrada a alimentação à vontade, cinco vezes ao dia.

2.3. Manejo alimentar e coleta de fezes

Para cada dieta teste e DR, os girinos foram alimentados à vontade em aquários de alimentação por um período de três horas. Após, foram transferidos para os aquários coletores de fezes (sistema Guelph) por três horas.

Assim que as fezes começaram a aparecer no tubo de Falcon, foram coletadas a cada 30 minutos até o fim do período e mantidas em gelo até o final do dia. Após a coleta das fezes, os girinos retornavam para os aquários de alimentação.

Para a dieta referência e dietas teste com diferentes fontes e níveis de óleo (milho, linhaça e canola) foram necessários 25 dias de coleta para obter a quantidade necessária de fezes para a realização das análises das amostras em triplicatas. Após esse período, outros girinos foram utilizados, as dietas restantes (DR, dietas teste com óleo de girassol, peixe e salmão) redistribuídas, iniciando-se novo período de coleta de fezes.

2.4. Processamento das amostras e análises laboratoriais

Após a coleta das fezes, o material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos para retirada do excesso de água. Após, foi acondicionado em pote plástico identificado e armazenado em freezer (-20°C).

As amostras de fezes congeladas foram liofilizadas a -50°C (modelo: Super Modulyo Freeze Dryer) para obtenção da matéria pré-seca. Após, foram moídas em moinho de bola e encaminhadas ao laboratório de Ciências Avícolas da FCAV – UNESP para análise de extrato etéreo, utilizando o aparelho ANKOM XT15 (AOCS, 2005).

As análises de óxido de crômio III das fezes e das dietas foram determinadas através do método da digestão com ácido nítrico e perclórico, de acordo com a metodologia descrita por Furukawa e Tsukahara (1966).

2.5. Delineamento experimental

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 12 tratamentos e três repetições comparando-se o CD_{LIP} de quatro fontes de óleo de origem vegetal (milho, linhaça, canola e girassol) e duas de origem animal (resíduos de peixe e salmão) determinados através das metodologias do lipídio digestível (Henn et al., 2006) e o método clássico de substituição (9%).

2.6. Método de análise

Em ambas metodologias, o coeficiente de digestibilidade aparente do lipídio (CD_{LIP}) das diferentes dietas experimentais foi estimado através da equação de Nose (1966):

$$CD_{LIP}(\%) = 100 - \left[100 \frac{(\% \text{ indicador na dieta})}{(\% \text{ indicador nas fezes})} \times \frac{(\% \text{ nutriente nas fezes})}{(\% \text{ nutriente na dieta})} \right]$$

No método do lipídio digestível (Henn et al., 2006) o CD_{LIP} dos diferentes óleos foi calculado por meio de análise de regressão, tendo como variável independente (X) o percentual de gordura bruta adicionado à dieta teste e, como variável dependente (Y) o percentual de gordura digestível da dieta teste. A inclinação da reta (valor de b) corresponde ao CD_{LIP} do ingrediente teste e o valor do intercepto representa o valor de lipídio digestível da dieta teste.

No método da substituição, os valores dos CD_{LIP} dos diferentes óleos foram calculados com base na digestibilidade da dieta referência e das dietas testes de acordo com Bureau e Hua (2006):

$$CD_{LIP}(\%) = CDA_{teste} + [(CDA_{teste} - CDA_{ref.}) \times ((DR_{inclusão}/100) \times N_{ref.}) / ((ING_{inclusão}/100) \times N_{ing})]$$

Onde: CDA_{teste} = coeficiente da digestibilidade aparente da dieta teste; $CDA_{ref.}$ = coeficiente da digestibilidade aparente da dieta referência; $DR_{inclusão}$ = % inclusão da dieta referência; $N_{ref.}$ = % do nutriente na dieta referência; $ING_{inclusão}$ = % de inclusão do ingrediente teste; N_{ing} = % do nutriente do ingrediente teste.

2.7. Análise estatística

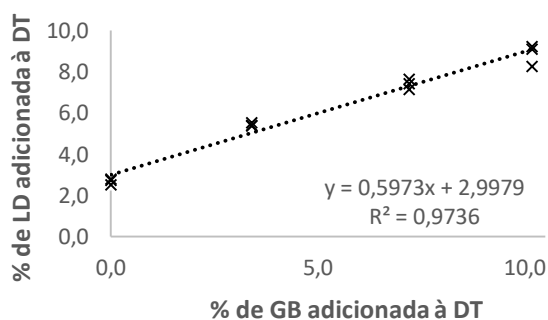
A normalidade dos dados e a homogeneidade da variância foram testados antes da aplicação da análise variância (ANOVA). As médias dos CD_{LIP} foram comparadas pelo teste de “Duncan”, utilizando o software SAS (SAS instituto, 2014).

3. Resultados

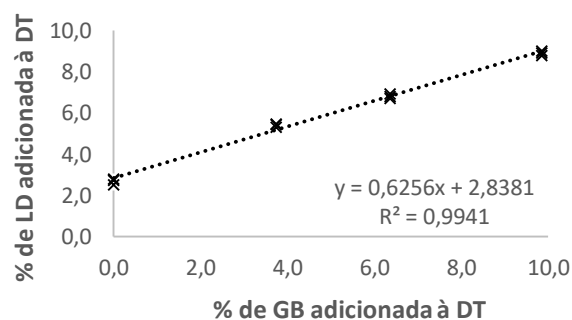
3.1. Coeficiente de digestibilidade aparente do lipídio (CD_{LIP}) dos diferentes óleos

No método do lipídio digestível (Henn et al., 2006), os coeficientes de digestibilidade aparente do lipídio (CD_{LIP}) dos óleos de origem vegetal foram: canola – 59,7%; milho – 62,5%; girassol – 76,4% e linhaça – 76,0% (Figura 3). Os óleos de girassol e de linhaça apresentaram maior aproveitamento do lipídio pelos girinos.

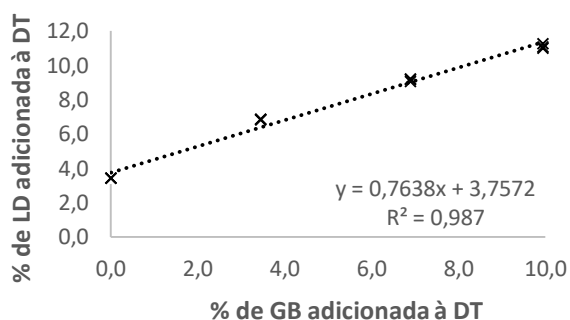
a) Óleo de Canola



b) Óleo de Milho



c) Óleo de girassol



d) Óleo de Linhaça

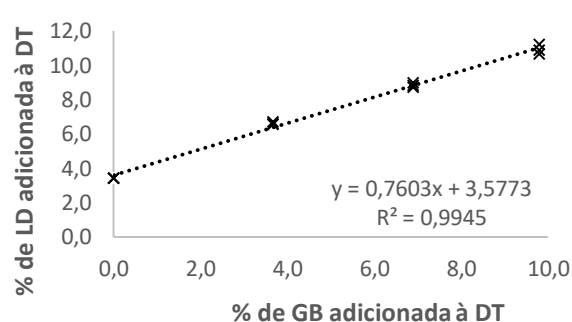
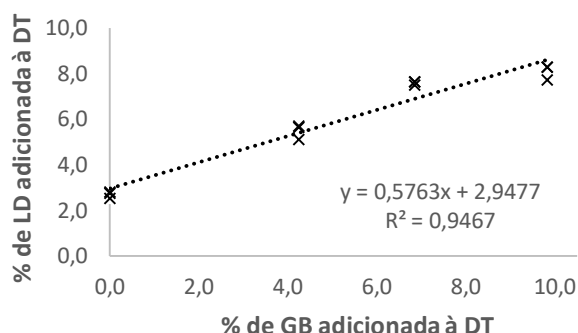


Figura 3. Linha de regressão do lipídio digestível (LD) do óleo de canola (a), óleo de milho (b), óleo de girassol (c) e óleo de linhaça (d).

Para os óleos de origem animal, utilizando a mesma metodologia, os CD_{LIP} foram 57,6% para o óleo de salmão e 64,0% para o óleo de resíduos de peixe (Figura 4). Os girinos apresentaram um melhor aproveitamento do lipídio do óleo de resíduos de peixes.

a) Óleo de Salmão



b) Óleo de peixe

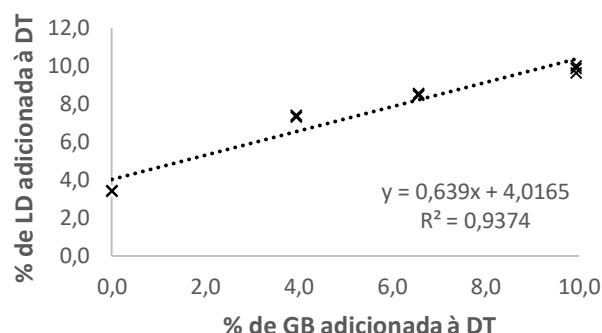


Figura 4. Linha de regressão do lipídio digestível (LD) do óleo de salmão (a) e óleo de resíduos de peixe (b).

No método geralmente utilizado, com 9% de substituição, os valores dos CD_{LIP} dos diferentes óleos não tiveram diferença significativa dos valores obtidos pelo método do lipídio digestível (Tabela 4).

Tabela 4. Coeficiente de digestibilidade do lipídio (CD_{LIP}) de diferentes óleos no método do lipídio digestível e da substituição (9%).

CD_{LIP} (%)	Método do lipídio digestível	Método de substituição (9%)	CV(%)	Valor de p
Óleo de canola	59,7	59,0±3,5	5,98	0,8765
Óleo de milho	62,5	60,6±0,7	1,16	0,1471
Óleo de girassol	76,4	75,1±1,0	1,37	0,3868
Óleo de linhaça	76,0	74,5±1,9	2,57	0,5786
Óleo de salmão	57,6	55,1±2,1	3,93	0,4298
Óleo de resíduos de peixe	64,0	66,5±1,2	1,95	0,2328

4. Discussão

Os lipídios dietéticos são importantes fontes de energia possuindo um papel proeminente na nutrição de organismos aquáticos, incluindo papéis estruturais e endócrinos como o fornecimento de energia, ácidos graxos essenciais e fosfolipídios (Sargent et al., 2002; Turchini et al., 2010). Porém, para

cumprir suas funções dependem de sua digestibilidade, ou seja, a proporção de nutrientes ingeridos que passa do lado luminal do intestino para o lado seroso, sendo influenciada por perdas endógenas e modificações pela microbiota intestinal (Turchini et al., 2010); e também da temperatura por serem animais ectotérmicos, e das condições disponíveis para os processos digestivos (Cho et al., 1895; Sargent et al., 2002; Turchini et al., 2010). De acordo com Seixas Filho et al. (2017) a temperatura ideal da água para o bom desenvolvimento dos girinos deve estar entre 22 e 28°C, o que ocorreu no presente estudo, não afetando o consumo da dieta e os processos digestivos.

Os valores dos CD_{LIP} dos diferentes óleos, em ambas metodologias testadas, não apresentaram diferenças significativas, indicando que para ingredientes que não podem ser adicionados em altos níveis na dieta teste, como o caso dos óleos, o método do lipídio digestível é uma alternativa para o cálculo da digestibilidade em girinos. Henn et al. (2006) observaram resultados semelhantes para a farinha de sangue em dietas para suínos.

Para rãs-touro pós-metamorfoseadas foram determinados os CD_{LIP} de diferentes fontes de óleo, onde os óleos de peixe e de soja apresentaram valores de 97% e 95,8%, respectivamente (Zhang et al., 2016), bem superiores aos obtidos no presente estudo que variaram de 55 a 76% para os diferentes óleos. Essa diferença nos valores dos CD_{LIP} pode ser devido a diversos fatores: hábito alimentar onívoro dos girinos que após a metamorfose muda para carnívoro (Oliveira-Bahia, 2007), metodologia utilizada e atividade enzimática dos animais. O regime de alimentação e o tipo da dieta também afetam a digestibilidade do lipídio (Hamre et al., 2011).

Outros fatores influenciam na digestibilidade das fontes lipídicas dietéticas, podendo elevar ou diminuir os resultados, tais como presença de triacilgliceróis, dietas com elevada energia, características químicas como ponto de fusão, comprimento da cadeia e do grau de insaturação do óleo (Turchini et al., 2010), concentrações de ácidos graxos (Ng et al., 2004; Hansen et al., 2008) e o aumento da complexidade lipídica (Mollan et al., 2008).

A comparação dos CD_{LIP} dos diferentes óleos é dificultada devido a vários fatores que podem influenciar as características químicas e físicas dos óleos de origem vegetal tais como: local, clima e época do ano em que foi cultivado, bem

como a qualidade genética (Leite et al., 2005). Para os óleos de origem animal, como o de resíduos de peixes e de salmão, o local onde foi pescado, clima, alimentação natural, espécies utilizadas e época do ano também influenciam suas características químicas e físicas (Sargent et al., 2002, Turchini et al., 2010).

No presente estudo os girinos se encontravam inicialmente no estágio 26 (Gosner, 1960) e ao final do experimento no estágio 41 (Gosner, 1960). De acordo com Santos et al. (2016) a atividade enzimática dos girinos de rã-touro aumenta desde o início da alimentação exógena até a fase pré-metamórfica (estágios 26 a 30 de Gosner, 1960), estando relacionada com a maturação do sistema digestivo. A produção máxima de enzimas ocorre na pró-metamorfose (estágios 31 a 41 de Gosner, 1960), coincidindo com o acúmulo de energia necessária para a metamorfose e aumento do crescimento animal. No caso da amilase, lipase e tripsina suas atividades foram detectadas no quimo de girinos de rã-touro desde os 15 dias de idade, sugerindo o uso de carboidratos, gorduras e proteínas em dietas artificiais (Seixas Filho et al., 2008, 2010).

5. Conclusão

Ambas metodologias, do lipídio digestível e da substituição com 9% do ingrediente teste, podem ser utilizadas para a determinação de CD_{LIP} dos diferentes óleos testados. Entre os óleos avaliados, o de girassol e linhaça tiveram melhor aproveitamento da gordura pelos girinos.

6. Referências bibliográficas

- AOCS (American Oil Chemists Society), 2005. Official Procedure, Approved Procedure Am 5-04, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. Urbana, IL.
- Albinati, R.C.B., Lima, S.L., Tafuri, M.L., Donzele, J.L., 2000. Digestibilidade aparente de dois alimentos protéicos e três energéticos para girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802). Rev. Bras. Zootec. 29, 2151-2156.
- Bureau, D.P., Hua, K., 2006. Letter to the editor of Aquaculture. Aquaculture. 252, 103-105.
- Cho, C.Y., Cowey, C.B.; Watanabe, T., 1985. (Eds.), Finfish Nutrition in Asia - Methodological Approaches to Research and Development. 154p.
- Cribb, A.Y., Afonso, A.M., Mostério, C.M.F., 2013. Manual técnico de ranicultura. Ed. Embrapa. Brasília, DF. 73p.
- Etheridge, R.D., Pesti, G.M., Foster, E.H., 1998. A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. Anim. Feed Sci. Technol. 73, 21-28.
- Furukawa, A.A., Tsukahara, H., 1966. On the acid digestion for the determination of chromic oxide as index substance in the study of digestibility of fish feed. B. Jpn. Soc. Sci. Fish. 32, 502-506.
- Goncalves, E.G., Carneiro, D.J., 2003. Coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia de alguns ingredientes utilizados em dietas para o pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). Rev. Bras. Zootec. 32, 779-786.
- Gosner, K.L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica 16, 183-190.
- Hamre K., Lukram I.M., Rønnestad I., Nordgreen A., Sæle O., 2011. Pre-digestion of dietary lipids has only minor effects on absorption, retention and metabolism in larval stages of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Br. J. Nutr., 105, 846–856.
- Hansen, J.Ø., Berge, G.M., Hillestad, M., Kroghdahl, Å., Galloway, T., Holm, H., Holm, J., Ruyter, B., 2008. Apparent digestion and apparent retention of

- lipid and fatty acids in Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed increasing dietary lipid levels. *Aquaculture*, 284, 159–166.
- Henn, J.D, Ribeiro, A.M.L., Kessler, A.M., 2006. Comparação do valor nutritivo de farinhas de sangue e de farinhas de vísceras para suínos utilizando-se o método da proteína e gordura digestíveis e o método de substituição. *Rev. Bras. Zootec.* 35, 1366-1372.
- Leite, R.M.V.B.C., Brighenti, A.M., Castro, C., 2005. (Eds) *Girassol no Brasil*. Londrina, PR: Embrapa Soja, 641p.
- Luo, Z., Tan, X.Y., Chen, Y.D., Wang, W.M., Zhou, G., 2008. Apparent digestibility coefficients of selected feed ingredients for Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture* 285, 141–145.
- Mansano, C.F.M., Macente, B.I., Nascimento, T.M.T., Pinto, D.F.H, Pereira, M.M., De Stéfani, M.V., 2017a. Digestibility of nutrients and energy in ingredients for bullfrogs during different phases of development. *Aquac. Nutr.*, 23, 1368-1378.
- Mansano, C.F.M., Macente, B.I., Nascimento, T.M.T., Pereira, M.M., Takahashi, L.S., De Stéfani, M.V., 2017b. Amino acid digestibility of animal protein ingredients for bullfrogs in different phases of post-metamorphic development. *Aquac. Res.*, 48, 4822-4835.
- Mollan T.A., Tonheim S.K., Hamre K., 2008. Pre-hydrolysis improves absorption of neutral lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Aquaculture*. 275: 217–224.
- Ng, W.K., Sigholt, T., Bell, J.G., 2004. The influence of environmental temperature on the apparent nutrient and fatty acid digestibility in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed finishing diets containing different blends of fish oil, rapeseed oil and palm oil. *Aquac. Res.*, 35, 1228–1237.
- Nose, T., 1966. Recent advances in the study of fish digestion in Japan. In: *Symposium on Finfish Nutrition and Fish Feed Technology*, 1966, Belgrade. *Proceedings Belgrade: EIFAC / FAO*, 15-17.
- NRC (National Research Council), 2011. *Nutrient requirements of fishes*. Washington: National Academy Press, 242p.
- Oliveira-Bahia, V.R.L., 2007. Morfologia e enzimologia do sistema digestório dos girinos da rã-touro (*Rana catesbeiana*) durante o desenvolvimento e

- metamorfose. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal – SP. 148p.
- Santos, L.F.J., Oliveira-Bahia, V.R.L., Nakaghi, L.S.O., De Stéfani, M.V., Gonçalves, A.M., Junior, J.M.P., 2016. Ontogeny of the digestive enzymes of tadpoles of *Lithobates catesbeianus*. Copeia, 104(4), 838-842.
- Sargent, J. G., Tocher, D. R., Bell, J. G., 2002. The lipids, In: Halver, J. E.; Hardy, R. W. (Eds.), Fish Nut., 3rd edition. Academic Press, SD – EUA, p. 181-257.
- Secco, E.M., Stéfani, M.V., Vidotti, R.M., 2005. Apparent digestibility of different ingredients in diets for bullfrog *Rana catesbiana* tadpoles. J. World Aquacult. Soc., 36, 135-140.
- Seixas Filho, J.T., Oliveira, M.G.A., Moura, G.S., Garcia, S.L.R., Lanna, E.T.A., Silva, L.N., 2008. Desempenho e atividades enzimáticas em girinos de rã-touro. Pesq. Agropec. Bras., 43(11), 1617-1624.
- Seixas Filho, J.T., Oliveira, M.G.A., Moura, G.S., Garcia, S.L.R., Lanna, E.T.A., Teixeira, E.T., Garcia, S.L.R., Lima, J.L.P., 2010. Influence of supplying bullfrog tadpoles with feed containing 28% crude protein on performance and enzymatic activities. Rev. Bras. Zootec., 39(1), 9-17.
- Seixas Filho, J.T., Pereira, M.M., Mello, S.C.R.P., 2017. Manual de Ranicultura para o Produtor. Rio de Janeiro, Ed. H.P. Comunicação, 155 p.
- Sipaúba-Tavares, L.H., Morais, J.C.L., Stéfani, M.V., 2008. Comportamento alimentar e qualidade da água em tanques de criação de girinos de rã-touro *Lithobates catesbeianus*. Acta Sci. Anim. Sci., 30, 95-101.
- Turchini, G.M., Ng, W.K., Tocher, D.R., 2010. (Eds.) Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. CRC Press. 551p.
- Zhang, C.X., Huang, K.K., Lu, K.L., Wang, L., Song, K., Zhang, L., Li, P., 2016. Effects of different lipid sources on growth performance, body composition and lipid metabolism of bullfrog *Lithobates catesbeiana*. Aquaculture 457, 104-108.
- Zhang, C.X., Huang, K.K., Wang, L., Song, K., Zhang, L., Li, P., 2015. Apparent digestibility coefficients and amino acid availability of common protein ingredients in the diets of bullfrog, *Rana (Lithobates) catesbeiana*. Aquaculture, 437, 38-45.

**Manuscrito 2 – Níveis e fontes de lipídios para girinos de rã-touro:
desempenho e composição corporal**

Donovan Filipe Henrique Pinto; Bruno Tadeu Marotta Lima; Cleber Fernando
Menegasso Mansano; Marta Verardino De Stéfani

Centro de Aquicultura; Universidade Estadual Paulista; Via de Acesso Prof.
Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.
E-mail: donovan_fhpinto@hotmail.com

Normas de referências, de acordo ao periódico “Aquaculture”

Resumo

Tendo em vista a importância dos lipídios como fonte de energia, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de duas fontes e níveis de óleo no desempenho e composição corporal de girinos de rã-touro. Foram realizados dois ensaios simultaneamente, utilizando 1710 girinos de rã-touro ($0,014 \pm 0,02\text{g}$) distribuídos em 16 aquários experimentais em cada ensaio. No primeiro ensaio, os girinos foram alimentados com quatro dietas isoprotéicas (27,4% PD) com diferentes porcentagens de inclusão de óleo de peixe (3, 6, 9 e 12%); no segundo ensaio foi utilizado óleo de girassol com as mesmas porcentagens de inclusão. Os tipos e níveis de óleo não afetaram a sobrevivência em ambos ensaios. O melhor ganho de peso dos girinos (4,98g) e TCE ($10,7\% \text{ dia}^{-1}$) foi obtido com 10,36 e 10,32% de EE na dieta, respectivamente, no ensaio com o óleo de peixe. Para os girinos do ensaio com óleo de girassol o melhor ganho de peso (4,34g) e TCE ($10,64\% \text{ dia}^{-1}$) foram observados com 10,21% e 10,31% de EE na dieta, respectivamente. O consumo da dieta aumentou e a conversão alimentar piorou com a elevação do teor de EE nas dietas com óleo de peixe ou de girassol. A maior porcentagem de gordura e de energia bruta corporal dos girinos alimentados com o óleo de peixe foram com 10,5% e 10,9% de EE na dieta respectivamente; nos girinos que receberam óleo de girassol foi de 9,3 e 9,7% de EE na dieta, respectivamente. A proteína corporal diminuiu nos girinos que receberam dieta contendo maior teor de EE na dieta com óleo de peixe; na dieta com óleo de girassol o comportamento foi ao contrário. As cinzas corporais diminuíram com a elevação do EE nas dietas com óleo de peixe ou de girassol. Os ácidos graxos corporais dos girinos acompanharam o perfil dos ácidos graxos das dietas. De acordo com os resultados obtidos, sugere-se o uso de 10% de EE na dieta para melhor ganho de peso, TCE e gordura corporal de girinos de rã-touro, o que equivale à inclusão de 7% de óleo de peixe ou de girassol.

Palavras-chave: *Lithobathes catesbeianus*, ranicultura, nutrição, óleos, ácidos graxos.

Manuscript 2 – Lipid levels and sources for bullfrog tadpoles: performance and body composition

Abstract

Considering the importance of lipids as an energy source, the objective of the present study was to evaluate the effect of two sources and oil levels on the performance and body composition of bullfrog tadpoles. Two trials were performed simultaneously, using 1,710 bullfrog tadpoles (0.014 ± 0.02 g) distributed in 16 experimental aquaria in each assay. In the first trial, the tadpoles were fed four isoprotein diets (27.4% PD) with different percentages of inclusion of fish oil (3, 6, 9 and 12%); in the second test, sunflower oil with the same inclusion percentages was used. Oil types and levels did not affect survival in both trials. The best weight gain of tadpoles (4.98 g) and TCE ($10.7\% \text{ day}^{-1}$) was obtained with 10.36 and 10.32% EE in the diet, respectively, in the fish oil test. For the tadpoles of the test with sunflower oil the best weight gain (4.34 g) and TCE ($10.64\% \text{ day}^{-1}$) were observed with 10.21% and 10.31% EE in the diet, respectively. Dietary intake increased and feed conversion worsened with the elevation of EE content in diets with fish oil or sunflower. The highest percentage of fat and gross body energy of tadpoles fed with fish oil were 10.5% and 10.9% EE in the diet, respectively; in tadpoles that received sunflower oil was 9.3 and 9.7% of EE in the diet, respectively. Body protein decreased in tadpoles that received a diet containing higher dietary EE content with fish oil; in the diet with sunflower oil the behavior was reversed. Body ashes decreased with elevation of EE in diets with fish or sunflower oil. The fatty acids of the tadpoles followed the profile of the fatty acids of the diets. According to the results, the use of 10% EE in the diet for better weight gain, TCE and body fat of bullfrog tadpoles is suggested, which is equivalent to the inclusion of 7% fish oil or sunflower.

Key-words: *Lithobathes catesbeianus*, frog farming, nutrition, oils, fatty acids

1. Introdução

Um dos principais quesitos para o desenvolvimento de qualquer espécie é a energia, essencial para a manutenção, crescimento e reprodução (Pezzato, 1997). Os lipídios são as melhores fontes de energia para os peixes, seguido pela proteína e carboidratos (Pezzato, 1999). Possuem diferentes funções no metabolismo como fonte de energia, antioxidante, transporte e absorção de vitaminas lipossolúveis, composição de membranas celulares, isolante térmico e precursor hormonal (Jordão Jr et al. 1998; Higgs e Dong, 2000).

Vários fatores podem interferir no nível adequado de lipídios na dieta de uma determinada espécie aquática: ambiente (marinho ou dulcícola), hábito alimentar (carnívoro, onívoro ou herbívoro), temperatura da água, fase de desenvolvimento e também a quantidade de carboidratos e proteínas da dieta (Garcia et al., 2012). A eficiência da utilização dos lipídios também é relacionada à qualidade dos lipídios disponíveis na dieta (Tocher et al., 2004; Zheng et al., 2004; Francis et al., 2009).

Diversos óleos de origem vegetal e animal podem ser utilizados como fonte de energia e ácidos graxos em dietas para animais aquáticos comercialmente produtivos (Sargent et al., 2002). Para rãs-touro, os efeitos de várias fontes de lipídio dietário foi estudado por Zhang et al. (2016), tais como: óleo de peixe, gordura de aves, banha de porco, óleo de soja e óleo de dendê. Entretanto, para girinos de rã-touro não temos essas informações.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes níveis (3, 6, 9 e 12%) e duas fontes de lipídios, um de origem vegetal (óleo de girassol) e outra de origem animal (óleo de peixe), no desempenho e composição corporal de girinos de rã-touro.

2. Materiais e Métodos

2.1. Condições experimentais e animais utilizados

Simultaneamente, foram realizados dois ensaios no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, com a duração de 58 dias, entre os meses de janeiro e março de 2016.

Em cada ensaio foram utilizados 1.710 girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) oriundos de mesma desova, no estágio 25 de Gosner (1960), com o peso médio inicial de $0,014 \pm 0,02$ g, distribuídos aleatoriamente em 16 aquários experimentais de 90 litros e em fluxo contínuo de água (100% do volume no intervalo de 24 h).

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, (Protocolo nº 013336/14), e foram conduzidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

A água utilizada foi proveniente de poço artesiano. Para a manutenção da qualidade da mesma, os aquários foram sifonados em dias alternados para a retirada de fezes, ração não consumida e restos de animais mortos.

Os parâmetros físico-químicos da água foram analisados semanalmente, monitorando-se o pH, sólidos totais dissolvidos, oxigênio dissolvido, porcentagem de oxigênio dissolvido e condutividade elétrica com o auxílio de um aparelho multiparâmetros Horiba (Série U-50) (Boyd e Tucker, 2012). A amônia foi determinada de acordo com Koroleff (1976). Um termômetro de máxima e mínima foi colocado em uma das unidades experimentais, para registrar as variações da temperatura ao longo do dia.

Os parâmetros de qualidade da água observados nos dois ensaios durante o período experimental foram adequados para o desenvolvimento dos girinos, de acordo com Sipaúba-Tavares et al. (2008) e Cribb et al. (2013). Entretanto, a temperatura da água foi superior à recomendada por Seixas Filho et al. (2017) (Tabela 1).

Tabela 1. Médias dos parâmetros da qualidade de água durante o período experimental.

Parâmetros	
Temperatura (°C) mínima	29,0 ± 1,5
Temperatura (°C) máxima	31,0 ± 1,3
pH	7,7 ± 0,7
Sólidos totais dissolvidos (mg L ⁻¹)	0,1 ± 0,1
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	5,8 ± 1,1
Porcentagem de oxigênio dissolvido (%)	77,1 ± 3,9
Condutividade elétrica (μS cm ⁻¹)	19,8 ± 2,2
Amônia (mg L ⁻¹)	0,17 ± 0,1

2.2. Dietas experimentais

Para cada ensaio foram formuladas quatro dietas experimentais fareladas, isoprotéicas (27,4 % PD) de acordo com Pinto et al. (2015), contendo diferentes porcentagens de inclusão (3, 6, 9 e 12%) de óleo de peixe (OP) ou girassol (OG) (Tabela 2).

Para o preparo das dietas, os ingredientes foram moídos e peneirados com malha de 0,35 mm, misturados em misturador automático em “Y” e, posteriormente, incorporados os diferentes óleos e o material inerte. As dietas foram armazenadas em freezer (-20°C) durante o período experimental.

As dietas experimentais foram oferecidas cinco vezes ao dia (8h 00min, 10h 00min, 12h 00min, 14h 00min e 17h 00min) até a aparente saciedade dos girinos. Foram evitadas sobras, de modo que a quantidade oferecida foi considerada a consumida (Solomon e Taruwa, 2011).

Foi analisada a porcentagem dos ácidos graxos contidos entre os lipídios totais das dietas experimentais (Tabela 3), onde foram identificados treze ácidos graxos em maiores proporções, dentre estes; saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), polinsaturados (PUFA), polinsaturados de cadeia longa (HUFA), ômega 3 e 6 PUFA, e ômega 3 e 6 HUFA. Apresentaram comportamentos análogos decrescentes das porcentagens, tal como: PUFA > MUFA > SFA > HUFA. Os ácidos graxos mais abundantes foram: C18:2n-6 (linoleico), C18:1n-9 (oleico) e C16:0 (palmítico), respectivamente.

A porcentagem dos ácidos graxos que compõem os lipídios totais das dietas contendo óleo de peixe (Figura 1a) e óleo de girassol (Figura 1b) apresentaram perfis semelhantes, evidenciando que o óleo de peixe utilizado foi oriundo de salmão de produção, como é o exemplo dos ácidos graxos C16:0 (palmítico), C18:1n9 (oleico) e C18:2n6 (linoleico). As dietas com óleo de peixe possuem teores maiores de ácidos graxos a partir do C18:3n3 (alfalinolênico) até o C22:6n3 (cervônico).

As dietas que contêm óleo de girassol possuem teores maiores dos ácidos graxos C18:1n9 (oleico) e C18:2n6 (linoleico), característica atribuída às sementes de girassol que em geral possuem tal perfil, podendo variar com a região e época do ano.

Tabela 2. Fórmulas e composição centesimal das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Número internacional (NRC 2011)	Dietas experimentais							
		3OP	6OP	9OP	12OP	3OG	6OG	9OG	12OG
Farinha de Peixe (63,87% PB) ¹	5 – 02 – 012	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Farinha de Vísceras (63,65% PB) ²	5 – 03 – 798	9,50	9,50	9,50	9,50	9,50	9,50	9,50	9,50
Farelo de Soja (49,42% PB) ³	5 – 04 – 604	23,55	23,55	23,55	23,55	23,55	23,55	23,55	23,55
Milho (7,14% PB) ³	4 – 02 – 935	24,45	24,45	24,45	24,45	24,45	24,45	24,45	24,45
Farelo de Trigo (16,11% PB) ⁴	4 – 05 – 190	14,98	14,98	14,98	14,98	14,98	14,98	14,98	14,98
Caulim (material inerte)		9,00	6,00	3,00	--	9,00	6,00	3,00	--
Óleo de peixe (9323 kcal kg ⁻¹) ⁵	*	3,00	6,00	9,00	12,00	--	--	--	--
Óleo de girassol (7244 kcal kg ⁻¹) ⁶	4 – 20 – 833	--	--	--	--	3,00	6,00	9,00	12,00
Antioxidante (Bht) ⁷		0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Suplemento mineral e vitamínico ⁸		0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Proteína digestível ⁹ (%)		27,40	27,40	27,40	27,40	27,40	27,40	27,40	27,40
Composição Analisada (100% de MS)									
Matéria seca (%)		91,43	91,34	91,49	91,82	92,04	92,13	92,22	92,42
Proteína Bruta (%)		35,18	34,35	35,17	34,95	34,29	34,23	34,87	34,83
Energia Bruta (kcal kg ⁻¹)		3812	4032	4355	4540	3859	4142	4251	4366
Matéria Mineral (%)		17,27	14,73	11,42	9,16	16,48	14,17	11,76	9,14
Extrato Etéreo (%)		8,55	9,42	11,60	13,40	8,52	9,24	11,28	14,72

¹ Salmon fishmeal - Pesquera Pacific Star S.A; ² Frangos Canção – Gonçalves e Tortola S/A; ³ Bunge Brasil belonging to Bunge Limited; ⁴ Moinho Pacífico Indústria e Comércio Ltda; ⁵ Campestre Ind. e Com. De Óleos Vegetais LTDA; ⁶ Cargill do Brasil; ⁷ Hidroxitolueno butilado;

⁸ Umidade (%) 2,0, Cinzas (%) 71,6442, Vitamina A (min) 35.000 U.I., Vitamina D3 (min) 2.000 U.I., Vitamina E (min) 120 U.I., Vitamina K3 (min) 800 mg, Ácido fólico (min) 10 mg, Biotina (min) 10 mg, Tiamina (B1) (min) 25 mg, Riboflavina (B2) (min) 35 mg, Piridoxina (B6) (min) 40 mg, Vitamina B 12 (min) 100 mcg, Niacina (min) 350 mg, Ácido Pantotênico (min) 150 mg, Colina (min) 2.500 mg, Cobre (min) 25 mg, Ferro (min) 150 mg, Manganês (min) 75 mg, Selênio (min) 1 mg, Zinco (min) 140 mg, Mananoligossacarídeo (min) 60 mg.

⁹ Valores calculados a partir do coeficiente de digestibilidade por Secco et al. (2005).

* Óleo de salmão cultivado.

3OP= 3% de óleo de peixe, 6OP= 6% de óleo de peixe, 9OP= 9% de óleo de peixe, 12OP= 12% de óleo de peixe, 3OG= 3% de óleo de girassol, 6OG= 6% de óleo de girassol, 9OG= 9% de óleo de girassol, 12OG= 12% de óleo de girassol.

Tabela 3. Composição dos ácidos graxos (%) contidos nos lipídios totais das dietas experimentais.

Ácidos Graxos (%)	3OP	6OP	9OP	12OP	3OG	6OG	9OG	12OG
C14:0	0,99	1,29	1,03	0,91	0,61	0,51	0,40	0,30
C16:0	15,96	15,29	14,78	13,98	15,00	11,68	10,69	9,50
C16:1n-7	2,42	2,46	2,10	1,82	1,75	1,34	1,10	0,85
C18:0	5,10	5,18	4,77	4,89	5,10	4,29	4,17	3,92
C18:1n-9	28,29	28,89	28,71	30,75	29,60	29,94	31,29	31,31
C18:1n-7	2,12	2,42	2,10	2,24	1,43	1,27	1,12	1,01
C18:2n-6	35,17	33,45	35,13	36,19	40,84	45,99	47,22	47,55
C18:3n-3	3,71	3,94	4,49	4,54	1,79	1,42	1,12	0,86
C20:0	0,32	0,41	0,36	0,33	0,17	0,22	0,19	0,06
C20:1n-9	1,05	1,67	1,04	1,07	0,67	0,60	0,51	0,46
C20:4n-6	0,85	0,82	0,96	0,44	0,63	0,56	0,42	1,56
C20:5n-3	1,34	2,24	2,09	1,21	0,83	0,66	0,61	1,70
C22:6n-3	2,70	1,95	2,44	1,62	1,59	1,51	1,17	0,91
Classes e razões dos ácidos graxos:								
SFA	22,36	22,17	20,94	20,12	20,88	16,70	15,44	13,78
MUFA	33,88	35,43	33,95	35,88	33,45	33,14	34,02	33,63
PUFA	38,88	37,39	39,62	40,74	42,62	47,41	48,34	48,41
PUFA n-3	3,71	3,94	4,49	4,54	1,79	1,42	1,12	0,86
PUFA n-6	35,17	33,45	35,13	36,19	40,84	45,99	47,22	47,55
HUFA	4,89	5,01	5,49	3,27	3,05	2,74	2,20	4,17
HUFA n-3	4,04	4,19	4,53	2,83	2,42	2,18	1,78	2,61
HUFA n-6	0,85	0,82	0,96	0,44	0,63	0,56	0,42	1,56
(n-3) (n-6) ⁻¹	4,77	5,08	4,72	6,47	3,82	3,86	4,21	1,67
(n-6) (n-3) ⁻¹	0,21	0,20	0,21	0,15	0,26	0,26	0,24	0,60

SFA = ácidos graxos saturados;

MUFA = ácidos graxos monoinsaturados;

PUFA = ácidos graxos polinsaturados;

HUFA = ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa;

n-6 PUFA = PUFA ômega 6;

n-3 PUFA = PUFA ômega 3;

n-3 HUFA = HUFA ômega 3;

n-6 HUFA = HUFA ômega 6.

3OP= 3% de óleo de peixe, 6OP= 6% de óleo de peixe, 9OP= 9% de óleo de peixe, 12OP= 12% de óleo de peixe, 3OG= 3% de óleo de girassol, 6OG= 6% de óleo de girassol, 9OG= 9% de óleo de girassol, 12OG= 12% de óleo de girassol

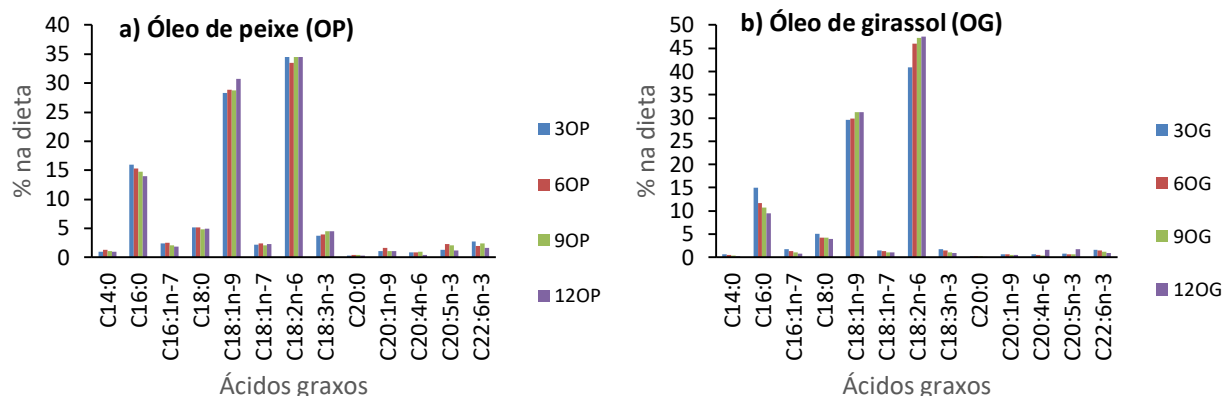


Figura 1. Porcentagem de ácidos graxos contidos nos lipídios totais das dietas experimentais para girinos de rã-touro contendo óleos de peixe (a) e óleo de girassol (b).

2.3. Parâmetros de desempenho

Para avaliar o desempenho produtivo foi realizada uma biometria inicial com 5% dos girinos de cada aquário experimental e uma biometria ao final do experimento com todos os girinos, quando foram pesados individualmente em balança eletrônica.

Com os dados das biometrias inicial e final e da dieta consumida em cada aquário experimental foram calculados o ganho de peso, consumo da dieta, conversão alimentar, taxa de crescimento específico e sobrevivência.

A avaliação da composição corporal inicial dos girinos (proteína, energia bruta, extrato etéreo, cinzas e matéria seca), foi realizada com uma amostra de 100 girinos do mesmo grupo de animais. Ao final do experimento, 10% dos girinos de cada aquário experimental foram colocados em caixas com água durante 24hs para eliminação do conteúdo do trato gastrointestinal. Posteriormente, os girinos foram anestesiados, eutanasiados em imersão no gelo, e armazenados em freezer (-20°C) para posterior análises. Também foi avaliada a porcentagem de ácidos graxos (AG) entre os lipídios totais corporais.

2.4. Processamento das amostras e análises laboratoriais

As amostras foram moídas em processador de alimentos, acondicionadas em placas de Petri e posteriormente liofilizadas a -50°C (modelo: Super Modulyo

Freeze Dryer) para obtenção da matéria pré-seca. Após, as amostras foram moídas em moinho de bola e encaminhadas ao laboratório para análise de proteína bruta pelo método de Dumas usando o aparelho Leco 528 LC (Etheridge et al., 1998). Para a análise do extrato etéreo, foi utilizado o aparelho ANKOM XT15 (AOCS, 2016) no laboratório de Ciências Avícolas da FCAV – UNESP. A matéria seca foi determinada em estufa com circulação de ar forçado a 105° C por 12 horas, a matéria mineral em mufla a 550° C e a energia bruta em bomba calorimétrica (AOAC, 2016).

A análise do perfil de ácidos graxos foi realizada no Laboratório de Metabolismo e Reprodução em Organismos Aquáticos – Universidade de São Paulo. Foram extraídos os lipídios totais corporal dos girinos utilizando uma mistura de clorofórmio: metanol: água (2:1:0,5) (Folch et al., 1957). Os extratos lipídicos foram metilados (para a formação dos metil ésteres) pelo método ácido (Kitson et al., 1996), utilizando cloreto de acetila e metanol como catalisadores da reação. Os metil ésteres foram analisados em cromatografia gasosa (CG), acoplada a um ionizador de chama (FID) (VARIAN GC 3900) acoplado a um autoinjeter (CP8410) e o perfil de AG foi determinado com base no cálculo de tempo de retenção, utilizando-se padrões de AG com tempo de retenção conhecido (Supelco, 37 components; Sigma–Aldrich; Mixture, Me93, Larodan and Qualmix, PUFA fish M, Menhaden Oil, Larodan).

2.5. Análise estatística

A normalidade dos dados e a homogeneidade da variância foram testadas antes da aplicação da análise de variância (ANOVA) e aplicação dos modelos matemáticos. A determinação dos melhores valores para as variáveis de composição corporal (extrato etéreo, energia bruta, proteína e matéria mineral) e desempenho produtivo (ganho em peso, consumo da dieta, conversão alimentar e taxa de crescimento específico) em função do nível de extrato etéreo fornecido via alimentação, foi realizada através do ajuste dos dados pela regressão que apresentou o melhor ajuste (regressão linear, regressão polinomial ou *linear response plateau*); essas variáveis foram obtidas pelas ferramentas “proc reg e proc nlin”, para as variáveis que os valores não se

ajustaram as regressões testadas foi aplicado o teste de “Wilcoxon” (proc npar1way) associado ao teste de médias de “Duncan”. As porcentagens dos ácidos graxos entre os lipídios totais corporais foram analisadas entre os níveis através de ANOVA one-way associadas ao teste de Tukey ($p < 0,05$), para essas análises foi utilizando o software SAS (SAS instituto, 2014).

2.6. Delineamento experimental

Em cada ensaio foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos correspondentes a diferentes porcentagens de inclusão de óleo (3, 6, 9 e 12%) com quatro repetições cada. No primeiro ensaio foi utilizado óleo de peixe (salmão) e no segundo o óleo de girassol. Para a análise dos parâmetros de deposição corporal e ácidos graxos, foram realizadas três réplicas das amostras coletadas de cada repetição.

3. Resultados

3.1. Desempenho e composição corporal

Os diferentes tipos de óleo e níveis nas dietas não afetaram ($p > 0,05$) a sobrevivência dos girinos apresentando as seguintes médias no ensaio com óleo de peixe: $84 \pm 7,7\%$; $85 \pm 4,4\%$; $91 \pm 6,2\%$ e $84 \pm 7,3\%$, respectivamente para 3, 6, 9 e 12% de inclusão. Para o ensaio com óleo de girassol as médias foram: $81 \pm 7,9\%$; $77 \pm 7,8\%$; $83 \pm 6,7\%$ e $85 \pm 8,9\%$ para os níveis 3, 6, 9 e 12% de óleo na dieta, respectivamente.

Os dados obtidos para o ganho de peso no ensaio com óleo de peixe e com óleo de girassol, bem como os dados da taxa de crescimento específico (TCE) para ambos ensaios apresentaram melhor ajuste, convergindo com a equação de regressão polinomial. Para os girinos que receberam óleo de peixe na dieta, o máximo ganho de peso teórico (4,98 g) foi obtido com 10,36% de extrato etéreo (EE) na dieta (Figura 2a), ou 7,35% de inclusão de óleo de peixe na dieta. No ensaio com óleo de girassol, o máximo ganho de peso dos girinos (4,34 g) pode ser obtido com 10,21% de EE na dieta (Figura 2b), ou 7,44% de inclusão de óleo de girassol na dieta.

A TCE máxima para os girinos no ensaio com óleo de peixe ($10,70\% \text{ dia}^{-1}$) foi observada com $10,32\%$ de EE na dieta (Figura 2c), ou $7,47\%$ de inclusão de óleo de peixe na dieta. No ensaio com óleo de girassol, os valores foram próximos, apresentando a TCE de $10,64\% \text{ dia}^{-1}$ com $10,31\%$ de EE na dieta (Figura 2d), ou $7,44\%$ de inclusão de óleo de girassol na dieta.

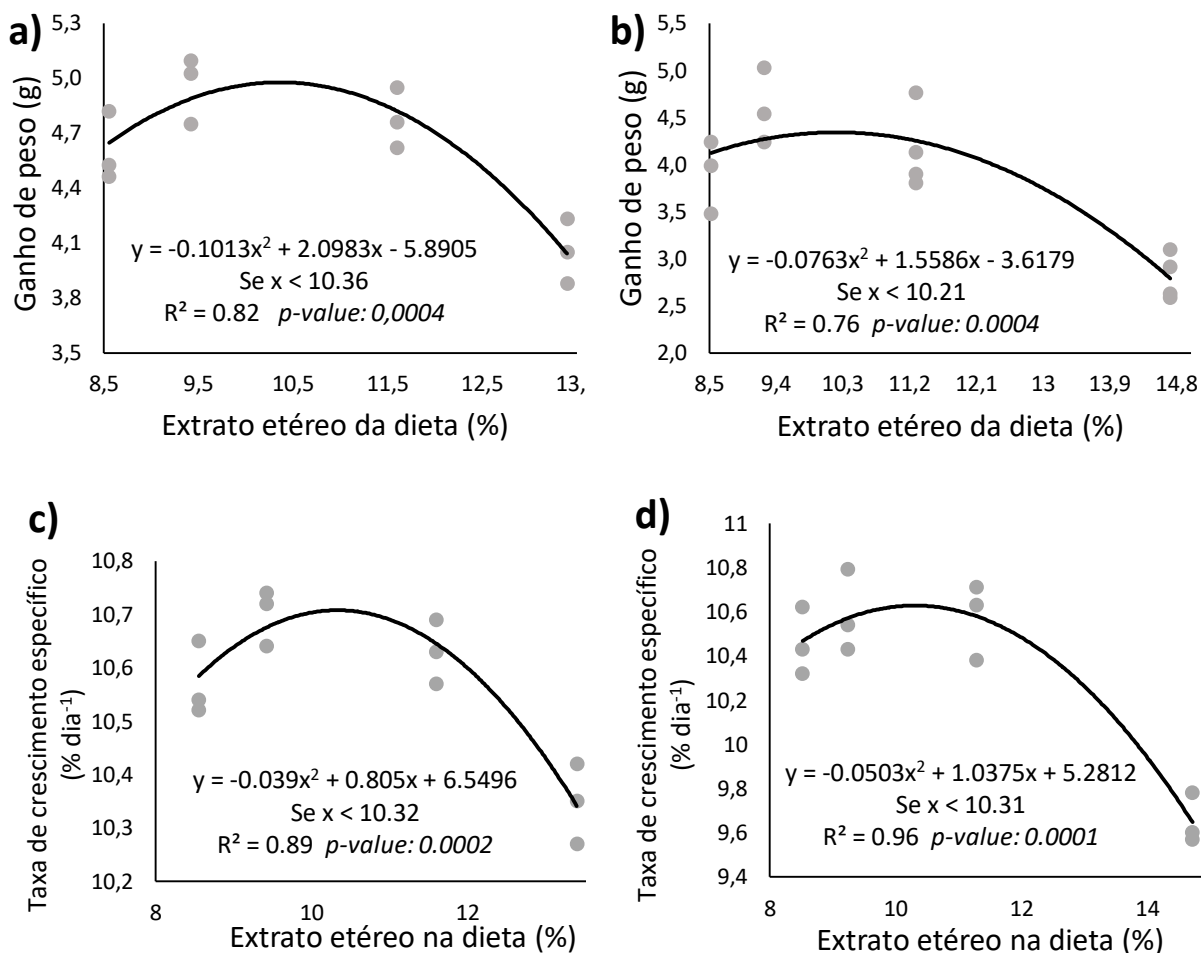


Figura 1. Ganho de peso (g) de girinos de rã-touro alimentados com dietas contendo óleo de peixe (a) e óleo de girassol (b). Taxa de crescimento específico (% dia^{-1}) de girinos de rã-touro alimentados com dietas contendo óleo de peixe (c) e óleo de girassol (d).

Os dados de consumo da dieta e conversão alimentar, em ambos ensaios, apresentaram uma tendência linear, ou seja, o consumo da dieta aumentou (Figuras 3a e b) e a conversão alimentar piorou (Figuras 3c e d) com a elevação da porcentagem de EE na dietas contendo óleo de peixe ou de girassol.

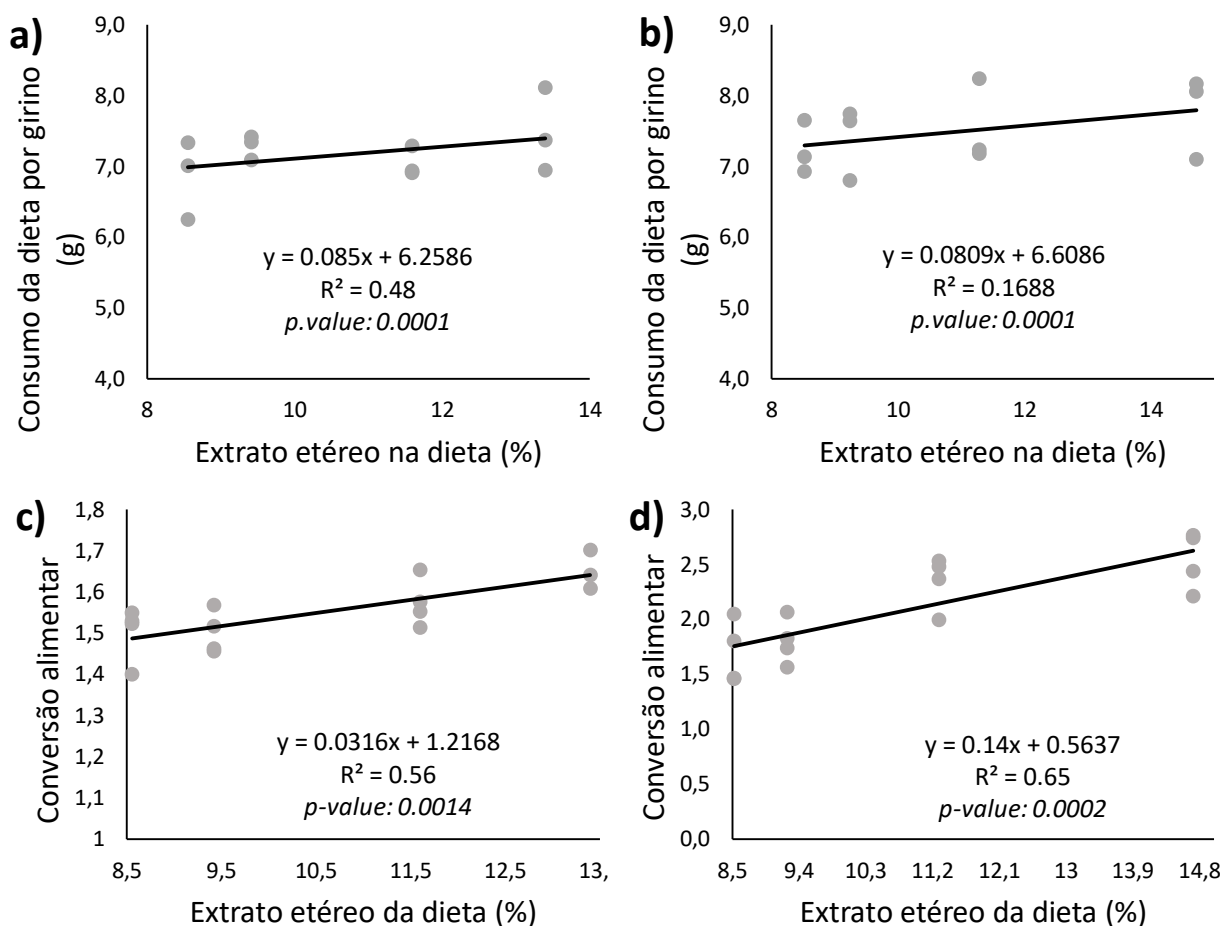


Figura 3. Consumo da dieta (g) por girino de rã-touro alimentado com dietas contendo óleo de peixe (a) e óleo de girassol (b) durante o período experimental. Conversão alimentar de girinos de rã-touro alimentados com dietas contendo óleo de peixe (c) e óleo de girassol (d).

A composição corporal inicial dos girinos apresentou menor teor de água, gordura e energia bruta, maior em proteína e cinzas em comparação com a composição corporal final dos girinos alimentados com as dietas contendo óleo de peixe (Tabela 4) ou de girassol (Tabela 5).

Tabela 4. Composição corporal inicial e final (% na MS) de girinos de rã-touro alimentados com diferentes níveis de óleo de peixe.

Inicial	Água (%)	PB (%)	EE (%)	Cinzas (%)	EB (kcal kg ⁻¹)
	90,48 ± 0,85 ^b	63,36 ± 0,44 ^a	21,59 ± 0,41 ^d	11,36 ± 0,16 ^a	5532 ± 20 ^e
Óleo de peixe					
3	96,68 ± 0,59 ^a	53,15 ± 0,39 ^b	29,49 ± 1,78 ^c	11,23 ± 0,56 ^a	5995 ± 90 ^d
6	97,07 ± 0,35 ^a	52,75 ± 0,67 ^b	31,78 ± 0,94 ^b	9,48 ± 0,29 ^b	6118 ± 113 ^c
9	96,31 ± 0,30 ^a	52,46 ± 1,78 ^b	33,50 ± 1,04 ^b	8,67 ± 0,70 ^c	6290 ± 123 ^b
12	96,89 ± 0,57 ^a	50,64 ± 0,59 ^c	35,61 ± 1,56 ^a	7,84 ± 0,46 ^d	6371 ± 118 ^a

* Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Tabela 5. Composição corporal inicial e final (% na MS) de girinos de rã-touro alimentados com diferentes níveis de óleo de girassol.

Inicial	Água (%)	PB (%)	EE (%)	Cinzas (%)	EB (kcal kg ⁻¹)
	90,48 ± 0,85 ^b	63,36 ± 0,44 ^a	21,59 ± 0,41 ^d	11,36 ± 0,16 ^a	5532 ± 20 ^c
Óleo de girassol					
3	96,64 ± 0,48 ^a	54,37 ± 1,34 ^c	28,64 ± 1,87 ^c	10,71 ± 0,47 ^a	6009 ± 79 ^b
6	96,73 ± 0,49 ^a	52,74 ± 1,57 ^d	31,44 ± 0,88 ^a	9,93 ± 0,42 ^b	6028 ± 68 ^b
9	96,58 ± 0,54 ^a	53,11 ± 1,13 ^d	32,43 ± 1,22 ^a	8,77 ± 0,40 ^c	6070 ± 66 ^{ab}
12	96,51 ± 0,27 ^a	56,26 ± 0,50 ^b	30,86 ± 1,31 ^b	8,03 ± 0,46 ^d	6092 ± 79 ^a

* Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Em ambos ensaios, com óleo de peixe e óleo de girassol, os dados de gordura e energia bruta corporal dos girinos de rã-touro tiveram melhor ajuste (p < 0,0001) com a equação de regressão *Broken line* com bons coeficientes de determinação (Figura 4).

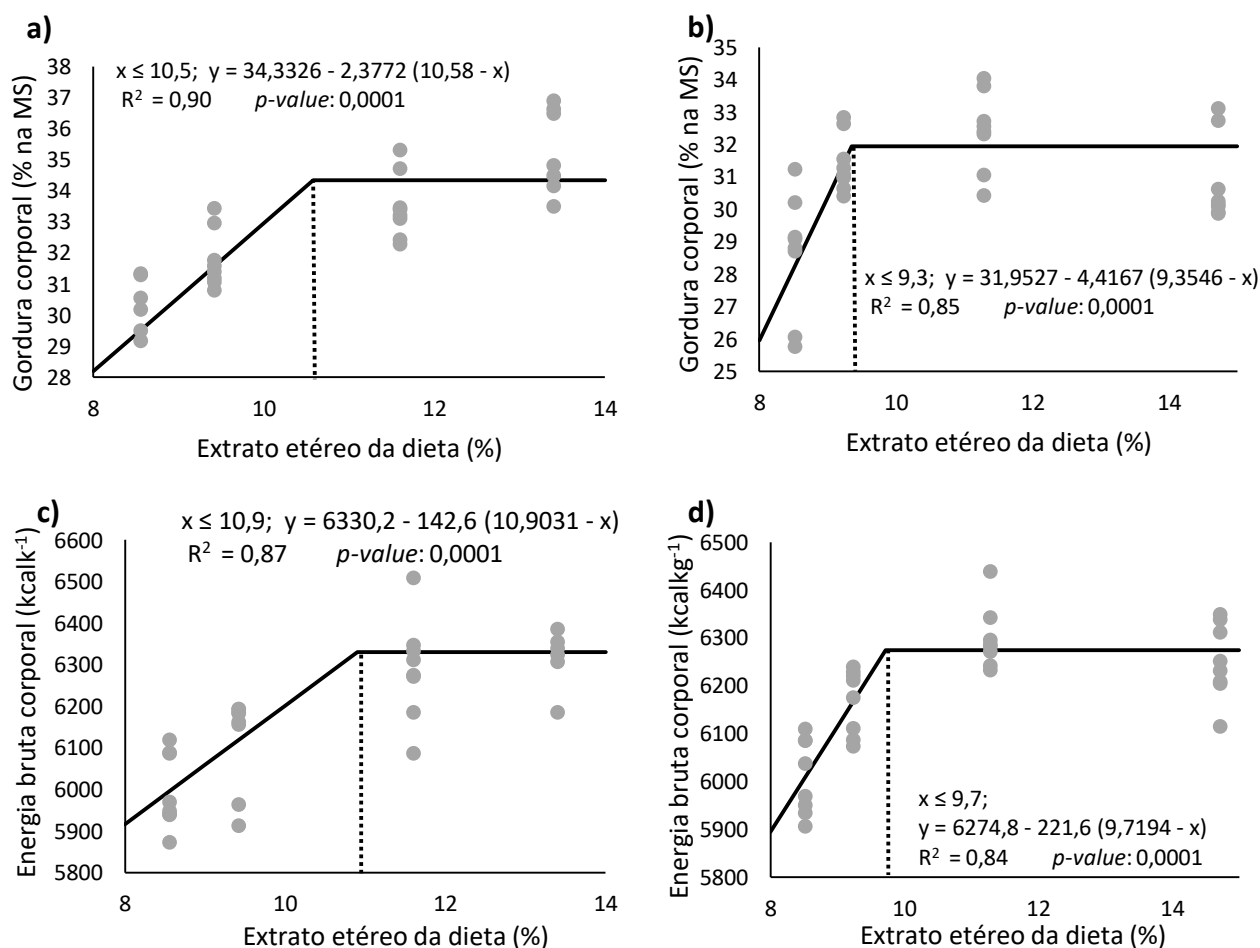
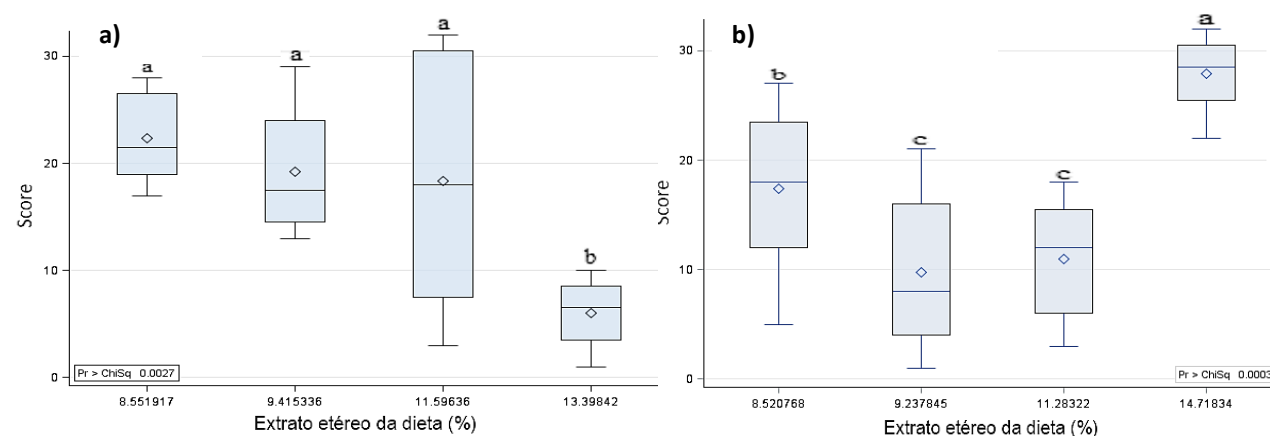


Figura 4. Gordura corporal (% na MS) de girinos de rã-touro alimentados com dietas contendo óleo de peixe (a) e óleo de girassol (b) durante o período experimental. Energia bruta corporal (em 100% de MS) de girinos de rã-touro alimentados com dietas contendo óleo de peixe. (c) e óleo de girassol (d).

O melhor teor de extrato etéreo da dieta, estimado para a maior porcentagem de gordura corporal dos girinos foi de 10,5% EE na dieta (Figura 4a) ou 7,57% de inclusão de óleo de peixe na dieta. No ensaio com óleo de girassol o melhor resultado foi com 9,3% EE na dieta (Figura 4b) ou 6,53% de inclusão de óleo na dieta. Para a energia bruta corporal, o melhor teor de extrato etéreo da dieta foi de 10,9% EE (Figura 4c) ou 7,89% de inclusão quando se utilizou o óleo de peixe. Quando se utilizou o óleo de girassol o melhor resultado foi de 9,7% EE na dieta (Figura 4d) ou 6,95% de inclusão de óleo na dieta.

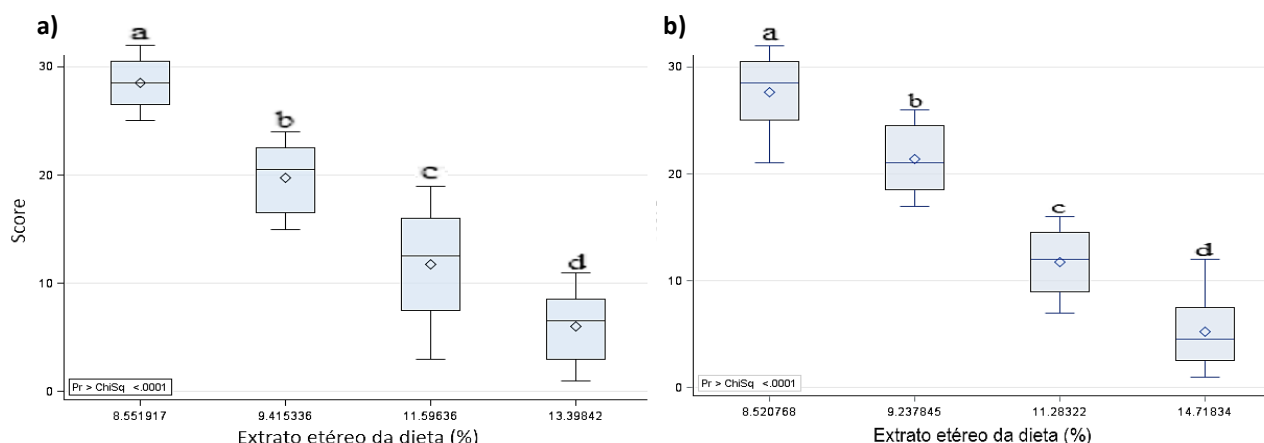
Com relação à proteína corporal dos girinos, no ensaio com óleo de peixe, observou-se diminuição significativa de seu teor nos girinos que receberam a dieta contendo maior teor de EE, não ocorrendo diferença significativa entre as outras dietas (Figura 5a). No ensaio com óleo de girassol observou-se um comportamento contrário, ou seja, os girinos que receberam a dieta contendo maior teor de EE apresentaram significativamente maior teor de proteína corporal (Figura 5b).

Para as cinzas corporais, em ambos ensaios se observou o mesmo comportamento, ou seja, diminuição significativa das cinzas corporais com a elevação do extrato etéreo da dieta com óleo de peixe (Figura 6a) ou óleo de girassol (Figura 6b).



* Letras representando diferença significativa pelo teste de Duncan ($\alpha < 0,05$). $F = 13,92$ com $p\text{-value} < 0,0001$.

Figura 5. Distribuição de dados não-paramétricos de Wilcoxon da proteína corporal de girinos de rã-touro alimentados com dietas contendo óleo de peixe (a) e óleo de girassol (b).



* Letras representando diferença significativa pelo teste de Duncan ($\alpha < 0,05$). $F = 13,92$ com $p\text{-value} < 0,0001$.

Figura 6. Porcentagem de ácidos graxos contidos nos lipídios totais das dietas experimentais para girinos de rã-touro contendo óleos de peixe (a) e girassol (b).

3.2. Composição dos ácidos graxos corporais

Na composição dos ácidos graxos corporais inicial dos girinos (Tabela 6 e Figura 7), observa-se maiores concentrações de oleico (C18:1n9), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), com 39,28; 29,59 e 11,09%, dos lipídios totais, respectivamente. Entre as classes dos ácidos graxos, predominam os saturados e monoinsaturados, somando 42,29 e 53,31% respectivamente. A maior razão entre os ácidos graxos é de 7,16 entre (n-6)(n-3)⁻¹, demonstrando um maior nível de ômega 6 no corpo dos girinos de rã-touro.

As maiores concentrações de ácidos graxos corporais final dos girinos que receberam as dietas contendo óleo de peixe (Tabela 7 e Figura 8a) acompanharam o perfil de ácidos graxos observados nas dietas (Figura 1), ou seja, maiores concentrações de oleico (C18:1n9), palmítico (C16:0) e linoleico (C18:2n6). Também houve predominância dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados, com maior razão entre (n-6)(n-3)⁻¹. Os ácidos graxos palmítico (C16:0), oleico (C18:1n9) e linoleico (C18:2n6) apresentaram diferenças significativas entre os níveis de óleo de peixe utilizados.

Tabela 6. Composição dos ácidos graxos (%) corporais inicial contidos nos lipídios totais de girinos de rã-touro.

Ácidos Graxos	(%)
C14:0	1,08 ± 0,03
C16:0	29,59 ± 0,52
C16:1n7	7,71 ± 0,12
C18:0	11,09 ± 0,22
C18:1n9	39,28 ± 0,72
C18:1n7	4,67 ± 0,13
C18:2n6	3,69 ± 0,32
C18:3n3	0,07 ± 0,01
C20:0iso	0,54 ± 0,2
C20:1n9	1,66 ± 0,37
C20:4n6	0,17 ± 0,02
C20:5n3	0,23 ± 0,11
C22:6n3	0,24 ± 0,05
Classes e razões dos ácidos graxos:	
SFA	42,29 ± 0,97
MUFA	53,31 ± 1,34
PUFA	3,77 ± 0,33
PUFA n-3	0,07 ± 0,01
PUFA n-6	3,69 ± 0,32
HUFA	0,63 ± 0,18
HUFA n-3	0,47 ± 0,16
HUFA n-6	0,17 ± 0,08
(n-3) (n-6) ⁻¹	0,14 ± 0,41
(n-6) (n-3) ⁻¹	7,16 ± 2,51

SFA = ácidos graxos saturados; MUFA = ácidos graxos monoinsaturados; PUFA = ácidos graxos polinsaturados; HUFA = ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa; n-6 PUFA = PUFA ômega 6; n-3 PUFA = PUFA ômega 3; n-3 HUFA = HUFA ômega 3; n-6 HUFA = HUFA ômega 6.

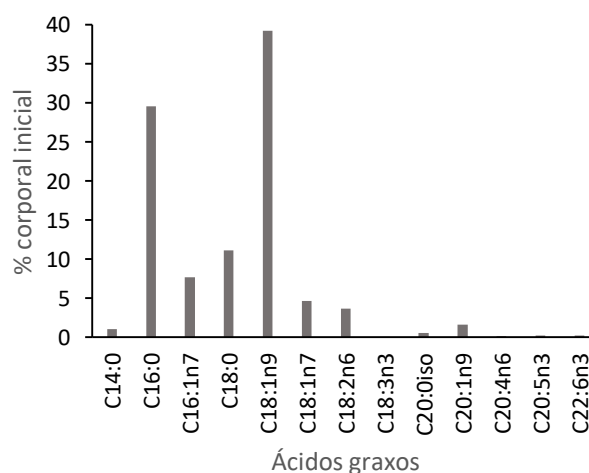


Figura 7. Distribuição da porcentagem de ácidos graxos corporais inicial contidos nos lipídios totais de girinos de rã-touro.

Tabela 7. Composição dos ácidos graxos (%) corporal final contidos nos lipídios totais de girinos de rã-touro alimentados com dietas contendo óleo de peixe.

Ácidos Graxos (%)	Dietas experimentais			
	3OP	6OP	9OP	12OP
C14:0	0,91 ± 0,06	0,79 ± 0,02	1,14 ± 0,09	1,13 ± 0,14
C16:0	18,28 ± 1,31 ^b	15,02 ± 0,06 ^c	20,03 ± 1,43 ^b	22,6 ± 0,8 ^a
C16:1n7	7,15 ± 0,47	6,01 ± 0,17	5,57 ± 0,18	6,61 ± 0,23
C18:0	4,8 ± 0,31	4,07 ± 0,09	5,15 ± 0,37	5,79 ± 0,37
C18:1n9	37,09 ± 0,79 ^c	35,28 ± 0,44 ^c	43,27 ± 1,32 ^b	46,17 ± 1,05 ^a
C18:1n7	4,51 ± 0,21	4,57 ± 0,22	4,71 ± 0,23	5,14 ± 0,13
C18:2n6	20,81 ± 2,16 ^b	25,33 ± 0,3 ^a	16,11 ± 2,15 ^c	7,44 ± 1,18 ^d
C18:3n3	1,7 ± 0,26	2,44 ± 0,08	0,59 ± 0,39	0,28 ± 0,06
C20:0	0,68 ± 0,1	1,06 ± 0,13	0,89 ± 0,1	1 ± 0,13
C20:1n9	1,51 ± 0,04	1,73 ± 0,13	1,32 ± 0,46	3,02 ± 0,32
C20:4n6	0,51 ± 0,08	0,63 ± 0,02	0,28 ± 0,13	0,06 ± 0,01
C20:5n3	0,57 ± 0,12	1,01 ± 0,13	0,51 ± 0,24	0,31 ± 0,08
C22:6n3	1,5 ± 0,36	2,06 ± 0,04	0,42 ± 0,14	0,45 ± 0,2
Classes e razões dos ácidos graxos:				
SFA	24,67 ± 1,77	20,94 ± 0,29	27,21 ± 2	30,52 ± 1,43
MUFA	50,25 ± 2,61	47,6 ± 0,8	54,88 ± 3,4	60,93 ± 2,4
PUFA	22,5 ± 1,07	27,77 ± 0,49	16,7 ± 0,91	7,72 ± 0,74
PUFA n-3	1,7 ± 3,38	2,44 ± 0,96	0,59 ± 4,08	0,28 ± 2,68
PUFA n-6	20,81 ± 1,62	25,33 ± 0,79	16,11 ± 2,09	7,44 ± 1,44
HUFA	2,57 ± 2,47	3,69 ± 0,65	1,21 ± 2,47	0,83 ± 1,44
HUFA n-3	2,06 ± 2,47	3,07 ± 0,51	0,93 ± 3	0,76 ± 1,57
HUFA n-6	0,51 ± 2,22	0,63 ± 0,52	0,28 ± 2,62	0,06 ± 1,64
n-3 / n-6	0,18 ± 2,87	0,21 ± 1,19	0,09 ± 4,2	0,14 ± 2,93
n-6 / n-3	5,67 ± 1,56	4,71 ± 0,67	10,78 ± 1,64	7,18 ± 1,28

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05).

SFA = ácidos graxos saturados;

MUFA = ácidos graxos monoinsaturados;

PUFA = ácidos graxos polinsaturados;

HUFA = ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa;

n-6 PUFA = PUFA omega 6;

n-3 PUFA = PUFA omega 3;

n-3 HUFA = HUFA omega 3;

n-6 HUFA = HUFA omega 6.

No ensaio com óleo de girassol observou-se o mesmo comportamento (Tabela 8 e Figura 8b), ou seja, os girinos apresentaram maiores concentrações dos ácidos graxos oleico (C18:1n9), palmítico (C16:0) e linoleico (C18:2n6), exceto nos girinos alimentados com 9 e 12% de óleo de girassol, onde ocorreu diminuição significativa do linoleico. Entre os ácidos graxos avaliados, os ácidos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1n7), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n9), vaccénico (C18:1n7), linoleico (C18:2n6) e gadoleico (C20:1n9) diferiram entre os níveis utilizados de óleo de girassol.

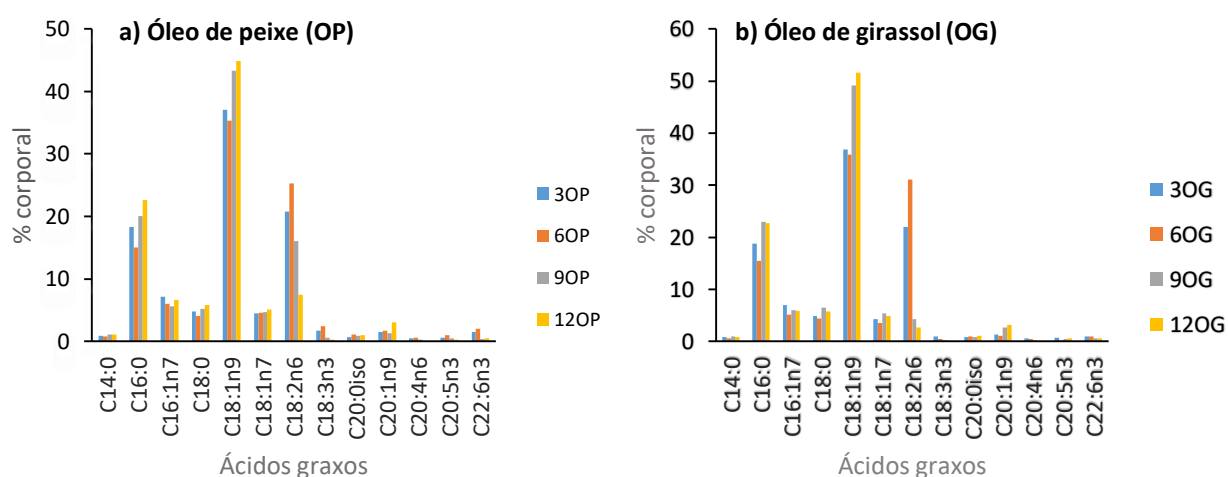


Figura 8. Porcentagem de ácidos graxos contidos nos lipídios totais das dietas experimentais para girinos de rã-touro contendo óleos de peixe (a) e óleo de girassol (b).

Tabela 8. Composição dos ácidos graxos (%) corporal final contidos nos lipídios totais de girinos de rã-touro alimentados com dietas contendo óleo de girassol.

Ácidos Graxos (%)	Dietas experimentais			
	3OG	6OG	9OG	12OG
C14:0	0,8 ± 0,01	0,6 ± 0,02	0,97 ± 0,04	0,87 ± 0,06
C16:0	18,81 ± 0,5 ^b	15,4 ± 0,63 ^c	22,95 ± 0,7 ^a	22,67 ± 0,15 ^a
C16:1n7	7,02 ± 0,35 ^a	5,13 ± 0,24 ^b	6,04 ± 0,1 ^{ab}	5,83 ± 0,16 ^b
C18:0	4,91 ± 0,19 ^{bc}	4,39 ± 0,31 ^c	6,47 ± 0,19 ^a	5,78 ± 0,2 ^{ab}
C18:1n9	36,8 ± 0,56 ^c	35,86 ± 0,45 ^c	49,21 ± 0,26 ^b	51,65 ± 0,25 ^a
C18:1n7	4,27 ± 0,3 ^{ab}	3,49 ± 0,04 ^b	5,35 ± 0,26 ^a	4,85 ± 0,07 ^a
C18:2n6	22,01 ± 1,09 ^b	31,05 ± 0,37 ^a	4,26 ± 0,72 ^c	2,71 ± 0,25 ^d
C18:3n3	0,94 ± 0,08	0,47 ± 0,15	0,16 ± 0,03	0,1 ± 0,03
C20:0	0,83 ± 0,1	0,89 ± 0,13	0,79 ± 0,07	1,11 ± 0,1
C20:1n9	1,33 ± 0,07 ^b	1,13 ± 0,15 ^b	2,71 ± 0,16 ^a	3,22 ± 0,16 ^a
C20:4n6	0,61 ± 0,08	0,42 ± 0,14	0,17 ± 0,03	0,12 ± 0,01
C20:5n3	0,67 ± 0,15	0,27 ± 0,06	0,41 ± 0,04	0,54 ± 0,17
C22:6n3	0,99 ± 0,16	0,9 ± 0,26	0,52 ± 0,15	0,56 ± 0,08
Classes e razões dos ácidos graxos:				
SFA	25,36 ± 0,8	21,28 ± 1,1	31,17 ± 1	30,42 ± 0,51
MUFA	49,42 ± 1,49	45,6 ± 1,46	63,31 ± 1,23	65,55 ± 0,72
PUFA	22,95 ± 0,92	31,52 ± 0,72	4,42 ± 0,58	2,81 ± 0,43
PUFA n-3	0,94 ± 1,99	0,47 ± 1,19	0,16 ± 1,21	0,1 ± 0,87
PUFA n-6	22,01 ± 1,11	31,05 ± 0,9	4,26 ± 0,7	2,71 ± 0,43
HUFA	2,27 ± 1,49	1,59 ± 0,53	1,1 ± 1,04	1,22 ± 0,42
HUFA n-3	1,66 ± 1,25	1,17 ± 0,67	0,93 ± 0,91	1,1 ± 0,44
HUFA n-6	0,61 ± 1,06	0,42 ± 1,52	0,17 ± 1,12	0,12 ± 0,66
n-3 / n-6	0,12 ± 1,81	0,05 ± 1,81	0,25 ± 1,49	0,42 ± 1,15
n-6 / n-3	8,69 ± 1,23	19,26 ± 1,28	4,04 ± 0,92	2,36 ± 0,68

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

SFA = ácidos graxos saturados;

MUFA = ácidos graxos monoinsaturados;

PUFA = ácidos graxos polinsaturados;

HUFA = ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa;

n-6 PUFA = PUFA omega 6;

n-3 PUFA = PUFA omega 3;

n-3 HUFA = HUFA omega 3;

n-6 HUFA = HUFA omega 6.

4. Discussão

As porcentagens de extrato etéreo utilizados nas dietas para ambos os ensaios não foram deletérias a ponto de afetar a sobrevivência dos girinos de rã-touro, apresentando valores médios de 86% e 81,5% nos ensaios com óleo de peixe e de girassol. Abinati et al. (2001) também não observaram a influência de diferentes níveis de energia digestível (3627, 3693, 3758, 3823, 3889 e 3954 kcal kg⁻¹) na sobrevivência de girinos de rã-touro através da adição de óleo de soja (2, 5, 8, 11, 14 e 17%, respectivamente) na dieta.

Pelo fato dos girinos serem ectotérmicos, a temperatura da água influencia diretamente no seu crescimento e metamorfose. No presente estudo a temperatura da água variou de 29±1,56 a 31±1,27°C, um pouco superior à recomendada por Seixas Filho et al. (2017) de 22 a 28°C. Provavelmente isso acelerou o processo de metamorfose, encurtou o período experimental e consequentemente os girinos atingiram um peso menor no final.

O aumento do extrato etéreo nas dietas refletiu de forma quadrática no ganho de peso e TCE dos girinos, ou seja, houve diminuição desses parâmetros com níveis superiores de 10,3% EE na dieta no ensaio com óleo de peixe ou girassol, o que equivale a inclusão de 7,3% de óleo de peixe e 7,4% de óleo de girassol na dieta dos girinos. Esse comportamento não foi observado por Albinati et al. (2001) e Seixas Filho et al. (2012) onde o ganho de peso dos girinos não foi afetado pelas dietas contendo diferentes níveis de energia digestível.

Normalmente, o consumo da dieta diminui com o aumento do nível de energia da mesma. Entretanto, no presente estudo observou-se um pequeno aumento do consumo da dieta e, consequentemente, a piora da conversão alimentar com o aumento dos níveis de extrato etéreo nas dietas com óleo de peixe ou de girassol. Apesar disso, a conversão alimentar estimada com 10% EE na dieta com óleo de peixe (1,5) e de óleo de girassol (1,9) são consideradas satisfatórias para girinos de rã-touro, estando próximas às observadas na literatura (Albinati et al., 2001; Seixas Filho et al., 2012; Mansano et al., 2014).

A gordura e a energia bruta corporal aumentaram com a elevação do extrato etéreo nas dietas, atingindo um máximo por volta de 10% de EE nas dietas com óleo de peixe e 9% de EE nas dietas com óleo de girassol, o que

equivale à inclusão de 7,5% e 6,5% desses óleos nas dietas, respectivamente. Estudos com dietas ricas em lipídios também demonstraram aumento na deposição de gordura em peixes (Stowell e Gatlin, 1992; Arzel et al., 1994; Lee et al., 2002) e em girinos (Albinati et al., 2001). No caso de girinos de rã-touro, o depósito de gordura ocorre principalmente nos corpos adiposos e de forma menos difusa nos músculos, fígado, pele, rins, pulmões, ossos e tecido conjuntivo (Whight et al., 2011). Mansano et al. (2013) verificaram aumento gradativo da gordura depositada em razão do desenvolvimento do corpo adiposo com o crescimento dos girinos, uma vez, que durante a metamorfose ocorre grande gasto energético (Scott et al., 2007).

A proteína corporal se acumula principalmente na cauda dos girinos, sendo essencial no clímax da metamorfose, quando ocorre apoptose da mesma, o animal para de se alimentar e passa de vida aquática para terrestre (Ishizuya-Oka et al., 2010). Como o lipídio fornece energia, esperava-se que com o aumento do EE nas dietas, houvesse um efeito poupador da proteína e consequentemente elevação da proteína corporal, entretanto, esse comportamento não foi observado nos girinos que receberam óleo de peixe, e sim com o óleo de girassol. Um dos efeitos negativos do excesso de lipídios na dieta é o seu desequilíbrio em relação aos outros nutrientes (Turchini et al., 2010), o que pode ter influenciado a proteína corporal e as cinzas corporais.

Os ácidos graxos corporais contidos nos lipídios totais dos girinos acompanharam de maneira geral o perfil de ácidos graxos observados nas dietas com óleo de peixe e de girassol. Todos os organismos podem sintetizar ácidos graxos saturados (SFA) 16:0 e 18:0 (Cook, 1996; Sargent et al., 2002; Turchini et al., 2010) pela ação da síntese dos ácidos graxos em uma reação citosólica utilizando acetil-CoA e fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADPH) (Turchini et al., 2010). No caso específico do oleico (C18:1n9), o mesmo pode ser sintetizado pelos animais através da $\Delta 9$ -dessaturase microssomal; como eles não têm a $\Delta 12$ -dessaturase para converter 18:1n-9 em 18:2n-6 e a $\Delta 15$ -dessaturase para converter 18:2n-6 em 18:3n-3, então 18:2n-6 e 18:3n-3 são considerados nutrientes essenciais e devem ser fornecidos na dieta (Tocher, 2003). Porém, a quantidade necessária fornecida pela dieta não é o único fator decisivo para sua assimilação, uma vez que a habilidade inata dos animais de

modificar um ácido graxo, seja por catabolismo ou anabolismo, afeta o requerimento, como também a capacidade geneticamente determinada de metabolizar cada ácido graxo (Sargent et al., 2002; Turchini et al., 2010).

Estudos demonstraram que a absorção dos lipídios a nível intestinal diminui à medida que aumenta a sua complexidade ou o grau de insaturação do óleo (Morais et al., 2005; Mollan et al., 2008), podendo afetar a absorção de outras classes entre os próprios ácidos graxos (Sargent et al., 2002, Turchini et al., 2010). Por essa razão, os requisitos de ácidos graxos para as espécies de animais aquáticos podem variar significativamente em relação à espécie, estação, temperatura e estágio de desenvolvimento ou ciclo reprodutivo (NRC, 2011).

5. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos sugere-se o uso de dietas com 10% de EE para melhor ganho de peso, taxa de crescimento específico e gordura corporal de girinos de rã-touro, o que equivale à inclusão de 7% de óleo de peixe ou de girassol.

Melhor assimilação do ácido graxo C18:2n6 (linoleico) ocorreu com a inclusão de 6% de óleo de peixe e principalmente com o óleo de girassol.

6. Referências Bibliográficas

- Albinati, R.C.B., Lima, S.L., Donzele, J.L., 2001. Níveis de energia digestível na ração de girinos de rã-touro. Rev. Bras. Saúde Prod. An. 2(2), 48-52.
- AOAC, 2016. Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 20. ed. Gaithersburg: AOAC.
- AOCS (American Oil Chemists Society), 2016. Official Procedure, Approved Procedure Am 5-04, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. Urbana, IL.
- Arzel, J., Lopez, F.X.M., Métailler, R., Stéphan, G., Viau, M., Gandemer, G., Guillaume, J., 1994. Effect of dietary lipid on growth performance and body composition of brown trout (*Salmo trutta*) reared in seawater. Aquaculture 123 (3-4), 361-375.
- Boyd, C.E., Tucker, C.S., 2012. Pond Aquaculture Water Quality Management. Netherlands: Kluwer Academic Publishers 2012. 700p.
- Cook, H.W., 1996. Fatty acid desaturation and elongation in eukaryotes. In: Vance, D.E. and Vance, J.E. (Eds), Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Amsterdam, Elsevier Science, pp. 129–152.
- Cribb, A.Y.; Afonso, A.M.; Mostério, C.M.F. Manual Técnico de Ranicultura. Brasília: Embrapa, 2013. 73p.
- Etheridge, R.D., Pesti, G.M., Foster, E.H., 1998. A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. Anim. Feed Sci. Technol. 73, 21-28.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-509.
- Francis, D.S., Peters, D.J., Turchini, G.M., 2009. Apparent in vivo Δ -6 desaturase activity, efficiency, and affinity are affected by total dietary C18 PUFA in the freshwater fish Murray cod. J. Agric. Food Chem. 57, 4381-4390.
- Garcia, A.S., Gonçalves, L.U., Cavalli, R.O., Viegas, E.M.M., 2012 Lipídios: Níveis ótimos de lipídios em dietas para peixes. In Fracalossi, D.M. e Cyrino, J.E.P., Ed(s). Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de

- interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p. 79-99.
- Gosner, K. L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16, 183-190.
- Higgs, D.A., Dong, F.M., 2000. Lipids and fatty acids. In: Stickney, R.R. (Ed), *Encyclopedia of Aquaculture*. New York, John Wiley, pp.476–496.
- Ishizuya-Oka, A., Hasebe, T., Shi, Y.B., 2010. Apoptosis in amphibian organs during metamorphosis. *Apoptosis* 15(3), 350-364.
- Jordão Jr, A.A., Chiarello, P.G., Bernardes, M.S.M., Vannucchi, H., 1998. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina (Ribeirao Preto)*, 31, 434-449.
- Kitson, F. G., Larsen, B. S., McEwen, C. N., 1996. Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide, Academic Press, EUA. 381p.
- Koroleff, F., 1976. Determination of nutrients. In: *Methods of sea water analysis*. Ed. K. Grasshoff. Verlag Chemie, Weinheim, 117-181.
- Lee, S.M., Jeon, I.G., Lee, J.Y., 2002. Effects of digestible protein and lipid levels in practical diets on growth, protein utilization and body composition of juvenile rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Aquaculture* 211(1), 227-239.
- Mansano, C.F.M., Stéfani, M.V., Pereira, M.M., Macente, B.I., 2013. Deposição de nutrientes na carcaça de girinos de rã-touro. *Pesq. Agropec. Bras.* 48(8), 885-891.
- Mansano, C.F.M., Stéfani, M.V., Pereira, M.M., Nascimento, T.S.R., Macente, B.I., 2014. Morphometric growth characteristics and body composition of bullfrog tadpoles in captivity. *Semina Ciênc. Agrár.* 35(5), 2817-2830.
- Mollan, T.A., Tonheim, S.K., Hamre, K., 2008. Pre-hydrolysis improves absorption of neutral lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae. *Aquaculture* 275, 217-224.
- Morais, S., Koven, W., Rønnestad, I., 2005. Dietary protein/lipid ratio affects growth and amino acid and fatty acid absorption and metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) larvae. *Aquaculture* 246, 347-357.
- NRC (National Research Council), 2011. Nutrient requirements of fishes. Washington: National Academy Press, 242p.

- Pezzato, L.E., 1997. O estabelecimento das exigências nutricionais das espécies de peixes cultivadas. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1, 1997, Piracicaba. Anais... Campinas: CBNA, p.45-62.
- Pezzato, L.E., 1999. Alimentação de Peixes - Relação custo e benefício. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34, 1999, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.109-118.
- Pinto, D.F.H., Mansano, C.F.M., Stéfani, M.V., Pereira, M.M., 2015. Optimal digestible protein level for bullfrog tadpoles. *Aquaculture*. 440, 12-16.
- Sargent, J.G., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids, In: Halver, J. E.; Hardy, R. W. (Eds.), *Fish Nut.*, 3rd edition. Academic Press, SD – EUA, p. 181-257.
- SAS. Statistical Analysis System, 2014. SAS Institute Inc.. Cary. NC. USA.
- Scott, D.E., Casey, E.D., Donovan, M.F., Lynch, T.K., 2007. Amphibian lipid levels at metamorphosis correlate to post-metamorphic terrestrial survival. *Oecologia*. 153(3), 521-532.
- Secco, E.M., Stéfani, M.V., Vidotti, R.M., 2005. Apparent digestibility of different ingredients in diets for bullfrog *Rana catesbiana* tadpoles. *J. World Aquacult. Soc.* 36, 135-140.
- Seixas Filho, J., Navarro, R., Pereira, M., Mello, S., Lanna, E., Lima, J., 2012. Desempenho zootécnico de girinos de rã-touro com diferentes níveis de proteína e energia digestíveis. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 13(4), 1112-1120.
- Seixas Filho, J.T., Pereira, M.M., Mello, S.C.R.P., 2017. Manual de Ranicultura para o Produtor. Rio de Janeiro, Ed. H.P. Comunicação, 155 p.
- Sipaúba-Tavares, L.H., Leite, J.C.de M., Stéfani, M.V. 2008. Comportamento alimentar e qualidade da água em tanques de criação de girinos de rã-touro *Lithobates catesbeianus*. *Acta Sci. Anim. Sci.* 30(1), 95-101.
- Solomon, R.J., Taruwa, S.M., 2011. The growth comparison of two catfishes (*Gariiepinus* and *Heteroclaris*). *Nat. Sci.* 9, 138-148.
- Stowell, S.L., Gatlin, D.M., 1992. Effects of dietary pantethine and lipid levels on growth and body composition of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 108(1-2), 177-188.

- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fisheries Sci.* 11, 107-184.
- Tocher, D.R., Fonseca-Madrigal, J., Dick, J.R., NG, W., Bell, J. G., Campbell, P.J., 2004. Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Phys.* 137B, 49-63.
- Turchini, G.M., Ng, W.K., Tocher, D.R., 2010. (Eds.) Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds. CRC Press. 551p.
- Wright, M.L., Richardson, S.E., Bigos, J.M., 2011. The fat body of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles during metamorphosis: changes in mass, histology, and melatonin content and effect of food deprivation. *Comp. Biochem. Phys.* 160(4) A, 498-503.
- Zhang, C.X., Huang, K.K., Lu, K.L., Wang, L., Song, K., Zhang, L., Li, P., 2016. Effects of different lipid sources on growth performance, body composition and lipid metabolism of bullfrog *Lithobates catesbeiana*. *Aquaculture* 457, 104-108.
- Zheng, X., Tocher, D.R., Dickson, C.A., Bell, J.G., Teale, A.J., 2004. Effects of diets containing vegetable oil on expression genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic fish (*Salmo salar*). *Aquaculture* 236, 467-483.