

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Avaliação de métodos de coleta,
centrifugação e manejo pré-coleta de fezes
em estudos de digestibilidade para o
tambaqui.**

Rudney Weiber Silva de Assis

**Jaboticabal, São Paulo
2016**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Avaliação de métodos de coleta,
centrifugação e manejo pré-coleta de fezes
em estudos de digestibilidade para o
tambaqui.**

Rudney Weiber Silva de Assis

Orientador: Dr. Dalton José Carneiro

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura do Centro de
Aquicultura da UNESP –
CAUNESP, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre.**

**Jaboticabal, São Paulo
2016**

A848a Assis, Rudney Weiber Silva de
Avaliação de métodos de coleta, centrifugação e manejo pré coleta
de fezes em estudos de digestibilidade para o tambaqui / Rudney
Weiber Silva de Assis. – – Jaboticabal, 2016
xii, 53 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Dalton José Carneiro

Banca examinadora: Eduardo Gianini Abimorad, João Batista
Kochenborger Fernandes.

Bibliografia

1. *Colossoma macropomum* 2. Dissecção 3. Frequência alimentar
4. Intervalos de coleta 5. Método de Guelph modificado I. Título. II.
Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a quem tem me proporcionado até o dia de hoje vida, saúde, boas amizades, oportunidades de aprendizado... Ao meu melhor amigo e grande DEUS!

AGRADECIMENTOS

Foram dois anos muito intensos de aprendizado e conquistas. Os agradecimentos serão sempre incansáveis e infindáveis por todos os que contribuíram por mais uma etapa que se conclui em minha vida. O meu maior e mais profundo agradecimento não poderia deixar de ser para meu maior e melhor amigo, meu grande Deus. A ele eu agradeço a todas as vezes que recorri em oração quando o meu desejo de desistência e saudade batia forte, a Ele eu agradeço a todas as vitórias e derrotadas advindas destes dois anos de aprendizado. É por Ele que consegui, porque “todas as coisas contribuem para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito”!

Agradeço também pelo privilégio de ter uma família em que o suporte nos dias fáceis, e principalmente nos difíceis foi farto e constante. Agradeço pela força e estabilidade do meu pai, que sempre com suas palavras de conforto e ânimo me conduziam ao término desta etapa. A minha querida e amada mãe que foi fundamental e insubstituível para mim, sempre me ouvindo e chorando junto comigo, me dando força e mesmo longe me abraçando e me acalentando com todas as mensagens matinais... A meu irmão e minha cunhada que sempre me alegraram nos dias de saudade e oraram por mim, meu sincero agradecimento.

A minha família do coração, que me adotaram como filho e que tenho o maior orgulho de chamar de família, nas pessoas de Marihelp e Jovem, Renato e Miriam. Sei que vocês são a prova do cuidado e amor de Deus por mim, por toda a vida serei grato por tudo que fazem.

Agradeço ao meu orientador, Professor Dalton José Carneiro pela disponibilidade em me orientar, me ensinando e sempre se apresentando disponível em todos os momentos da minha pesquisa. A todos os meus colegas que compuseram o Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos no período em que estive desenvolvendo a minha pesquisa. Em especial ao meu amigo Juliano Coutinho em sempre me ajudar e nunca me deixar sozinho nos momentos cruciais do desenvolvimento da pesquisa. A amizade continuará sempre, afinal o cric e o croc não se separam rs... Muito obrigado, meu amigo! Também a minha

amiga Thyssia Bomfim, por me ajudar a enxergar que tudo passa e que o que somos é muito mais importante do que temos ou do que passamos!

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões realçando e aperfeiçoando ainda mais a utilidade do meu trabalho, tanto na qualificação como na defesa.

Aos meus eternos professores, Edma Miranda e Daniel Magalhães, que, juntamente com Ranielle Rocha, hoje são meus insubstituíveis amigos, sempre me auxiliando e me orientando a tomar as melhores decisões e caminhos mais acertados. Vocês são pra vida toda!

Ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) – Campus de Jaboticabal – SP (Brasil), pela oportunidade de realização deste trabalho. Ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do CAUNESP, por possibilitar o crescimento acadêmico e intelectual na área de aquicultura.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior pela concessão da bolsa.

Por fim, a todos aqueles, que de alguma forma, participaram de minha formação e sempre me incentivaram na minha caminhada, aqui omitidos, porem não esquecidos. Meu muito obrigado!

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	I
Lista de Figuras.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Capítulo 1 - Considerações Iniciais.....	1
1 – Introdução Geral.....	1
2 - Considerações sobre a espécie.....	2
3 - Estudos de digestibilidade.....	4
2- Objetivos.....	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos.....	13
Referências.....	14
Capítulo 2 - Avaliação de método de coleta, centrifugação e manejo pré-coleta de fezes sobre em estudos de digestibilidade para o tambaqui.....	23
1 – Introdução.....	23
2 - Material e Métodos.....	26
2.1 Material Biológico e Manejo.....	26
2.2 Dietas.....	27
2.3 Digestibilidade de nutrientes.....	28
2.4 Análises Químico-bromatológicas.....	29
2.5 Avaliações Estatísticas.....	30
2.6 Ensaio I – Frequência Alimentar.....	30
2.7 Ensaio II – Tempo e velocidade de centrifugação das fezes de tambaqui para determinação da digestibilidade da proteína e energia.....	31
2.8 Ensaio III – Intervalo na coleta de fezes.....	33
3 - Resultados e discussão.....	34
3.1 Ensaio I – Frequência Alimentar.....	34
3.2 Ensaio II –Tempo e velocidade de centrifugação das fezes de tambaqui para determinação da digestibilidade da proteína e energia.....	38
3.3 Ensaio III – Intervalos de Coleta.....	42
4 - Conclusões.....	46
Referências.....	47

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 – Avaliação de método de coleta, centrifugação e manejo pré-coleta de fezes sobre a estimativa dos coeficientes de digestibilidade aparente para o tambaqui.

Tabela 1 - Composição percentual e próxima da ração experimental.....	Página 28
Tabela 2 - Médias para a quantidade de fezes nas diferentes estratégias de alimentação.....	34
Tabela 3 - Concentração de óxido de cromo III, nutrientes e coeficientes de digestibilidade aparente das fezes submetidas a diferentes tratamento de centrifugação.....	38
Tabela 4 - Médias para os tempos de rotação e centrifugação das fezes, como também da interação entre os parâmetros.....	41
Tabela 5 - Interação entre tempo e rotações de centrifugação sob a concentração de óxido de cromo III, proteína bruta, energia bruta e CDA da PB e CDA da EB.....	42
Tabela 6 - Coeficientes de digestibilidade aparente da proteína, energia, concentração de proteína, da energia das fezes e proteína do sobrenadante sob diferentes intervalos de coleta.....	43

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2 – Avaliação de método de coleta, centrifugação e manejo pré-coleta de fezes sobre a estimativa dos coeficientes de digestibilidade aparente para o tambaqui.

	Página
Figura 1 – Coletores de fibra de vidro de acordo com o sistema de Guelph modificado.....	29
Figura 2 – Coleta por decantação, coleta por dissecação e fezes secas.....	32

RESUMO

O estudo teve como objetivo obter informações sobre métodos de coleta e processamento de fezes para elaboração de um protocolo em estudos de digestibilidade de proteína e energia para o tambaqui com peso médio de 230,74g, através da determinação da melhor frequência alimentar pré-coleta de fezes; da avaliação do efeito da centrifugação de fezes do tambaqui e da determinação do melhor tempo de coleta de fezes. O ensaio sobre adequação da frequência alimentar foi dividido em fase diurna (peixes alimentados com diferentes frequências: 08:00 e 18:00; 8:00, 13:00 e 18:00; 08:00, 11:20, 14:40 e 18:00) e fase noturna (20:00 e 06:00; 20:00, 01:00 e 06:00; 20:00, 23:20, 02:40 e 06:00). Nos dois casos (período diurno e noturno), as fezes foram coletadas a cada duas horas. O parâmetro de avaliação utilizado para determinação da melhor frequência alimentar foi o volume de fezes na matéria seca. O ensaio do efeito da centrifugação foi realizado por meio da determinação dos melhores tempos e rotações de centrifugação das fezes em um delineamento com nove tratamentos seguindo um esquema fatorial 3 X 3 constituído por três velocidades de rotação (3000, 4500 e 6000 RPM) e três tempo de centrifugação (10, 20 e 30'), acrescidos de dois tratamentos testemunhas: coleta de fezes por decantação sem centrifugação e coleta de fezes por dissecação da região final do trato digestório. O parâmetro de avaliação utilizado para determinação da melhor resposta foi a concentração do marcador, da proteína e da energia como também dos seus coeficientes de digestibilidade. Para o ensaio de intervalos de coleta de fezes foram considerados cinco tratamentos: 1h; 2h; 4h; 8h e 12h, com três repetições. O parâmetro de avaliação da melhor resposta foi a concentração da proteína e energia nas fezes, e também os seus coeficientes de digestibilidade. Conclui-se que não houve efeito das diferentes frequências de alimentação sobre o volume de matéria seca das fezes, possivelmente pela capacidade do tambaqui em armazenar alimento por um tempo relativamente longo. De uma forma geral, não há maior acurácia na coleta de fezes com centrifugação, podendo ainda ser observado prejuízo dos coeficientes ao longo do aumento, tanto do tempo como da velocidade de rotação na centrifugação, favorecendo a lixiviação. Os diferentes intervalos de tempo entre coletas de fezes de uma à 12h, pelo método de decantação, não influenciaram na lixiviação dos nutrientes.

Palavras Chave: *Colossoma macropomum*, dissecação, frequência alimentar, intervalos de coleta, método de Guelph modificado.

ABSTRACT

The study aimed to obtain information on methods of collection and processing of feces to prepare a protocol on protein and energy digestibility studies for tambaqui with average weight of 230,74g, by determining the best food pre-collection of stool frequency; assessing the effect of spin tambaqui feces and determining the best time to collect feces. The test of adequacy of food frequency was divided into daytime phase (fishes fed with different frequencies: 08:00 and 18:00, 8:00, 13:00 and 18:00, 08:00, 11:20, 14:40 and 18:00) and night phase (20:00 and 06:00, 20:00, 01:00 and 06:00, 20:00, 23:20, 02:40 and 06:00). In both cases (daytime and nighttime), the feces were collected every two hours. The evaluation parameter used to determine the best feed rate was the amount of stool in the dry matter. The test of the effect of centrifugation was performed by determining the best for determining the best time and feces spin speed was lined with nine treatments following a factorial 3 X 3 comprises three rotation speeds (3000, 4500 and 6000 RPM) and three centrifugation time of stool (10, 20, and 30'), plus two treatments witnesses: feces collection by decantation without centrifuging and collecting stool by dissecting the final region of the digestive tract. The evaluation parameter used to determine the best response was the concentration of the marker protein and energy as well as its digestibility. For testing stool collection intervals were considered five treatments: 1h; 2h; 4h; 8h and 12h, with three replications. The best answer evaluation parameter was the concentration of protein and energy in the stool, and also their digestibility. It was concluded that there was no effect of different feeding frequencies on the volume of dry matter of feces, possibly tambaqui's ability to store food for a relatively long time. In general, no greater accuracy in collecting stool with centrifugation, and may be observed loss coefficients over increasing both the time and the speed of rotation in centrifugation, favoring leaching. The different time intervals between fecal samples from one to 12 hours, the sedimentation method, did not influence the leaching of nutrients.

Key-words: *Colossoma macropomum*, dissection, food frequency, collection intervals, modified Guelph method.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Introdução Geral

A criação rentável de peixes, dentre outros pontos, depende de dietas que atendam as necessidades nutricionais do animal, sendo aceitas em quantidades adequadas para assegurar um crescimento ótimo (CHO et al, 1985). Logo, o fornecimento de uma boa dieta balanceada e um adequado manejo alimentar são de fundamental importância para peixes criados em cativeiro (HEPHER, 1988; LOVELL, 1988; TACON, 1987).

Em consequência da expansão da piscicultura, houve a necessidade da utilização de dietas completas; portanto, o estudo da composição química do alimento e a digestibilidade de seus componentes para as espécies se tornou indispensável para a determinação das exigências nutricionais e dos níveis de inclusão de um determinado alimento na dieta (ARAUJO, 2010).

Já é estabelecido o conhecimento das exigências nutricionais de espécies de peixes exóticos de clima temperado de interesse para aquicultura. Espécies como o bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), carpa comum (*Cyprinus carpio*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), entre outras, têm suas exigências bem estudadas (GUILLOU-COUSTANS et al., 1998; LI e ROBINSON, 1999; LOVELL, 2000). Entretanto, as exigências nutricionais de espécies de peixes tropicais são orientadas segundo o manual “Nutrient Requirements of Fish” (National Research Council, 2011), baseadas em peixes de clima temperado.

Devido ao conhecimento ainda limitado sobre as exigências nutricionais dos peixes tropicais, as dietas disponíveis no mercado para a maioria das espécies muitas vezes não estão perfeitamente balanceadas (ARBELÁEZ-ROJAS et al., 2002). Para que haja um aumento de produtividade, almejada por todos, faz-se necessário que as dietas balanceadas ofereçam os nutrientes necessários para atender as exigências nutricionais dos peixes (ARAUJO, 2010).

Estudos recentes tem demonstrado que a dieta influencia o comportamento, a integridade estrutural, a saúde, a reprodução, as funções fisiológicas e o crescimento dos peixes TAKAHASHI (2003). Para que se possa

aperfeiçoar a relação custo/benefício de um sistema de cultivo, é necessário considerar os aspectos qualitativos e quantitativos da alimentação (PEREIRA FILHO, 1995).

Devido aos custos com alimentação e da importância do tambaqui para aquicultura brasileira, o conhecimento das exigências nutricionais é fundamental para envidar esforços na elaboração de dietas balanceadas que permitam máxima resposta produtiva, tendo como fim, proporcionar saúde aos peixes e minimizar impactos ambientais, como lixiviação de nutrientes para o meio (DAIRIKI e SILVA, 2011). Dietas balanceadas, formuladas a partir de insumos de alta qualidade, apresentam menor potencial poluidor, possibilitando acréscimo de produção por unidade de área, o que resulta em incremento da receita líquida obtida por área de cultivo (ROUBACH e SAINT PAUL., 2003). Desta forma, produzir peixes torna-se uma atividade mais eficiente, porque as dietas fornecem a nutrição total exigida para o crescimento adequado, para a saúde dos peixes e para a manutenção das funções fisiológicas do organismo, diminuindo desperdícios de nutrientes para o meio, que levariam a uma piora da qualidade da água e ineficiência da produção (KUBITZA, 1998).

2. Considerações sobre a espécie

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (CURVIER, 1818) é um peixe teleósteo, de água doce, da classe Osteichthyes, subclasse Actinopterygii, ordem Characiformes da família dos Characidae e sub família Serrassalminae (GÉRY, 1977). Peixe de piracema que tem sua distribuição na parte tropical da América do Sul e na Amazônia Central, encontrado naturalmente nas bacias dos Rios Amazonas, Solimões e Orinoco. É um peixe onívoro com tendência a herbívoro, frugívoro e zooplantófago (HONDA, 1974). A sua grande produção baseia-se no fato de ser uma espécie com fácil adaptação alimentar, tendo ótima capacidade de digestão de proteína de origem vegetal (NUNES et al.,2006). Possui uma elevada eficiência na conversão de proteínas da dieta em peso corporal e em proteína depositada no tecido muscular (MEURER e ZANIBONI FILHO, 1997).

Expressa alto potencial de produção, pois apresenta boa aceitação da ração artificial, tem crescimento rápido e boa resistência ao manejo. Exterioriza

também alto crescimento compensatório quando passa a ser alimentado à vontade, após um período de privação alimentar (ITUASSU et al., 2004). É o segundo maior peixe de escamas do Brasil, (KUBITZA, 2004), ficando atrás apenas do pirarucu, *Arapaima gigas*, (FISHBASE, 2013), sendo a principal espécie da Amazônia cultivada no país. Está incluso no grupo de peixes redondos, juntamente com a pirapitinga, o pacu e seus híbridos (PAULA, 2009).

Dentre alguns critérios, atribui-se a popularidade do tambaqui à ótima reprodução em cativeiro, rápido crescimento, facilidade da produção de alevinos, resistência às doenças e adaptando-se às elevadas temperaturas de água nos viveiros (ARAÚJO-LIMA e GOMES, 2005; PORTO, 2005). É reproduzido por indução hormonal, podendo, as fêmeas, produzirem milhares de ovos em uma única desova total (VIEIRA et al, 1999; SEVILLA e GUNTHER, 2000).

Tem capacidade adaptativa às condições adversas, como a hipóxia. Nessas condições, o tambaqui apresenta uma adaptação morfológica, que consiste no aumento do lábio inferior, conhecido popularmente como aiú, que é uma característica inerente da espécie (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995; GOMES et al., 2006). O animal aproxima-se da superfície para melhor captação de oxigênio, eleva suas frequências respiratória e cardíaca, aumenta a afinidade da hemoglobina por oxigênio e decresce sua taxa de crescimento, reduzindo seu metabolismo. (VAL e ALMEIDA-VAL, 1995; MARCON e WILHELM FILHO, 1999; ARAUJO-LIMA e GOMES, 2005).

Mesmo alcançando preços relativamente altos (VILELA, et al., 2013), a procura e a demanda pelo animal são permanentes, pois além de ser uma carne muito apreciada, tem vida útil de 43 dias, se conservada de forma correta, entre camadas de gelo (ALMEIDA et al., 2006).

Observa-se, através de dados estatísticos desde 1994, um aumento contínuo da produção do tambaqui, partindo de 8 mil toneladas e atingindo 88 mil toneladas em 2013 (IBGE, 2013). Entre os anos de 2003 e 2009, a produção cresceu 123%, com taxa média anual de 14% (BRASIL, 2010). Também é uma das espécies de peixes que tem um dos mais altos valores comerciais e tendo grande importância econômica e social da América Latina (SILVA et al., 2007).

Para cada cinco tambaquis consumidos, quatro são provenientes da aquicultura ou produção em cativeiro (JACOMETO et al., 2010).

Ainda que esta espécie tenha um alto potencial de produção e que seja muito apreciada pelo mercado consumidor, apresentando alto rendimento (70 a 72%) do principal corte comercial, com e sem espinhos (RUIVO, 1998), poucos são os trabalhos elucidando questões que ainda são incógnitas na produção deste peixe, como por exemplo, referentes à nutrição (MACEDO et al., 1981; SALDANÃ e LÓPEZ, 1988; PERÉZ, 2000) manejo alimentar, reprodutivo e também o comportamento desta espécie a determinados meios de cultivo. Desta maneira, o estudo da nutrição de espécies neotropicais, especialmente a do tambaqui, torna-se indispensável para manutenção e crescimento do consumo dessa fonte proteica, engrandecida por toda a população mundial.

3. Estudos de digestibilidade

A digestibilidade é a fração do alimento consumido que desaparece através da absorção no trato digestivo e que não estará presente nas fezes; resumidamente, é a diferença entre os nutrientes ingeridos na dieta e os excretados, trata-se da capacidade do animal em digerir os nutrientes e energia contida nos alimentos. O cálculo da fração do alimento que é aproveitado pelo animal é expresso através de coeficientes de digestibilidade (ANDRIGUETTO et al., 1999).

Vários fatores influenciam a digestibilidade do alimento, como composição, tempo de transito gastrintestinal, atuação das enzimas digestivas sobre o bolo alimentar, dentre outros. Podem existir ainda fatores secundários, como espécie, idade, condições fisiológicas do animal, temperatura da água, frequência e taxa de arraçãoamento (HEPHER, 1988).

O conhecimento da digestibilidade das dietas é de extrema importância para o entendimento das exigências nutricionais de determinada espécie, pois a ausência destes dados impossibilita conhecer o real aproveitamento dos nutrientes contidos em uma determinada dieta, o que pode levar a excesso ou carência de qualquer nutriente, incrementando os custos de produção e/ou produzindo dietas menos eficientes (GONÇAVES e CARNEIRO, 2003).

UTNE (1978) já considerava que o principal obstáculo na estimativa da digestibilidade de nutrientes para peixes é o método de coleta de fezes e sua padronização. FURUYA (2010) afirmou que no Brasil, pesquisas têm sido conduzidas com o intuito de padronizar as metodologias de digestibilidade em peixes, quer sejam estudando marcadores ou formas de coleta de fezes; porém, é preciso salientar que ainda são poucos os trabalhos e poucas as espécies estudadas para este fim.

Atualmente, várias são as metodologias existentes para a coleta de fezes em estudos de nutrição com peixes. Segundo SALLUM (2000), o desenvolvimento destas metodologias visa, dentre outras coisas, diminuir ou, quando possível, evitar situações de estresse dos animais pelo manuseio, como nos métodos de pressão abdominal (INABA et al., 1962; NOSE, 1967; AUSTRENG, 1978; WINDEIL et al., 1978; VENS-CAPPEL, 1985), sucção anal (LOVELL, 1977; WINDELL et al., 1978), alimentação forçada ou contenção metabólica (SMITH et al., 1971), como também o sacrifício dos animais, como no método de dissecação intestinal (AUSTRENG, 1978) e ainda a lixiviação de nutrientes e de energia, como no método de Guelph através da decantação (CHO et al. 1985). Todos os métodos de coleta de fezes existentes apresentam vantagens e desvantagens, particularmente em relação à forma da coleta da amostra e da natureza representativa das fezes recolhidas.

Dentre os métodos mais utilizados em peixes, o método indireto de determinação de digestibilidade é o preferido, pois o meio aquático dificulta a coleta total de fezes, assim como a quantificação do alimento ingerido (MORALES et al., 1999) e a lixiviação pode ser altamente significativa no método indireto por decantação, quando grandes instalações são utilizadas para a manutenção destes peixes, devido à distância que os excrementos teriam de percorrer na água, antes que pudessem ser recolhidos por decantação ou remoção física (ABIMORAD e CARNEIRO, 2004). Assim, para empregar o método de coleta parcial, é necessário o uso de indicador inerte na dieta. KLONTZ (1995) afirmou que o uso de indicadores proporciona significativamente uma redução no estresse dos peixes, conseqüentemente, melhora nos resultados. O óxido de cromo-III é geralmente o indicador inerte mais utilizado em experimentos para a determinação da digestibilidade aparente em peixes (SMITH e LOVELL, 1973;

NRC, 1993; DEGANI et al., 1997), que é o balanço do alimentos na passagem através do trato digestivo menos as fezes (VAN SOEST, 1983).

No método de dissecação, onde o peixe é previamente anestesiado e sacrificado, realizando-se um corte longitudinal sob sua cavidade abdominal, para a coleta do conteúdo fecal na parte terminal do intestino, o principal problema é que o material fecal tem a possibilidade de se redistribuir no trato intestinal após a eutanásia, passando o material mais digerido para a porção anterior do intestino (DELMONDES e BOMFIM, 2004). O método de extrusão manual descrito por AUSTRENG (1978) e citado por ABIMORAD e CARNEIRO (2004), se dá através de massagem abdominal, desde as nadadeiras ventrais até o ânus, após prévia anestesia do peixe.

O sistema de Guelph convencional, desenvolvido por CHO et al. (1985) e bastante utilizado em experimentos com peixes, consiste em tanques que apresentam fundo inclinado ou até afunilado com sistema de drenagem comum a uma única coluna de água para decantação das fezes (DELMONDES e BOMFIM, 2004), sendo encaminhadas pelo fluxo de água até a região de coleta; este fluxo de água pode ser ajustado para maximizar a recuperação das fezes na coluna de decantação e minimizar a sua sedimentação ao longo da tubulação (CHO et al., 1985; BELAL, 2005). Neste sistema, existe uma grande possibilidade de lixiviação do material fecal, que consequentemente pode mascarar os resultados encontrados dos coeficientes de digestibilidade (CHO et al., 1985; ALLAN et al., 2000).

O sistema de Guelph modificado é semelhante ao sistema convencional de Guelph, apresentando tanques com fundo afunilado com sistema de drenagem de água, porém a mudança entre os mesmos está no percurso em que as fezes fazem até serem coletadas, e o sistema de escoamento da água. Diferentemente do sistema tradicional de Guelph, onde as fezes são encaminhadas ao local de coleta através do fluxo da água, as fezes são decantadas no próprio tanque de fundo cônico, diminuindo, teoricamente, fatores que possam influenciar a lixiviação do material. Para facilitar, são colocados registros de água que são fechados no momento da coleta (ABIMORAD e CARNEIRO, 2004; SAKOMURA e ROSTAGNO, 2007).

ABIMORAD e CARNEIRO (2004) estudaram os métodos de Guelph convencional, Guelph modificado, extrusão manual e dissecação do conteúdo do reto. Concluíram que todos os métodos podem ser utilizados para determinação dos coeficientes de digestibilidade para a fração proteica dos alimentos para o pacu, porém os métodos devem ser conduzidos com muita segurança, tomando todos os cuidados necessários.

Nas técnicas de coleta de fezes com os peixes dentro da água, a lixiviação de materiais para a água é o único erro importante, acarretando na maior estimativa da digestibilidade (PERCIVAL et al., 2001). Estes mesmos autores estudaram a metodologia para coleta de fezes através da sucção anal (LOVELL et al., 1977; WINDELL et al., 1978; BROWN et al., 1992), utilizando uma cânula que era introduzida no ânus do peixe previamente anestesiado, fazendo uma leve sucção, através de seringa para coleta fecal na região posterior do intestino. A manipulação excessiva dos peixes pode provocar grande estresse, havendo coleta dos fluídos e/ou epitélio intestinal, além de material não digerido ou não absorvido (DELMONDES e BOMFIM, 2004).

A determinação de um método de coleta de fezes eficiente e que demonstre os valores reais de digestibilidade dos nutrientes não tem só importância na piscicultura, e sim para todos os organismos aquáticos, como relatado por MOURIÑO e STEFANI (2006), que trabalharam com diferentes métodos de coleta de fezes para determinação da digestibilidade proteica para rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Portanto, as técnicas de coleta de fezes podem afetar os resultados do coeficiente de digestibilidade aparente (CDA). WINDELL et al. (1978) e VENS-CAPPELL (1985), trabalhando com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), e ABIMORAD e CARNEIRO (2004), trabalhando com pacu (*Piaractus mesopotamicus*), demonstraram claramente que os valores de digestibilidade para determinados nutrientes podem variar de acordo com o método de coleta de fezes, exceto para proteína.

Desta forma, o método mais adequado para a coleta de fezes e todos os pré-requisitos que estão relacionados a esta técnica, exigem atenção e precisão em experimentos de digestibilidade, para que se obtenha o mais próximo possível de exatidão e confiabilidade nos resultados (AUSTRENG, 1978; SMITH et al., 1980).

Para estudos relacionados com nutrição, são necessários conhecimentos básicos de biologia e comportamento da espécie (KUBITZA, 1998). Neste aspecto, dois fatores são importantes para a nutrição da espécie: níveis de arraçoamento e frequência alimentar. A frequência alimentar é um fator importante dentro do manejo alimentar por estimular os peixes a procurar pelo alimento num momento determinado, podendo contribuir para a melhora na conversão alimentar, incrementando no ganho em peso (CARNEIRO e MIKOS, 2005). Porém, poucos são os trabalhos que avaliaram o manejo alimentar pré-coleta de fezes tendo como finalidade o melhor volume de fezes coletado em trabalhos de digestibilidade. Segundo WANG et al. (1998) e THOMASSEN e FJAERA (1996) o consumo de ração aumenta na medida em que se eleva o número de arraçoamentos, portanto é imprescindível um manejo alimentar pré-coleta de fezes adequado. O manejo alimentar diário correto é de grande importância para o ajuste adequado da quantidade e da frequência de alimentação, evitando que os animais consumam grandes quantidades em cada refeição, melhorando a eficiência de assimilação do alimento (RABE e BROWN, 2000; LUZ e PORTELLA, 2005). Também uma frequência de alimentação correta pode influenciar positivamente na padronização do tamanho dos peixes, facilitando o manejo e uma futura comercialização.

Tilápias do Nilo alimentadas com maior frequência (8, 17 e 22 horas no dia anterior a coleta e 8 horas no dia da coleta) apresentaram quase o dobro da quantidade de fezes, apesar de não haver diferenças significativas, com aquelas de menor frequência (8 e 17 horas no dia anterior a coleta e 8 horas no dia da coleta) (VICTORELLI, 2010). Avaliando frequência alimentar através de parâmetros de produção, VAN DER MEER et al. (1997) em trabalhos com o tambaqui, distribuindo suas refeições de 1 a 5 vezes por dia, até a aparente saciedade, puderam verificar que as frequências mais altas resultaram em maior taxa de crescimento e consumo de alimento. THOMASSEN & FJAERA (1996) observaram em salmão do Atlântico, *Salmo salar*, aumento no consumo de alimento e melhor crescimento associado à acentuação da frequência alimentar.

Segundo CARNEIRO e MIKOS (2005), dentre fatores importantes para a determinação da melhor frequência de alimentação está à melhoria da produção e produtividade final do cultivo, com redução da conversão alimentar e aumento no

ganho em peso. O conhecimento dos níveis ideais deste parâmetro pode auxiliar no estabelecimento de um protocolo alimentar mais adequado para peixes (MHELAKAKIS et al., 2002; PUVANENDRAN et al., 2003). Trabalhos com níveis de arração e frequências alimentares no desempenho produtivo de peixes são poucos. Desta forma, há uma necessidade de se conhecer o efeito de diferentes níveis de arrações e frequências alimentares para as variadas espécies de peixe e fases de crescimento.

Métodos que contam com a coleta de fezes na água são propensos a superestimativas do CDA como resultado da lixiviação dos nutrientes a partir das fezes (SMITH et al., 1980; BROWN e ROBINSON, 1989; SPYRIDAKIS et al., 1989; HAJEN et al., 1993). Com o intuito de diminuição desta lixiviação, são estudados alguns procedimentos são utilizados como alternativas, dentre eles a centrifugação das fezes e diferentes intervalos de coleta da amostra.

Estudos desenvolvidos por PEZZATO et al. (2002) com o intuito de avaliar os métodos de decantação e dissecação para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente para tilápia no Nilo, centrifugaram as fezes coletadas pelo método de decantação a uma rotação de 10.000 rpm por 20 minutos, mesmo procedimento adotado também por SILVA (2012) avaliando a inclusão de farelo de amendoim para a mesma espécie. Porém os autores não relacionam aos resultados encontrados alguma influência da centrifugação das fezes, sendo um procedimento comumente utilizado pelos autores para o processamento das amostras. PIMENTA et al. (2011) e OLIVEIRA (2006) também não associaram os resultados encontrados com qualquer influência da centrifugação quando esta foi utilizada como parte do processamento das amostras fecais em trabalhos de digestibilidade numa velocidade de 4200 rpm por 8 minutos a 20-22°C.

CORNÉLIO (2012), avaliando a suplementação de dois probióticos no desenvolvimento zootécnico, digestibilidade de nutrientes e resistência à infecção por patógeno em tilápias do Nilo, utilizou a centrifugação das fezes como parte da metodologia do trabalho a uma rotação de 2,296 x g por 5 minutos. KITAJIMA (2009) quando avaliou a digestibilidade da matéria seca, energia, proteína e aminoácidos pelo catfish americano, *Ictalurus punctatus*, também utilizou uma velocidade de rotação de 2,300 x g por 5 minutos. FRACALLOSSI e FILHO (2006) avaliando coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para jundiá

também utilizaram para a centrifugação das fezes uma velocidade de rotação de $2,296 \times g$, porém com um tempo menor, de 2 minutos. FURUYA et al. (2001) centrifugaram as amostras de fezes numa rotação 2100 rpm a 10 minutos como parte metodológica nos estudos de digestibilidade de para tilápia do Nilo. Portanto é possível observar na literatura que a utilização da centrifugação das fezes é um procedimento comum em trabalhos de digestibilidade, porém não existe padronização ou trabalho que avalie utilização de velocidades e tempos distintos de centrifugação para as diferentes espécies de peixes.

Avaliando intervalos de coleta de fezes que variaram entre 15 minutos até 12 horas de coleta, PEREGO (2010) utilizou a centrifugação como parte do processamento das fezes, numa rotação de 3200 rpm a 20 minutos como fator auxiliador no parâmetro de avaliação dos coeficientes de digestibilidade e menor lixiviação de nutrientes para tilápias do Nilo. Foi possível observar que não houve diferenças estatísticas significativas para o coeficiente de digestibilidade da proteína das fezes entre os diferentes tempos de coleta, isto segundo o autor está relacionado à recuperação significativa do marcador lixiviado através da centrifugação. A centrifugação, portanto, influenciou na redução da lixiviação do marcador e da proteína presente nas fezes, independentemente do intervalo de coleta. Ainda segundo o autor, a centrifugação das fezes facilitou o processo de liofilização, visto ser possível eliminar grande quantidade de água das amostras.

Na literatura, dentre os trabalhos citados que utilizaram como parte da metodologia de digestibilidade a centrifugação das amostras de fezes coletadas, é possível observar que existe pouca argumentação científica para o uso de tal método, como também justificativa para a rotação e tempo escolhidos. Desta forma, não existe na literatura uma padronização tanto para velocidade quanto para o tempo utilizado na centrifugação das fezes.

Ainda são poucos os trabalhos, principalmente no que diz respeito ao método de coleta e procedimento das amostras de fezes que minimize o efeito do ambiente aquático através da lixiviação nos dados de digestibilidade para as espécies nativas brasileiras. E dentre os procedimentos que podem influenciar a uma menor lixiviação ou até mesmo diminuir este fator está o intervalo de coleta das fezes. SATOH et al. (1992) trabalhando com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) afirmaram que o intervalo em que as fezes ficam em contato com a água

até serem coletadas tem efeito sobre a lixiviação de nutrientes. Neste contexto, CHO et al.(1982) concluíram que as fezes são mais vulneráveis à lixiviação quando os pellets fecais são quebrados durante o processo de coleta e quando o tempo de contato das fezes com a água é maior, quando intervalos entre coleta são maiores. Como tambaqui apresenta fezes de formato granular sem cobertura mucosa e que o intervalo em que as fezes ficam expostas a água desde sua excreção até a coleta pode influenciar os coeficientes de digestibilidade aparente, é possível afirmar que trabalhos de digestibilidade com esta espécie em estudo, devem ser mais cautelosos com a padronização dos intervalos de coleta das fezes.

Os coeficientes de digestibilidade dos ingredientes para trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) obtidos a partir de análises de fezes coletadas por decantação, foram cerca de 10% superiores em comparação aos obtidos analisando as fezes coletadas diretamente do peixe, indicando que alguns nutrientes foram lixiviados na água (PORTZ, 2001). O intervalo de coleta de fezes também influenciou os valores de digestibilidade de alguns nutrientes para o tambaqui, quanto maior foi o período de permanência das fezes na água, maior foram os coeficientes de digestibilidade do fósforo, por exemplo (MENEZES, 2012). Desta forma, este estudo corrobora com outros trabalhos que afirmam que o aumento da permanência das fezes na água promove maior lixiviação de compostos solúveis, aumentando desta forma o CDA dos nutrientes (BUENO, 2011; DIEMER et al., 2011; POTRICH et al., 2011).

Entretanto, resultados contrários foram observados para perca prata (*Bidyanus bidyanus*) (ALLAN et al., 1999) e truta arco-íris (SATO et al., 1992), nos quais não foi observada alteração significativa nos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, proteína e lipídeos ao longo do tempo de permanência das fezes na água. Enquanto o tambaqui apresenta fezes mais friáveis e mais predispostas à desintegração no corpo aquático, espécies como a tilápia e perca prata apresentam fezes mais bem formadas, o que reduz a lixiviação dos nutrientes das fezes na água. Este fator tem sido ressaltado em diversos estudos metodológicos com diferentes espécies de peixes (ALLAN et al., 1999; PEZZATO et al., 2002; BELAL, 2005).

VICTORELLI (2010) pôde constatar que o coeficiente de digestibilidade da proteína da dieta para tilápia sofreu influência dos diferentes intervalos de coleta das fezes, sendo menor quando o intervalo de coleta foi o de menor tempo, 45 minutos. E que a maior lixiviação não ocorre por parte dos nutrientes e sim do marcador. ABIMORAD e CARNEIRO (2004), em estudo metodológico de digestibilidade aparente para o pacu, puderam observar que à medida que se aumentava o intervalo das coletas de fezes, aumentava-se também a tendência ao crescimento dos valores dos coeficientes de digestibilidade, concluindo que o melhor intervalo de coleta foi em torno de 30 minutos. MENEZES (2012) concluiu que coletas realizadas após 2 horas apresentaram pouca variação e assim, justifica-se a utilização de até oito horas para a coleta de fezes para o tambaqui sem que haja maiores interferências no CDA da MS.

Desta forma, é necessária a determinação de um protocolo experimental que facilite a coleta de fezes de espécies importantes para a piscicultura, assim como determinar os principais fatores metodológicos que podem influenciar na determinação dos coeficientes de digestibilidade para o tambaqui.

2 - OBJETIVOS

Geral:

Obter informações sobre métodos de coleta e processamento de fezes para elaboração de um protocolo em estudos de digestibilidade de nutrientes e energia de uma dieta padrão para o tambaqui no período de crescimento (230g).

Específicos:

1. Determinar a melhor frequência alimentar pré-coleta de fezes para melhor obtenção do material para estudos de digestibilidade da espécie, através do volume de fezes coletado.
2. Avaliar o efeito da centrifugação de fezes do tambaqui para minimizar a lixiviação do cromo e dos nutrientes, através dos coeficientes de digestibilidade aparente da fração proteica e energética.
3. Determinar o melhor tempo de coleta de fezes para minimizar a lixiviação dos nutrientes das fezes do tambaqui, por meio dos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia.

REFERÊNCIAS

- ABIMORAD, E.G.; CARNEIRO, D.J. Métodos de Coleta de Fezes e Determinação dos Coeficientes de Digestibilidade da Fração Protéica e da Energia de Alimentos para o Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2004, v.33, n.5, p.1101-1109, 2004.
- ALLAN, G.J.; ROWLAND, S.J.; PARKINSON, S.; STONE, D. A. J.; JANTRAROTAI, W. Nutrient digestibility for juvenile silver perch *Bidyanus bidyanus*: development of methods. **Aquaculture**, 1999, n.170, p.131–145, 1999.
- ALLAN, G.L.; PARKINSON, S.; BOOTH, M.A.; STONE, D.A.J.; ROWLAND, S.J.; FRANCES, J.; WARNER-SMITH, R. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. **Aquaculture**, 2000, v.186, p.293–310, 2000.
- ALMEIDA, N. M.; BATISTA, G. M.; KODAIRA, M.; LESSI, E. Alterações *post-ortem* em tambaqui (*Colossoma macropomum*) conservados em gelo. **Ciência Rural**, 2006, v. 36, n. 4, p. 1288-1293, 2006.
- ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, Í. **Nutrição Animal**: As bases e os fundamentos da nutrição animal: os alimentos. São Paulo: Editora Nobel, 1999.
- ARAÚJO, J. R. **Avaliação de alimentos alternativos regionais para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Petrolina – PE, 2010. 70 f.Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Petrolina – PE, 2010.
- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L.C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B., GOMES, L.C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFMS, 2005, p 175-202.
- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOULDING, M. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. **Tefé: Sociedade Civil Mamirauá**; Brasília: CNPq, 1998, p. 186.
- ARBELÁEZ-ROJAS, G. A.; FRACALOSSO, D. M.; FIM, J. D. I. Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de cultivo intensivo, em Igarapé, e semi-intensivo, em viveiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2002, v.31, n.3, p.1059-1069, 2002.
- AUSTRENG, E. Digestibility determinations in fish using chromic oxide marker and analysis of contents from different segments of the gastro-intestinal tract. **Aquaculture**, 1978, v.13, n.3, p.265-272, 1978.
- BELAL, I.E.H. A review of some fish nutrition methodologies. **Bioresource Technology**, 2005, n.96, p.395–402, 2005.

BROWN, P.B., ROBINSON R. Comparison of practical catfish feeds containing 26 or 30% protein. **The Progress Fish Cult.**, 1989, n. 51, p.149-151, 1989.

BROWN, M.L.; NEMATIPOUR, G.R.; GATLIN, D.M. Dietary protein requirement of juvenile sunshine bass at different salinities. **The Progressive of Fish Culturist**, 1992, v.54, p.148-156, 1992.

BUENO, G.W. **Impacto ambiental do fósforo em rações para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Toledo – PR, 2011. 65f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) – Centro de Engenharia e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo.. 2011.

CARNEIRO, P.C.F.; MIKOS, J.D. Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, 2005, v.35, n.1. p. 187-191, 2005.

CHO, C. T.; COWEY, C. W.; WATANABE, T. **Finfish nutrition in Asia: metodological approaches to research and development**. Ottawa, Ont., IDRC, n. 1985. p.154.

CHO, C.Y., SLINGER S.J. & BAYLEY H.S. Bioenergetics of salmonid fishes, energy intake, expenditure and productivity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1982, v.73B, p.25-41, 1982.

CORNÉLIO, F.H.G. **Avaliação da suplementação de dois probióticos no desempenho zootécnico, digestibilidade de nutrientes e resistência à infecção por patógeno em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Florianópolis – SC, 2012. 47f. Dissertação (Mestrado Aquicultura) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

CYRINO, J. E. P. Regulação nutricional do crescimento. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS, 1995, Campos do Jordão. Anais de congresso. Campinas: **Colégio Brasileiro de Nutrição Animal**, 1995, p.69-90. 1995.

DAIRIKI, J. K.; SILVA, T. B. A. Revisão de literatura: Exigências nutricionais do tambaqui – Compilações de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros. Manaus: **Embrapa Amazônia Ocidental**, 2011. Documentos; 91, p. 44. Serie III. Disponível em:< <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/931300>>. Acesso em: **18 jul. 2015**.

DEGANI, G., VIOLA, S., YEHUDA, Y. Apparent digestibility of protein and carbohydrate in feed ingredients for adult tilapia (*Oreochromis aureus* x *O. niloticus*). **Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, 1997, v.49,n.3,p.115-123, 1997.

DELMONDES & BOMFIM. Fatores que afetam os coeficientes de digestibilidade nos alimentos para peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, 2004, v.1, nº1, p.20-30, julho/agosto de 2004. Disponível em:

<http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/003V1N1P20_30_JUL2004.pdf>. Acesso em: 18 Agosto 2015.

DIEMER, O.; BOSCOLO, W.R.; SIGNOR, A.A. SARY, C.; NEU, D. H.; FEIDEN, A. Níveis de fósforo total na alimentação de juvenis de jundiá criados em tanques-rede. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 2011, v.41, n.4, p.559-563, 2011.

FISHBASE. Disponível em
<<http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=263eAT=tambaqui>>
. Acesso em: 30 out. 2015.

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

FURUYA, W.M.; PEZZATO, L. E.; PEZZATO, A. C.; BARROS, M. M.; MIRANDA, E. C. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2001, v. 30,n. 4, p. 1143-1149, 2001.

FURUYA, W.M. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. (2010).** Disponível em:
<http://blog.projetopacu.com.br/wpcontent/uploads/tabelas_brasileiras_para_a_nutricao_de_tilapias.pdf>. Acesso em: 25 de set 2015.

GÉRY, J. Characoids of the world. **Neptune: Tropical Fish Hobbyist**, 1977, p. 672.

GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; MARTINS-JUNIOR, H.; ROUBACH, R.; ONO, E. A.; LOURENÇO, J. N. P. Cage culture of tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a central Amazon floodplain lake. **Aquaculture**, 2006, v.253, p.374- 384, 2006.

GONÇALVES, E. G.; CARNEIRO, D. J. Coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia de alguns ingredientes utilizados em dietas para o pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2003, v.32, n.4, p.779-786, 2003.

GOUILLOU-COUSTANS, M. F.; BERGOT, P.; KAUSHIK, S. J. Dietary ascorbic acid needs of common carp (*Cyprinus carpio*) larvae. **Aquaculture**, 1998, v. 161, p. 453-461, 1998.

HAJEN, W.E.; HIGGS, D.A.; BEAMES, R.M. DOSANJH, B. S. Digestibility of various feedstuffs by post-juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in sea water. 2. Measurement of digestibility. **Aquaculture**, 1993, v.112, p.333-348, 1993.

HEPHER, B. **Nutrition of pond fish.** 1.ed. Cambridge University Press, 1988. p.387.

HONDA, E. M. S.; Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas. II. Alimentação do tambaqui, *Colossoma bidens*. **Acta Amazonica**, 1974, v.4, p.47-53, 1974.

IBGE INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal**, 2013. v.41, p.100, 2013.

INABA, D. OGINO, C.; TAKAMATSU, C. SUGANO, S. HATA, H. Digestibility of dietary components in fishes. 1 - Digestibility of dietary proteins and starch in rainbow trout. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**. Hakodate, 1962, v. 28, n. 3, p. 367-371, 1962.

ITUASSÚ, D. R.; SANTOS, G. R. S.; ROUBACH, R.; PEREIRA-FILHO, M. Desenvolvimento de tambaqui submetido a períodos de privação alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 2004, v.39, n.12, p. 1199-1203, 2004.

JACOMETO, C. B.; BARRERO, N. M. L.; RODRIGUEZ – RODRIGUEZ, M. D. P.; GOMES, P. C.; POVH, J. A.; STREIT JUNIOR, D. P.; VARGAS, L., RESENDE, E. K.; RIBEIRO, R. P. Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2010, v. 45, n. 5, p. 481-487. 2010.

KITAJIMA, R.E. **Digestibilidade da matéria seca, energia, proteína e aminoácidos pelo catfish americano, *Ictalurus punctatus***. Florianópolis SC, 2009. 54f. Dissertação (Mestrado Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

KLONTZ, G.W. Care of fish in biological research. **Journal of Animal Science**, 1995, v.73, n.11, p.3485-3492, 1995.

KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação de peixes cultivados**. Campo Grande, MS. p. 44-47, 1998.

KUBITZA, F. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos. **Panorama da Aquicultura**, 2004, v.14, n.82, p. 49-55, 2004.

LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. **Journal of Applied Aquaculture**, 1999, v. 9, n. 2, p. 53-79, 1999.

LOVELL, R. T. Dietary requirements for ascorbic acid by warmwater fish. In: DABROWSKI, K. (Ed.). **Ascorbic acid in aquatic organisms: status and perspectives**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 97-103.

LOVELL, R.T. Digestibility of nutrientes in feedstuffs for catfish. In: Stickney R.R. e Lowell, R.T. (Ed.), **Nutrition and Feeding of channel catfish**. Southern Cooperative Serial Bulletin, 1977, v.218, p.33-37, 1977.

LOVELL, R.T. Nutrition and feeding of fish. **Auburn universiy**, 1988. p.330.

LUZ, R.K.; PORTELLA, M.C. Frequência Alimentar na Larvicultura do Trairão (*Hoplias lacerdae*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2005, v.34, n.5, p.1442-1448, 2005.

MACEDO, E. M.; CARNEIRO, D. J; CASTAGNOLLI, N. Necessidades proteicas na alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*), Curvier 1818 (*Piscis characidae*). **An.Simp. Brás. Aquic. II**. Jaboticabal. SP. p.77-78. 1981.

MARCON, J. L.; WILHELM FILHO, D. Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (*Osteichthyes*, *Serrasalminidae*) from the Amazon. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, 1999, v.123, p.257–263, 1999.

MENEZES, N.G.A. **Efeito do método de coleta de fezes de tambaqui (*Colossoma macropomum*), sobre a taxa de lixiviação**. Goiânia, GO. 2012. 38f. Dissertação (Mestrado Aquicultura) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 38f. 2012.

MEURER, S.; ZANIBONI FILHO, E. Hábito alimentar do jundiá, *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae), na região do alto rio Uruguai. In: Encontro Brasileiro de Ictiologia, 12., São Paulo. Anais. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Ictiologia**, 1997, p.29, 1997.

MIHELAKAKIS, A.; TSOLKAS, C.; YOSHIMATSU, T. Optimization of feeding rate for hatchery-produced juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata*. **Journal of World Aquaculture Society**, 2002, n.33, p.169-175, 2002.

MORALES, A. E.; CARDENETE, G.; SANZ, A. et al. Re-evaluation of crude fibre and acidinsoluble ash as inert markers, alternative to chromic oxide, in digestibility studies with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, 1999, v. 179, n. 1-4, p. 71-79, 1999.

MOURIÑO, J. L. P.; STÉFANI, M. V. Avaliação de métodos de coleta de fezes para determinação da digestibilidade proteica em rã-touro (*Rana catesbeiana*). **Ciência Rural**. 2006, v.36, n.3, p.954-958, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of warmwater, fishes and shellfishes: nutrients requirements of domestic animals**. Washington, D.C.: 1993. 114p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL- NRC. **Nutrient requirements of fish**. **Washington, D. C**. National Academy Press, 2011.

NOSE, T. On the metabolic fecal nitrogen in young rainbow trout. **Bulletin Freshwater Fish**, 1967, v.17. n.2, p.97-105. 1967.

NUNES, E.S.; CAVERO, B.A.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2006, v.41, n.1, p.139-143, 2006.

OLIVEIRA, M. M. Digestibilidade e desempenho de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de silagem ácida de pescado. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. 2006, v. 30, n. 6, p. 1196-1204, 2006.

PAULA, P.D. **Desempenho do Tambaqui (*Colossoma macropomum*), da Pirapitinga (*Piaractus brachypomum*), e do híbrido Tambatinga (*C. macropomum* x *P. brachypomum*) mantidos em viveiros fertilizados na fase de engorda**. Goiânia – GO, 2009. 69f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás. CCS. Produção Animal, 2009.

PERCIVAL, S.B.; LEE, P.S.; CARTER, C.G. Validation of a technique for determining apparent digestibility in large (up to 5 kg) Atlantic salmon *Salmo salar* L. in sea cages. **Aquaculture**, 2001, v.201, n.3-4, p.315–327, 2001.

PEREGO, C.H. **Centrifugação das fezes em estudos de digestibilidade para tilápia do Nilo**. Jaboticabal – SP, 2010. 38f. Monografia (Trabalho de graduação em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2010.

PEREIRA-FILHO, M. Alternativas para alimentação de peixes em cativeiro. In: VAL, A.L.; HONCZARYK, A. (Ed.). **Criando peixe na Amazônia**. Manaus: MCT: INPA, 1995, p.75-82.

PEREZ, P. P. Efecto del contenido proteico y energetico de dietas en el crecimiento de alevinos de gamitana (*Colossoma macropomum*). **Folia Amazonica**. 2000, v.10, n.1-2, 2000.

PEZZATO, L. E.; MIRANDA, E. C.; PEZZATO, A. C. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2002, v.31, n.4, p.1595-1604, 2002.

PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; QUINTERO-PINTO, L.G.; FURUYA, W. M. BARROS, M. M. MAGALHÃES ROSA, G. J.; LANNA, E. A. T. Avaliação de dois métodos de determinação do coeficiente de digestibilidade aparente com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Acta Scientiarum Animal Science**, 2002, v.24, n. 4, p. 965-971, 2002.

PIMENTA, C.J. OLIVEIRA, M.M.; FERREIRA, L.O.; PIMENTA, M.E.S.G.; LOGATO, P.V.R.; LEAL, R.S.; MURGAS, L.D.S. Aproveitamento do resíduo do café na alimentação de tilápia do Nilo. **Archivos de Zootecnia**, 2011, v.60, n.231, p.583-593, 2011.

PORTO, M. S. A. **Indicadores de estresse em peixes da Amazônia: sensibilidade em face do tipo de estressor**. Manaus – AM, 2005. 38f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 38 f. 2005.

PORTZ, L. Recentes avanços na determinação das exigências e digestibilidade da proteína e aminoácidos em peixes. In: **REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Piracicaba. Anais...** Piracicaba, 2001. CD-ROM. Palestras. Semi. 36, 2001.

POTRICH, F.R.; SIGNOR, A.A.; DIETERICH, T.G. **Estabilidade e lixiviação de nutrientes com rações de diferentes níveis proteicos.** Cascavel, v.4, n.3, p.77-87, 2011. Disponível em: <<http://www.fag.edu.br/graduacao/agronomia/csvolume43/09.pdf>> Acesso em: 24 de setembro 2015.

PUVANENDRAN, V.; BOYCE, D. L.; BROW, J.A. Food ration requeriment of 0⁺ yellowtail flounder limanda ferrugínea (Storer) juveniles. **Aquaculture**, 2003, n.220, p. 459-475. 2003.

RABE, J.; BROWN, J.A. A pulse feeding strategy for rearing larval fish: an experiment with yellowtail flounder. **Aquaculture**, 2000, v.191, p.289-302, 2000.

ROUBACH, R.; SAINT-PAUL, U. Use fruits and seeds from Amazonian inundated forest in feeding trials with *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Pisces, Characidae). **Journal Applied Ichthyology**, 2003, v.10, p.134-140, 2003.

RUIVO, U.E. Introdução aos princípios de industrialização de pescados de águas interiores. In: **Seminário de Piscicultura da Zona da Mata Mineira, 1.**, 1997, Muriaé. Anais de congresso. Viçosa, MG: EPAMIG, p.33-44, 1998.

SAKOMURA, N.K.; ROSTAGNO, H.S. **Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos.** Jaboticabal: Funep, 2007, p. 283.

SALDANHA, A. L., LOPEZ, M. M. E., Formulacion y evaluacion de dietas para Colossoma macropomum, en Mexico, Anais. **VI Simpósio Latino e V Simpósio Brasileiro De Aquicultura.** Florianópolis, SC. 1988, p323-344, 1988.

SALLUM, W.B. **Óxido crômico III como indicador externo em ensaios metabólicos para o matrinchã (*Bricon cephalus*, Gunther 1869) (Teleostei, Characidae).** Lavras - MG, 2000. 116p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2000.

SATOH, S.; CHO, C.Y.; WATANABE, T. Effect of faecal retrieval timing on digestibility of nutrients in rainbow trout diet with the Guelph and TUF feces collection systems. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1992, v. 58, p.1123–1127, 1992.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA FILHO, M.; CAVERO, B. A. S.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com enzimas digestivas exógenadas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818). **Acta Amazônica**, 2007, v.37, p.157-164. 2007.

SILVA, R.L **Inclusão do farelo de amendoim em dietas para juvenis de tilápias do Nilo.** Jaboticabal – SP, 2012. 51f. Dissertação (Mestrado Aquicultura)

– Programa de pós-graduação em aquicultura, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal. 51 f. 2012.

SEVILLA, A.; GÜNTHER, J. Growth and feeding level in pre-weaning tambaqui *Colossoma macropomum* Larvae. **Jounal World Aquaculture**. Soc., Baton Rouge. 2000, v. 31, n. 2, p. 218-224, 2000.

SMITH, M. H., R. BLESSING, J. G. CHELTON, J. B. GENTRY, F. B. GOLLEY, AND J. T. MCGINNIS. Determining density for small mammal population using a grid and assessment lines. **Acta Theoriologica**, 1971, v.16. p.105-125, 1971.

SMITH, B.W.; LOVELL, R.T. Digestibility of apparent protein digestibility in feed for channel catfish. **Transactions of the American Fisheries Society**. 1973, v.4, p.830-835, 1973.

SMITH, R.R; PETERSON, M.C.; ALLRED, A.C. Effect of leaching on apparent digestion coefficients of feedstuffs for salmonids. **The Progressive Fish Culturist**, 1980, v.42, n.2, p.195-199, 1980.

SPYRIDAKIS, P.; METAILLER, R.; GABAUDAN, J. Studies on nutriente digestibility in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Methodological aspects concerning faeces collection. **Aquaculture**, 1989, v.77, p. 61-70, 1989.

TACON, A. G. J. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. A training manual. The essencial nutrients and Vol II. **Nutrients source and composition**. **Brasília: FAO**, 1987, v.1, 1987.

TAKAHASHI, N.S. **Nutrição de peixes**. Disponível em: <<http://www.jundiai.com.br/abrappesq/material11.htm>>. Acesso em: 9 out. 2014.

THOMASSEN, J. M.; FIGAERA, S. O. Studies of feeding frequency for Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquacultural Engineering**, 1996, v.15, n. 2, p. 149-157, 1996.

UTNE, F. Standart methods and terminology in finfish nutrition. IN: SIMPOSIUM OF FINFISH NUTRITION AND FISH FEED TECHNOLOGY, 1978, Hamburg. **Proceedings. Hamburg: EIFAC/FAO**, 1978. R-1, 14P.

VAL A. e ALMEIDA-VAL V. M. F. Fishes of the Amazon and their environments. **Physiological and biochemical features**. Springer Verlag. Heidelberg. 1995.

VAN DER MEER, M.B.; ZAMORA J.E.; VERDEGEM M.C.J. Effect of the dietary lipid level on protein utilization, and the size and proximate composition of body compartments of *C. macropomum* (Curvier). **Aquaculture Research**, 1997.

VAN SOEST, P. J. Ruminant Metabolism, Nutritional Strategies, the Cellulolytic Fermentation and the Chemistry of Forages and Plant Fibers. **Nutritional ecology of the ruminant**; 2.ed. Corvallis: O & B Books, 1983, p.374, 1983.

VENSCAPPELL, B. Methodical studies on digestion in trout. 1. Reliability of digestion coefficients in relation to methods for feces collection. **Aquaculture Engineering**, 1985, v.4, p.33-49, 1985.

VICTORELLI, R. **Manejos alimentares e intervalos de coleta de fezes em estudos de digestibilidade para juvenis de tilápia do Nilo**. Jaboticabal - SP 2010. 50f. Monografia (Trabalho de graduação em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal. 2010.

VIEIRA, E.F., ISAAC, C.V.J., FABRÉ, N.N. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Teleostei, Serrasalminidae) no Baixo Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, 1999, v.29, p.625-638, 1999..

VILELA, M.C; ARAÚJO, K.D. DE; MACHADO, L. DE S; MACHADO, M.R.R. Análise da viabilidade econômico-financeira de projeto de piscicultura em tanques escavados. **Custos e @gronegócio online** - v. 9, n. 3. 2013.

WANG, N.; HAYWARD, R.S.; NOLTIE, D.B. Effect of feeding frequency on food consumption, growth, size variation, and feeding pattern of age-0 hybrid sunfish. **Aquaculture**, 1998, v.165, p.261-267, 1998.

WINDELL, J.T.; FOLTZ, J.W.; SAROKON, J.A. Effect of fish size, temperature, and amount digestibility of a pelletet diet by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Transactions of the American Fisheries Society**, 1978, v. 107, n. 4, p. 613-616, 1978.

WINDELL, J.T.; FOLTZ, J.W.; SAROKAN, J.A. Methods of fecal collection and nutrient leaching in digestibility studies. **Progressive Fish Culturist**, 1978, v.49, p.51–55, 1978.

CAPÍTULO 2 - Avaliação de métodos de coleta, centrifugação e manejo pré-coleta de fezes em estudos de digestibilidade para o tambaqui.

1 - INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma atividade com alta expansão no Brasil. Trabalhos mostram que o crescimento médio mundial na última década foi cinco vezes maior que o da bovinocultura, da avicultura e da suinocultura. No período de 1992 a 2002, a piscicultura brasileira aumentou 825%, enquanto que nos outros países, apenas 142% (AYROZA et al., 2008). Porém, mesmo com este crescimento muito incentivador, existe ainda pouco conhecimento sobre nutrição e manejo de peixes no Brasil, principalmente os nativos.

O tambaqui é um peixe de piracema, nativo das bacias dos Rios Amazonas e Orinoco, e a principal espécie nativa cultivada no país, com produção de mais de 54 mil toneladas em 2010, correspondendo a um crescimento de 39% de 2008 a 2010 (MPA, 2010), chegando a mais de 111 mil toneladas em 2011, tendo um acréscimo na produção de 104% (MPA, 2011). Possui o hábito alimentar onívoro com tendência a herbívoro, zooplantófago e frugívoro (HONDA, 1974). É um animal de carne muito apreciada, apresenta tecnologia de produção de alevinos bem consolidada, podendo as fêmeas produzir centenas de milhares de óvulos numa única desova total. Por ser uma espécie produzida em sistemas intensivos e semi-intensivos, tornou-se necessário o estudo e o desenvolvimento de pesquisas com a finalidade de elucidar questões relacionadas a nutrição da espécie, tornando a produção mais lucrativa e sustentável. Várias são as linhas de pesquisas com trabalhos para este peixe, tendo como principal finalidade o conhecimento mais aprofundado sobre nutrição, fisiologia, patologia, reprodução entre outras. Mesmo com todos os trabalhos existentes, em várias áreas de conhecimento, para espécies nativas do Brasil e seu crescimento considerável com o passar dos anos, pouco ainda se sabe sobre as exigências qualitativas e quantitativas de nutrientes para tais animais. São necessárias mais pesquisas

para solidificar resultados encontrados e elucidar questões na produção desses peixes.

Como a alimentação constitui a parte mais onerosa da produção de peixes, atualmente existem linhas de pesquisa que estudam meios de otimizar esses custos, tornando a piscicultura uma atividade cada vez mais lucrativa e sustentável. A principal é a formulação de dietas que maximizem o crescimento do peixe, aumentando a eficiência de utilização dos alimentos e fornecendo a quantidade correta de nutrientes; para isso, torna-se necessário o conhecimento da digestibilidade dos nutrientes contidos nos alimentos. A determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes é medida pela diferença entre a ingestão e a excreção de nutrientes fecais, com o uso de marcadores indigestíveis. A técnica de avaliar a eficiência de alimentos para peixes iniciou-se há quase 90 anos (BELAL et al., 2005), por pesquisadores que buscavam aprimorar tecnologias e metodologias utilizadas apenas em animais homeotérmicos. Porém, devido aos peixes viverem em ambientes diferentes, algumas das técnicas não poderiam ser realizadas sem aceitar um nível significativo de erro. É desejável ter um método rápido e simples para a determinação da digestibilidade. Ensaio de digestão são realizados rotineiramente, mas com peixes, o ambiente aquático dificulta a medição do consumo de ração e a separação das fezes na água.

Várias são as metodologias utilizadas em trabalhos de determinação de digestibilidade em peixes, como dissecação (AUSTRENG, 1978), decantação, sistema de Guelph desenvolvido por CHO et al. (1985), pipetagem direta no fundo do tanque (WATANABLE e OHTA 1995), compressão ou massagem abdominal (NOSE et al., 1960), sucção anal (LOVELL et al., 1977; WINDELL et al., 1978; BROWN et al., 1985), entre outras. Porém, DELMONDES e BOMFIM (2004) destacaram que, em todas as metodologias de coleta de fezes de peixes para determinação de coeficientes de digestibilidade, existem vantagens e desvantagens específicas para cada método.

Além do conhecimento e aplicabilidade de uma metodologia mais específica para cada espécie, deve-se levar em consideração conhecimentos básicos relacionados à biologia e comportamento da mesma, como a frequência alimentar, fator importante para contribuir para a melhora na conversão alimentar

e incrementar o ganho de peso (CARNEIRO e MIKOS, 2005). Porém, poucos trabalhos avaliam tal parâmetro para as diferentes espécies de peixes, principalmente relacionando a trabalhos de digestibilidade. Outro fator que pode induzir a resultados de CDA representativos é a lixiviação de nutrientes e/ou de marcadores inerte a partir das fezes. Para início, alguns procedimentos podem ser estudados como alternativas para diminuição desta lixiviação; dentre eles, a centrifugação das fezes e diferentes intervalos de coleta das fezes.

Poucos trabalhos foram desenvolvidos para avaliar o método de coleta para o tambaqui, tentando estudar as particularidades ligadas à espécie. Nesse sentido, são de suma importância os trabalhos que avaliem metodologias de digestibilidade podendo, desta forma, diminuir o nível significativo de erro, otimizando a confiabilidade dos resultados para cada espécie.

O presente trabalho avaliou a tecnologia de coleta e processamento de fezes em estudos de digestibilidade de nutrientes de dietas para tambaqui, visando a elaboração de um protocolo específico que promova minimização da lixiviação. Para tanto, foram estudados os efeitos da frequência alimentar pré-coleta de fezes, através da determinação do volume das mesmas em matéria seca; da centrifugação e dos intervalos de tempo para coleta por decantação, através dos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína e energia.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (Lat. 21°15'S, Long. 48°18'W) no período de dezembro de 2014 a março de 2015 para elaboração de um protocolo de estudos de digestibilidade em dietas para o tambaqui.

Este trabalho de pesquisa está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em julho de 2015, com o protocolo de nº 12977//15.

2.1 Material biológico e condições experimentais

Inicialmente foram utilizados 288 tambaquis (*Colossoma macropomum*) com peso médio de $230,74 \pm 1,02$ g, provenientes de tanques escavados do Setor de Piscicultura do Centro de Aquicultura da UNESP. Os peixes foram divididos em 36 tanques experimentais de fibra de vidro de 430 litros de volume útil, dotados de aeração e abastecimento contínuos com água proveniente de poço artesiano e taxa de renovação de aproximadamente 3,5 vezes ao dia, com oito peixes em cada unidade. Estes juvenis de tambaqui tiveram adaptação às unidades experimentais durante 15 dias.

As variáveis físico-químicas da água como pH, temperatura, oxigênio dissolvido foram monitoradas uma vez por semana durante todo o período experimental, utilizando-se um peagômetro da marca (PHTEK – pH100) e um oxímetro (YSI- *Yellow Springs Instruments* 550A). Semanalmente, todas as unidades experimentais passaram por limpeza completa, onde toda a matéria orgânica proveniente de fezes e resíduos de ração era retirada através de sifonamento, para manutenção da qualidade de água. Os valores médios dos parâmetros de qualidade de água durante o período experimental foram: Oxigênio Dissolvido = $6,5 \pm 0,58$ mg/l, pH = $7,53 \pm 0,37$, Temperatura: $29,0 \pm 1,07$ °C.

2.2 Dietas

Para a formulação das dietas experimentais, as análises de matéria seca, matéria mineral e extrato etéreo dos ingredientes foram realizadas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da UNESP. As análises de proteína bruta e energia bruta foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, SP.

Para uso nos três experimentos, foi formulada uma dieta para atender as exigências nutricionais da espécie (NRC, 2011), com aproximadamente 32% de proteína bruta e 4100 kcal de energia bruta. Para os estudos com determinação dos coeficientes de digestibilidade, foi adicionado 0,5% de óxido de cromo III como marcador inerte à dieta (Tabela 1), em substituição a uma pequena porção de inclusão de milho e farelo de soja. No processamento das dietas, os ingredientes foram finamente moídos, com peneira de porosidade padrão de 0,50 mm de diâmetro. Posteriormente, foram pesados, homogeneizados manualmente e gradativamente foi acrescida água, para serem extrudadas em extrusora Exteec, modelo Ex Micro.

Tabela 1. Composição percentual e proximal da dieta experimental

	Dieta com Cr ₂ O ₃	Dieta sem Cr ₂ O ₃
Ingredientes	(%)	(%)
Farinha de vísceras de aves	11,4	11,4
Farinha de peixe	6,00	6,00
Farelo de soja	33,00	32,90
Milho	20,10	20,70
Farelo de trigo	19,58	19,58
Óleo de soja	1,71	1,71
Quirera de Arroz	4,00	4,00
Fosfato Bicálcico	2,50	2,50
Calcário	0,20	0,20
Lisina	0,34	0,34
Premix ^b	0,50	0,50
Antifúngico	0,15	0,15
Cr ₂ O ₃	0,50	0
Antioxidante	0,02	0,02
Composição calculada^a		
Matéria Seca (%)		89,62
Proteína Bruta (%)		31,98
Extrato Etéreo (%)		5,60
Energia Bruta (kcal/kg)		4118,41
Fibra bruta (%)		4,50
Matéria Mineral (%)		8,96

^a Com base na composição analisada dos ingredientes.

^b Premix, níveis de garantia da por kg da dieta: Ácido Fólico, 1200,0 mg/kg; Ácido Nicotínico 20,00 g/kg; Ácido Pantoténico 10.000,00mg/kg; BHT 5.000,00 mg/kg; Biotina 200,00 mg/kg; Cobalto 80,00mg/kg; Cobre3500,00 mg/kg; Colina 100,00 g/kg; Ferro 20,00 g/kg; Iodo 160,00 mg/kg; Inosol 25,00 g/kg; Manganês 10.000,00 mg/kg; Selênio 100,00 mg/kg; Vitamina A 2.400.000,00 UI/kg; Vitamina B1 4.000,00 mg/kg; Vitamina B2 4.000,00 mg/kg; Vitamina B6 3.500,00 mg/kg; Vitamina B12 8.000,00 mcg/kg; Vitamina C 60,00 g/kg; Vitamina D3 600.000,00 UI/kg; Vitamina E 30.000,00 UI/kg; Vitamina K3 3.000,00 mg/kg; Zinco 24,00 mg/kg.

2.3 Digestibilidade de nutrientes

As coletas de fezes foram realizadas em 12 coletores de fibra de vidro, constituídos de acordo com o sistema de Guelph modificado (ABIMORAD e CARNEIRO, 2004) com aproximadamente 80 litros de capacidade, equipados com sistema de circulação contínua de água que possibilitava a coleta de fezes por gravidade (Figura 1).

Foram avaliados os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta e energia bruta das amostras dos ensaios II e III. As concentrações de óxido de crômio-III das fezes e da dieta foram determinadas por digestão nitro-perclórica, de acordo com a metodologia descrita por FURUKAWA e TSUKAHARA (1966), sendo a leitura feita por espectrofotometria.



Figura 1- Coletores de fibra de vidro de acordo com o sistema de Guelph modificado

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) das dietas foram estimados segundo NOSE (1966):

$$CDA = 100 - \left[100 \left(\frac{\% \text{ do marcador na dieta}}{\% \text{ do marcador nas fezes}} \times \frac{\% \text{ do nutriente nas fezes}}{\% \text{ do nutriente na dieta}} \right) \right]$$

2.4 Análises químico-bromatológicas

As análises da composição centesimal da dieta experimental e das fezes coletadas foram realizadas segundo a metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C. 2000).

A determinação da matéria seca foi realizada em duas etapas. Primeiramente, a de pré-secagem, por meio da desidratação a frio através de liofilização por 72 horas. Posteriormente, a determinação da 2ª matéria seca se

sucedeu através do aquecimento em estufa a 105°C, por 24 horas. A matéria seca original foi obtida mediante multiplicação das duas matérias secas e divisão por 100.

O teor de proteína bruta tanto das amostras de fezes como do sobrenadante da centrifugação do experimento de intervalos de coleta das mesmas foi calculada por meio da determinação do nitrogênio total, através do equipamento LECO, expressos em base seca. A energia bruta foi calculada utilizando a bomba calorimétrica Parr 6100.

2.5 Avaliações estatísticas

Os dados foram submetidos às análises de variância (ANOVA), a normalidade dos erros Cramer-von Misses ($\alpha=5\%$) e também a homogeneidade da variância, Levene ($\alpha=5\%$). Encontrando diferenças significativas, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa R versão 2.15.0.

2.6 Ensaio I – Frequência alimentar

Para o ensaio de adequação da melhor frequência alimentar pré-coleta de fezes, foram utilizados 96 peixes com peso médio de $230,74 \pm 1,02$ g distribuídos em 12 tanques experimentais de fibra de vidro de 430 litros de volume útil, com oito peixes em cada um. Este ensaio foi dividido em duas fases: na primeira, os animais foram alimentados no período diurno com diferentes frequências: DF2 (08:00 e 18:00); DF3 (8:00, 13:00 e 18:00); DF4 (08:00, 11:20, 14:40 e 18:00) e as fezes coletadas a cada duas horas das 20h00min às 06h00min, sendo esta metodologia de 2 horas já utilizada no laboratório de pesquisa. Na segunda fase, os animais foram alimentados à noite, com diferentes frequências: NF2 (20:00 e 06:00); NF3 (20:00, 01:00 e 06:00); NF4 (20:00, 23:20, 02:40 e 06:00) sendo as fezes coletadas das 08h00min às 18h00min, a cada duas horas.

Os dados foram avaliados segundo um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos constituídos pelos dois períodos de

arraçoamento (diurno e noturno) e três frequências de alimentação, com quatro repetições. As frequências de alimentação do experimento foram baseadas em diferentes metodologias pré-coleta de fezes de espécies de água doce usadas por diversos autores (VICTORELLI, 2010; VAN DER MEER et al., 1997; THOMASSEN & FJAERA, 1996), tendo como objetivo a padronização de coletas para estudos de digestibilidade com o tambaqui.

Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente com a dieta, sem a inclusão de Cr_2O_3 , durante sete dias, de acordo com as frequências alimentares propostas. As coletas de fezes sucederam-se no oitavo dia. Terminada a fase de coleta das fezes, as amostras foram secas em liofilizador durante 72 horas, até obtenção de peso constante. Posteriormente, foram retiradas eventuais escamas das fezes, as quais foram maceradas em cadinho de porcelana. Após, foram secas em estufa por 24 horas a 105°C , para determinação do volume de fezes na matéria seca, parâmetro de avaliação utilizado para a melhor frequência alimentar.

2.7 Ensaio II – Tempo e velocidade de centrifugação das fezes de tambaqui para determinação da digestibilidade da proteína e energia.

Para o ensaio da determinação dos melhores tempos e rotações de centrifugação das fezes, foram utilizados 264 tambaquis com peso médio de $230,79 \pm 4,53\text{g}$, divididos em 33 tanques experimentais de fibra de vidro de 430 litros de volume útil, com oito peixes em cada um.

As estratégias para escolha dos tempos e rotações na centrifugação dos tratamentos foram baseadas em estudos prévios de diversos autores sobre metodologia de digestibilidade para a espécie. Os dados foram avaliados em um delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos, seguindo um esquema fatorial 3×3 constituído por três velocidades de rotação (3000, 4500 e 6000 RPM) e três tempo de centrifugação das fezes (10, 20 e 30'), acrescidos de dois tratamentos testemunhas: a coleta de fezes por decantação sem centrifugação e coleta de fezes por dissecação da região final do trato digestório.

Os peixes foram submetidos a um período de adaptação de sete dias à dieta experimental com a inclusão de Cr_2O_3 . Os animais foram arraçoados duas vezes ao dia, nos horários de 10:00 e 16:00, até saciedade aparente. No dia anterior à coleta de fezes, os peixes foram alimentados três vezes ao dia (10:00, 16:00 e 22:00). Na manhã do dia de coleta, os peixes foram alimentados às 6:00 e transferidos duas horas depois para os coletores de fezes. As coletas de fezes foram realizadas a cada duas horas, em 12 coletores de fibra de vidro em formato cônico, com aproximadamente 80L de capacidade, equipados com sistema de circulação contínua de água e que possibilitava a coleta de fezes por decantação (Figura 2A). Logo depois de cada coleta, as fezes foram centrifugadas de acordo com cada tratamento proposto, em centrífuga Spinlab, modelo SL-5M. Após, o sobrenadante foi descartado e as fezes devidamente armazenadas para posterior liofilização e análises. Para a coleta das fezes por dissecação, os animais foram eutanasiados por meio do aprofundamento do plano anestésico com uma dose de benzocaína de 100mg/L e em seguida congelados à temperatura de -20°C . Posteriormente, foram eviscerados e o trato digestivo dissecado cuidadosamente para a retirada do material fecal na sua região final (Figura 2B). As coletas sucederam-se até obter-se quantidade de amostra suficiente para as análises. As fezes foram congeladas e armazenadas à temperatura de -20°C , e posteriormente liofilizadas, durante 72 horas. Logo após, foram retiradas eventuais escamas com auxílio de pinça, antes de serem maceradas em almofariz e pistilo de porcelana (Figura 2C).



Figura 2 – A - Coleta por decantação, B - coleta por dissecação e C - fezes secas.

2.8 Ensaio III – Intervalo na coleta de fezes

No terceiro ensaio experimental, foram estudados os efeitos de diferentes intervalos para coleta de fezes do tambaqui. Foram utilizados 120 tambaquis com peso médio de $289,44 \pm 6,34$ g, divididos em 20 tanques experimentais de fibra de vidro com um volume útil de 430 litros, contendo seis peixes em cada unidade experimental. Foram considerados cinco tratamentos, em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições: 1h de intervalo de coleta (T1h); 2h de intervalo de coleta (T2h); 4h de intervalo de coleta (T4h); 8h de intervalo de coleta (T8h) e 12h de intervalo de coleta (T12h).

Os animais foram alimentados com a dieta com inclusão de Cr_2O_3 . Anteriormente ao período de coleta das fezes, os animais passaram por adaptação à nova dieta experimental, contendo marcador, por sete dias (SILVA et al., 2003a). O manejo alimentar seguiu a melhor metodologia determinada no ensaio de frequência alimentar pré-coleta de fezes, até a saciedade aparente.

Após cada coleta, as fezes foram centrifugadas de acordo com o melhor resultado, estatisticamente encontrado no ensaio de centrifugação de fezes, em centrífuga Spinlab, modelo SL-5M. As fezes foram identificadas e congeladas à -20°C , para posteriormente serem liofilizadas, maceradas e analisadas para determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente de PB e EB.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio I – Frequência Alimentar

Observa-se que não houve efeito significativo ($P>0,05$) das estratégias de alimentação na quantidade de fezes produzidas pelos juvenis de tambaqui (Tabela 2), possivelmente devido ao alto coeficiente de variação. Apesar disso, alimentar os animais numa frequência de quatro vezes ao dia, no período diurno (8h00min; 11h20min; 14h40min e 18h00min) antes da coleta, proporcionou em valor absoluto 44,83% maior quantidade de fezes quando comparado ao tratamento com duas alimentações (DF2), embora não foi estatisticamente diferente, pelo alto valor de DMS.

Tabela 2. Médias para a quantidade de fezes em matéria seca nas diferentes estratégias de alimentação

Frequências Alimentares	Quantidade de Fezes em Matéria Seca ¹
DF2	5,13±2,78
DF3	5,78±3,21
DF4	7,43±4,12
NF2	7,48±1,49
NF3	4,63±1,48
NF4	6,37±2,47
Valor de P	0,6104
DMS	4,31
CV(%)	44,90

¹ Médias (g) ± desvio padrão

F2: Duas alimentações por período

F3: Três alimentações por período

F4: Quatro alimentações por período

D: Período Diurno

N: Período Noturno

DMS: Diferença Mínima Significativa

CV: Coeficiente de Variação

A alimentação em intervalos maiores, embora não tenha proporcionado uma saciedade aparente a todos os peixes, espera-se que alimentações mais frequentes pudessem aumentar as oportunidades de alimento, garantindo um

arraçoamento mais eficiente ao longo do dia, diminuindo até problemas de dominância e competitividade por alimentação, como também melhor distribuição do aporte dos nutrientes para o metabolismo do animal, basicamente em função da capacidade do trato digestório (WANG et al., 1998). Tal ligação não foi observada com relação ao volume de fezes coletado, possivelmente devido ao tambaqui apresentar característica muscular diferenciada em seu estômago, sendo esta estriada, podendo armazenar alimento por um período relativamente mais prolongado (APPEL, 2000), quando deve ser digerido, absorvido e consequentemente excretado em um maior tempo. LOURES et al (2001) relataram que o manejo alimentar mais adequado pode ser aquele em que os indivíduos consomem menores quantidades de alimento por mais vezes ao longo do dia, suprimindo melhor suas necessidades orgânicas. Geralmente é aceito que a cinética de evacuação pode ser descrita por uma equação diferencial influenciada pelo enchimento do estômago: quanto mais cheio, mais rápido o esvaziamento, sendo possível concluir, neste caso, um maior volume de fezes nas coletas para digestibilidade (MORAIS e ALMEIDA, 2014). Porém no presente estudo, não foi possível associar tal afirmação para o tambaqui, que apresentou para todos os tratamentos, estatisticamente um mesmo volume de fezes excretado, possivelmente devido a capacidade do tambaqui de armazenar alimento em seu estômago por um maior tempo (TUCKER & ROBINSON, 1991).

Considerando que em trabalhos de digestibilidade, quanto maior o volume de fezes, menor é a quantidade de coletas necessárias para a obtenção de amostra suficiente para análises e que segundo WANG et al. (1998) e THOMASSEN e FJAERA (1996), o consumo de ração aumenta na medida em que se eleva o número de arraçoamentos, deveria ser proveitosa a utilização de uma maior frequência de alimentação, favorecendo uma menor quantidade de coletas de fezes. Resultados semelhantes foram observados por VICTORELLI (2010), trabalhando com manejos alimentares com tilápias do Nilo em estudos de digestibilidade. O autor concluiu que, alimentar os peixes numa maior frequência, mesmo não apresentando diferenças significativas, promoveu um aumento de fezes coletadas de quase o dobro do tratamento com menor frequência de alimentação. Ainda neste trabalho, o melhor arraçoamento dos animais foi com a maior frequência de alimentação antes da coleta (8h e 17h), e ainda uma ultima

alimentação, uma hora antes da transferência dos peixes para os aquários coletores. Segundo o autor este fato influenciou o aumento do volume coletado de fezes. Tal método não pôde ser utilizado no presente trabalho, pois antes da execução deste experimento foi realizado um ensaio piloto com o objetivo de observar a adaptação do peixe aos manejos propostos. Foi possível notar que o tambaqui tem uma resposta diferente ao da espécie estudada por VITORELLI (2010), regurgitando o alimento ofertado, pouco tempo antes da transferência dos animais, (logo nos primeiros momentos do contato com os aquários coletores), possivelmente ocasionado pelo estresse do manejo de transferência (MORAIS e ALMEIDA 2014).

Também foi possível observar que, mesmo não existindo diferenças significativas entre período diurno e noturno, o animal tende a apresentar, em valores numéricos, uma propensão em preferir menores frequências de alimentação em período noturno. Esta resposta pode estar associada ao menor estresse de arraçoamento para animais no escuro, podendo sugerir que, por conta da menor incidência luminosa, o tambaqui sente-se mais a vontade para alimentações, preferindo ser arraçoado em uma menor frequência. Resultados semelhantes puderam ser observados com KITAJIMA (2009), quando avaliou a digestibilidade da matéria seca, energia, proteína e aminoácidos pelo catfish americano, *Ictalurus punctatus*, em diferentes densidades de estocagem. O autor pode concluir que animais menos adensados e com uma frequência alimentar de duas vezes apresentaram melhores respostas para o volume de fezes coletadas.

Segundo HAYWARD e BUSHMANN (1994), a frequência de alimentação, dentre outras variáveis, pode influenciar o tempo de trânsito gastrointestinal e consequentemente a quantidade de fezes excretada ao longo do tempo. Portanto, dependendo do período de coleta de fezes escolhido (dia ou noite) e também das condições em que o experimento está sendo conduzido é possível adotar um melhor período e uma melhor frequência de arraçoamento. No presente trabalho, os resultados encontrados que visavam determinação do volume de fezes em ensaios de digestibilidade, foram inovadores. Entretanto não houve diferença estatística, devido aos altos valores de desvio padrão de alguns tratamentos.

Por outro lado, vários autores verificaram melhora no desempenho de várias espécies de peixes, com o aumento da frequência alimentar (THOMASSEN

e FJAERA, 1996; SANCHES e HAYASHI, 2001; ZHOU e YUE, 2001; HAYASHI et al., 2004). Outros autores observaram melhora no coeficiente de digestibilidade da proteína em peixes com o aumento da frequência alimentar (ZHOU et al., 2008; ALEXANDRE, 2010). Porém, existe pouca informação sobre a influência da frequência alimentar na quantidade de fezes coletadas em trabalhos de digestibilidade.

3.2 Ensaio II – Tempo e velocidade de centrifugação das fezes de tambaqui para determinação da digestibilidade da proteína e energia.

Considerando que a coleta de fezes pelo método de dissecação propicia os dados de digestibilidade mais fidedignos, por menor ou nenhuma contaminação ou lixiviação, os valores observados na Tabela 3 denotam que há, de uma forma geral, diferenças significativas da coleta com centrifugação e da coleta sem centrifugação, tanto para os coeficientes de digestibilidade da fração proteica como da energética, podendo ainda ser observado que estes são prejudicados ao longo do aumento, tanto do tempo como da velocidade de rotação na centrifugação, favorecendo a lixiviação.

Tabela 3. Concentração média de óxido de cromo III, nutrientes, energia e coeficientes de digestibilidade aparente da dieta cuja as fezes dos peixes submetidas a diferentes tempos e velocidades de centrifugação.

TRATAMENTOS	Cr ₂ O ₃ (%)	PB (%)	CDA – PB (%)	EB (kcal/g)	CDA - EB (%)
T10R3.0	1,36d	9,23bc	86,39b	3601,33ab	68,37e
T10R4.5	1,55c	7,43cd	92,17a	3322,33abc	73,94cd
T10R6.0	1,63bc	7,17cd	92,87a	3260,33bc	76,65abc
T20R3.0	1,68bc	7,34cd	92,93a	3215,33c	77,69ab
T20R4.5	1,61bc	7,34cd	92,58a	3208,66c	76,68abc
T20R6.0	1,67bc	6,49d	93,70a	3307,66bc	76,91abc
T30R3.0	1,77b	6,36d	94,16a	3273,00bc	77,69ab
T30R4.5	1,94a	6,17d	93,51a	3262,33bc	78,55a
T30R6.0	1,61bc	8,32cd	91,64a	3361,00abc	75,55abc
SEM CENTRIF.	1,53c	12,46a	88,33b	3420,00abc	74,42bcd
DISSECAÇÃO	1,19e	12,30ab	77,94c	3672,66a	71,27de
Valor de P	<0,001	<0,001	<0,001	0,01	<0,001
CV (%)	3,54	9,94	1,09	3,60	1,67

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

CV: Coeficiente de Variação

Cr₂O₃: Óxido de Cromo III

PB: Concentração de Proteína Bruta

CDA – PB: Coeficiente de Digestibilidade Aparente de Proteína Bruta

EB: Concentração de Energia Bruta

CDA – EB: Coeficiente de Digestibilidade Aparente de Energia Bruta

DMS: Diferença Mínima Significativa

T10R3.0: 10' x 3000rpm; T10R4.5: 10' x 4500rpm; T10R6.0: 10' x 6000rpm; T20R3.0: 20' x 3000rpm; T20R4.5: 20' x 4500rpm; T20R6.0: 20' x 6000rpm; T30R3.0: 30' x 3000rpm; T30R4.5: 30' x 4500rpm; T30R6.0: 30' x 6000rpm.

Resultados contrários foram observados por PEREGO (2010), quando estudou a centrifugação de fezes em estudos de digestibilidade aparente para tilápia do Nilo, constatando que não houve diferença estatística para os CDA da proteína e concentração do marcador nas fezes, afirmando que a centrifugação das fezes foi efetiva, influenciando na similaridade entre os tratamentos, e portanto, na redução da lixiviação do marcador e da proteína presente nas fezes. Como o tambaqui apresenta fezes não recobertas por uma camada mucosa, diferentemente da tilápia do Nilo, pode ser uma justificativa ao favorecimento da lixiviação dos nutrientes pela centrifugação, justificando os resultados encontrados no atual trabalho. Ainda é preciso salientar que a dissecação, método pouco empregado em experimentos de digestibilidade em peixes, tem como vantagem impedir a lixiviação dos nutrientes e dispensar a utilização de tanques especiais, porém implica em sacrificar o peixe para a coleta das fezes, que é um fator limitador na sua execução (HARDY e BARROWS, 2002).

Parte dos nutrientes das fezes é perdida com o passar do tempo de exposição à água. Entretanto, a coleta de fezes por dissecação também apresenta desvantagens, pois a contaminação por constituintes endógenos, como muco e produtos orgânicos digestíveis pode subestimar o coeficiente de digestibilidade aparente (PEZZATO et al., 2002). A coleta no reto ou na porção distal do intestino assume que as fezes já teriam sido totalmente digeridas e a única causa de subestimativa seria a contaminação. Porém, foram adotados cuidados especiais nesse estudo para avaliar de forma efetiva e segura esses métodos. Durante o método da dissecação, os peixes foram anestesiados, no sentido de evitar estresse e a porção final do intestino foi obtida após sacrifício e congelamento do animal, prevenindo a captação de tecido epitelial e material endógeno.

Nos diferentes tempos e velocidades de centrifugação, foi possível observar que houve um aumento na lixiviação dos nutrientes, quando comparado aos resultados encontrados pelo método de coleta direta (coleta por dissecação da parte posterior do intestino); indicando, não ser interessante a centrifugação das fezes de tambaqui. Porém, PEREGO (2010), afirmou que para tilápias do Nilo é possível obter valores semelhantes ao método de coleta de fezes do reto, utilizando a centrifugação das fezes, durante 15 minutos a 3200 rpm, antes de

desprezar o sobrenadante. Resultados encontrados no atual experimento são, ainda, contrários aos encontrados por HAJEN *et al.* (1993), com o salmão chinook (*Oncorhincus tshawytscha*), os quais determinaram que os CDA de diferentes ingredientes mostraram-se semelhantes, mesmo quando obtidos pelo método convencional e pelo método da dissecação.

Analisando melhor os resultados observados para a interação entre os efeitos com centrifugação das fezes coletadas por decantação em tubos Falcon (Tabela 4), houve efeito ($P < 0,05$) da interação entre tempo e rotação da centrifugação, para todas as variáveis estudadas.

Ainda com a centrifugação foi possível observar a eliminação de grande quantidade de água das amostras de fezes (sobrenadante descartado), o que facilitou o processo de secagem a frio, o que também foi observado por PEREGO (2010). Tal fato também foi notado no presente trabalho; porém, não existe vantagem da centrifugação, sabendo que favoreceu a lixiviação dos nutrientes.

Tabela 4. Médias para os tempos e rotações de centrifugações das fezes, como também da interação entre os parâmetros.

	Cr₂O₃ (%)	PB (%)	CDA – PB(%)	EB (Kcal/g)	CDA - EB(%)
Médias para Tempo					
10'	1,51	7,94	90,48	3.395	72,99
20'	1,66	7,06	93,07	3.244	77,09
30'	1,77	6,95	93,1	3.299	77,26
Médias para Rotação					
3000 RPM	1,6	7,64	91,16	3.363	74,58
4500 RPM	1,7	6,98	92,76	3.26	76,39
6000 RPM	1,64	7,33	92,74	3.310	76,37
Valores de P					
Efeito de tempo	<0,001	0,039	<0,001	0,057	<0,001
Efeito de rotação	<0,01	0,263	<0,01	0,027	<0,001
Efeito da interação	<0,001	<0,01	<0,001	0,044	<0,001
Coeficiente de Variação (%)	50,39	11,35	1,09	0,03	0,9

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível 5% de probabilidade.

Cr₂O₃: Óxido de Cromo III

PB: Concentração de Proteína Bruta

CDA – PB: Coeficiente de Digestibilidade Aparente de Proteína Bruta

EB: Concentração de Energia Bruta

CDA – EB: Coeficiente de Digestibilidade Aparente de Energia Bruta

No estudo dos efeitos da interação, para os coeficientes de digestibilidade aparente da PB e EB obtidas com a centrifugação das fezes coletadas pós-decantação (excluindo o método de dissecação), os resultados obtidos revelam maior acurácia das médias com a centrifugação por 10 minutos à 3000 RPM (Tabela 5).

Em algumas áreas de pesquisa, a centrifugação das fezes em estudos com peixes é comumente utilizada, como observaram PEZZATO et al. (2002), estudando dois métodos de determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente com a tilápia do Nilo, ao centrifugarem as fezes em uma rotação de 10.000 rpm por 20 minutos, e também CORNÉLIO (2009), que avaliou a suplementação de dois probióticos no desempenho zootécnico, digestibilidade de nutrientes e resistência à infecção por patógenos em tilápias do Nilo e utilizou a

centrifugação das fezes como parte da metodologia do trabalho, com uma rotação de 2,296 x g por 5 minutos. FRACALOSSI e FILHO (2006), avaliando coeficientes de digestibilidade aparente de ingredientes para jundiá, também utilizaram para a centrifugação das fezes uma velocidade de rotação de 2,296 x g, com um tempo de 2 minutos. Porém, os autores não relacionam aos resultados encontrados a alguma influência da centrifugação das fezes e também não argumentam sobre a utilização da centrifugação, diferentemente do atual trabalho que objetivou estudar a influencia da centrifugação das fezes do tambaqui sobre os coeficientes de digestibilidade e concentração de proteína e energia. Portanto, o trabalho se apresenta inovador para estudos com peixes, especialmente para o tambaqui, elucidando, desta forma, questões que até então eram desconhecidas.

Tabela 5. Interações entre tempo e rotações de centrifugação sob a concentração de óxido de cromo III, proteína bruta, energia bruta, CDA da PB e CDA da EB.

	Tempo (min)	Rotação (RPM)		
		3000	4500	6000
Cr₂O₃ (%)	10	1,36bB	1,55aB	1,63aA
	20	1,68aA	1,61aB	1,67aA
	30	1,77bA	1,94aA	1,61cA
PB (%)	10	9,23aA	7,43aA	7,17aA
	20	7,34aAB	7,34aA	6,49aA
	30	6,36aB	6,17aA	8,32aA
CDA – PB (%)	10	86,39bB	92,17aA	92,87aA
	20	92,93aA	92,58aA	93,70aA
	30	94,16aA	93,51abA	91,64bA
EB (Kcal/g)	10	3601aA	3322aA	3260aA
	20	3215aB	3209aA	3308aA
	30	3273aAB	3262aA	3361aA
CDA – EB (%)	10	68,37bB	73,94aB	76,65aA
	20	77,69aA	76,68aAB	76,91aA
	30	77,69aA	78,55aA	75,55aA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (minúsculas na linha e maiúsculas na coluna).

Cr₂O₃: Óxido de Cromo III

PB: Concentração de Proteína Bruta

CDA – PB: Coeficiente de Digestibilidade Aparente de Proteína Bruta

EB: Concentração de Energia Bruta

CDA – EB: Coeficiente de Digestibilidade Aparente de Energia Bruta

3.3 Ensaio III - Intervalos de coleta

Neste ensaio, os diferentes intervalos de tempos entre as coletas de fezes pelo método de decantação (Guelph modificado) não influenciaram significativamente os CDA (Tabela 6), como também as concentrações de proteína bruta e energia bruta nas fezes ($P>0,05$), mostrando que intervalos entre uma e até doze horas de coleta não influenciam significativamente na lixiviação dos nutrientes. MOTA (2012), avaliando diferentes métodos de coleta de fezes sobre os coeficientes de digestibilidade para a mesma espécie, constatou que o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta (CDA_{PB}) não sofreu influência do intervalo de coleta, sugerindo desta forma, que no sistema de decantação, o intervalo do tempo pode não intervir nestes valores, pouco influenciados pela lixiviação.

Tabela 6. Coeficientes de digestibilidade aparente da proteína, energia, concentração de proteína, da energia das fezes e proteína do sobrenadante sob diferentes intervalos de coleta.

Intervalos de Coleta (horas)	Coeficiente de Digestibilidade Aparente (CDA) e Concentração de Nutrientes ¹				
	PB(%)	CDA_{PB} (%)	EB (kcal/g)	CDA_{EB} (%)	PB _{sobre*} (%)
1	19,01	84,85	3713	71,70	0,52
2	16,89	85,05	3777	70,57	0,26
4	16,26	84,17	3755	69,94	0,43
8	15,17	87,35	3641	73,63	0,43
12	15,08	87,36	3833	68,22	0,47
Valor de P	0.80	0.55	0.13	0.30	0.83
DMS	6,24	4,85	281,18	18,49	0,33
CV(%)	38,93	2,80	2,66	4,93	75,90

¹Médias entre colunas não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$)

CDA: Coeficiente de Digestibilidade Aparente

PB: Proteína Bruta

EB: Energia Bruta

*Sobre: Sobrenadante

DMS: Diferença Mínima Significativa

CV: Coeficiente de Variação

NO presente estudo, corroborando com os resultados por SILVA et al. (1999) e ABIMORAD e CARNEIRO (2004) que também não encontraram diferenças significativas para o CDA_{PB} , quando compararam os métodos de decantação e de dissecação para a determinação da digestibilidade de alimentos para o tambaqui e pacu, respectivamente. Segundo ABIMORAD E CARNEIRO

(2004), o tempo máximo de 30 minutos do contato das fezes com a água evitaria a superestimativas dos valores de digestibilidade pela lixiviação dos nutrientes e que depois deste tempo a quantidade de material lixiviado não apresenta uma grande alteração ao longo do tempo. Porém, no presente ensaio não foi possível experimentar tal tempo por problemas na centrifugação.

O sobrenadante resultante da centrifugação das fezes pode atuar na obtenção de informações sobre a lixiviação de amostras fecais, auxiliando numa melhor justificativa dos resultados. No presente estudo, os resultados mostram que houve uma pequena perda de PB para o meio; porém, as concentrações não foram significativamente diferentes entre os tratamentos, podendo sugerir uma possível lixiviação semelhante em todos, tendo ainda como fator agravante nos resultados o alto coeficiente de variação (Tabela 6). Portanto, foi possível constatar a partir deste trabalho que, para obtenção de melhores resultados sobre a lixiviação, são necessários mais estudos que avaliem todos os possíveis nutrientes contidos no sobrenadante, bem como tempos menores que uma hora.

Os nutrientes estão sujeitos ao processo de lixiviação quando as fezes permanecem por um longo período na água. Este fato pôde ser observado com diversas espécies de peixes como tilápia do Nilo (PEZZATO et al., 2002), truta (DE LA NOUE e CHOUBERT, 1986), salmão (HAJEN et al., 1993a), pacu (ABIMORAD e CARNEIRO, 2004) e peixes de ordem Siluriformes (WATANABE et al., 1996; STOREBAKKEN et al., 1998). Também pode ocorrer em fezes de anfíbios, como descrito por MOURINÕ et al. (2006), que trabalharam com diferentes métodos de coleta de fezes para determinação da digestibilidade proteica em alimentos para rã-touro (*Rana catesbeiana*). Segundo SPYRIDAKIS et al. (1989), nos métodos que utilizam material fecal naturalmente evacuado na água há tendência de apresentarem valores maiores de digestibilidade, em razão da lixiviação de nutrientes na água, como se essa fração de nutriente tivesse sido aproveitada pelo peixe.

Para resultados de CDA_{EB} , MOTA (2012) encontrou resposta quadrática do tempo de contato das fezes com a água, mostrando coeficientes de digestibilidade reduzidos até 314 minutos; posteriormente, ocorre o aumento destes coeficientes. Estes resultados corroboram com diversos resultados de estudos metodológicos (RICHE et al., 1995; BELAL, 2005) com diferentes

espécies de peixes, os quais ressaltam a lixiviação de materiais solúveis na água como o principal erro dos métodos que utilizam a coluna de sedimentação. Neste trabalho, a lixiviação apresentou-se de forma igualitária para todos os tratamentos. Resultados semelhantes foram encontrados por HAJEN et al. (1993a), que determinaram coeficientes de digestibilidade de diferentes ingredientes, por meio da obtenção de fezes por diferentes tempos pelo Sistema Guelph e por dissecação, para o salmon chinook (*Oncorhincus tshawytscha*), não encontrando diferenças significativas entre os valores obtidos pelos dois métodos.

As concentrações e os coeficientes de digestibilidade aparente da EB nas fezes não apresentaram diferenças significativas para os diferentes intervalos de coleta (Tabela 6). Semelhantes resultados foram observados para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (ABIMORAD e CARNEIRO, 2004), perca prata (*Bidyanus*) (SATO et al., 1992) e truta arco-íris (ALLAN et al., 1999), nos quais não foram observadas alterações significativas nos coeficientes de digestibilidade aparente da EB.

Desta forma, devido à importância do tambaqui para o cenário na aquicultura brasileira, pode-se concluir que a consistência das fezes possui um papel determinante para a redução nos erros ou na lixiviação dos nutrientes. E que os diferentes intervalos de coletas de fezes para o tambaqui a partir de uma hora, não influencia significativamente os coeficientes de digestibilidade aparente para proteína e energia, como também a concentração destes nutrientes.

Um dos fatores que podem contribuir para a redução dos níveis de lixiviação dos nutrientes pode ser a inclusão de aglutinantes nas dietas para determinação da digestibilidade, de modo a melhorar a consistência das fezes dessa espécie (MOTA, 2012). Visto que o tambaqui apresenta fezes de formato granular sem cobertura mucosa, fator este que tem sido ressaltado em diversos estudos metodológicos (ALLAN et al., 1999; PEZZATO et al., 2002; BELAL, 2005) e a perda dos compostos orgânicos pode ser maior pela estrutura física das fezes (MOTA, 2012). Alguns estudos foram focados nesta área (CANTELMO et al., 1999; CANTELMO et al., 2002), comprovando que a adição de aglutinantes melhora significativamente a resistência física dos grânulos fecais, sendo necessário assim ainda mais estudos sobre as concentrações e eficiência sobre a

utilização deste aditivo para cada espécie, como alternativa para minimizar os efeitos da lixiviação

Portanto, uma sugestão para auxiliar na menor lixiviação dos nutrientes na água pelo método de Guelph modificado poderia ser a utilização de aglutinantes nas fezes. Entretanto, nenhum estudo ainda encontra-se disponível de forma a determinar o nível de aglutinante que melhore as características de estabilidade dos peletes fecais na água sem interferir na absorção de nutrientes, sendo uma área de grande interesse na nutrição de peixes redondos.

4 - CONCLUSÕES

Nas condições de realização do presente estudo com o tambaqui, os resultados permitiram elaboração das seguintes conclusões:

1. Não houve influência dos diferentes períodos e frequências alimentares pré-coleta sobre o volume de fezes obtido por decantação para juvenis de tambaqui, denotando a praticidade da estratégia de dois arraçoamentos noturnos para coleta subsequente durante o dia.
2. Com os diferentes tempos e velocidades de rotação estudados, a centrifugação das fezes coletadas por decantação não é recomendada por proporcionar coeficientes de digestibilidade da proteína e energia da dieta com menor acuracidade que os obtidos com o método de coleta sem centrifugação.
3. Os intervalos de tempo de uma a 12 horas entre coletas de fezes pelo método de decantação (Guelph modificado) não influenciaram na digestibilidade da proteína e energia.

REFERÊNCIAS

- ABIMORAD, E.G.; CARNEIRO, D.J. Métodos de Coleta de Fezes e Determinação dos Coeficientes de Digestibilidade da Fração Protéica e da Energia de Alimentos para o Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2004, v.33, n.5, p.1101-1109, 2004.
- ALLAN, G. J., ROWLAND, S.J., PARKINSON, S., STONE, D. A. J., JANTRAROTAI, W. Nutrient digestibility for juvenile silver perch *Bidyanus bidyanus*: development of methods. **Aquaculture**.1999, v.170, p.131–145, 1999.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17th. v. II., 2000.
- AUSTRENG, E. Digestibility determinations in fish using chromic oxide marker and analysis of contents from different segments of the gastro-intestinal tract. **Aquaculture**, 1978, v.13, n.3, p.265-272, 1978.
- AYROZA, L.M.S. et al. **Piscicultura no médio Paranapanema: situação e perspectivas**. Assis, 2008. Acesso em: 20 set. 2015. Online. Disponível na internet: http://www.pesca.sp.gov.br/list_arquivos.php?pag=1.
- BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria: Ed. UFSM, 2002.
- BELAL, I.E.H. A review of some fish nutrition methodologies. **Bioresource Technology**, 2005, n.96, p.395–402, 2005.
- BROWN, B.P.; STANGE, R.J; ROBBINS, K.R. Protein digestibility coefficients for yearling channel catfish fed high protein feedstuffs. **The Progressive Fish Culturist**, v.54, p.44-49, 1985.
- CANTELMO, O. A.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; RIBEIRO, M. A. R. Influencia de diferentes aglutinantes na digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta, no pacu (*Piaractus mesopotamicus*) arraçoado com rações elaboradas com e sem vapor. **Acta Scientiarum**, 1999, v.21,n.2, p.277-282, 1999.
- CANTELMO, O. A.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PEZZATO, A. C. Características físicas de dietas para peixes confeccionadas com diferentes aglutinantes. **Acta Scientiarum**, 2002, v. 24, n. 4, p. 949-955, 2002.
- CARNEIRO, P.C.F.; MIKOS, J.D. Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, 2005. v.35, p.187-191, 2005.
- CHARLES, P. M.; SEBASTIAN, S. M.; RAJ, M. C. V.; MARIAN, M. P. Effect of feeding frequency on growth and food conversion of *Cyprinus carpio* fry. **Aquaculture**, v. 40, p. 293-300. 1984.

CHO, C. T.; COWEY, C. W.; WATANABE, T. **Finfish nutrition in Asia: metodological approaches to research and development**. Ottawa, Ont., IDRC, 1985. 154p.

CHUA, T. E. & TENG, S. K. **Effects of feeding frequency on the growth of young estuary grouper, *Epinephelus tauvina* (For&Al), cultured in floating net cages**. Aquaculture, 14, 31-47, 1978.

DE LA NOUE, J.; CHOUBERT, G. Digestibility in rainbow trout: comparison of the direct and indirect methods of measurement. **Prog. Fish Cult.**,1986, v. 48, p. 190-195, 1986.

DELMONDES & BOMFIM. **Fatores que afetam os coeficientes de digestibilidade nos alimentos para peixes**. Revista Eletrônica Nutritime, v.1, nº1, p.20-30, julho/agosto de 2004. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/003V1N1P20_30_JUL2004.pdf>. Acesso em: 18 Agosto 2015.

ELLIOTT, J. M. **Number of meals in a day, maximum weight of food consumed in a day and maximum rate of feeding for brown trout, *Salmo trutt.*** Freshwater Biol., 5,287-303. 1975.

FISHBASE. Disponível em <http://www.fishbase.org/Summary/SpeciesSummary.php?ID=263eAT=tambaqui>>. Acesso em: 30 out. 2013.

FURUKAWA, A.A.; TSUKAHARA, H. On the acid digestion for the determination of chromic oxide as index substance in the study of digestibility of fish feed. **Bulletin of the Japanese Society of Fisheries**,1996, v.32, n.6, p.502-506, 1966.

GRAYTON, B. D.; BEAMISH, F. W. H. **Effects of feeding frequency on food intake, growth and body composition of Rainbow trout (*Salmo gairdneti*)**. Aquaculture, 11,159-72. 1977.

HAJEN, W. E.; HIGGS, D. A.; BEAMES, R. M. DOSANJH, B. S. Digestibility of various feedstuffs by post-juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in sea water. 2. Measurement of digestibility. **Aquaculture**,1993, v.112, p.333-348, 1993.

HAYASHI, C. Breves considerações sobre tilápias. In: Ribeiro, R.P.; HAYSHI, C; FURUYA, W.M. (Ed.). **Cultura de piscicultura: criação racional de tilápias**. 2004, p4, 1995.

HAYASHI C, BOSCOLO WR, SOARES CM, et al. Digestibilidade Aparente da energia e proteínas das farinhas de resíduo da filetagem da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da corvina (*Plagioscion squamosissimu*) e farinha integral do amarelo canela (*Macrobrachium amazonicum*) para a tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 2004, v.33 p. 8-13, 2014.

HAYWARD, R. S.; M. BUSHMANN. **Gastric evacuation rates for juvenile largemouth bass**. Transactions of the American Fisheries Society 123: 88-93, 1994.

HARDY, R.W. and F.T. BARROWS. Diet formulation and manufacture. In: Fish Nutrition. Hardy (eds.), 3rd edition. **London:Academic Press**. 2002, p. 505-600

HENKEN, A.M. et al. The effect of feeding level on apparente digestibility of dietary dry mater, crude protein and gross energy in the African catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture, Amsterdam, v. 51, p. 1-11, 1985.

HONDA, E. M. S.; **Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas**. II. Alimentação do tambaqui, *Colossoma bidens*. Acta Amazonica, v.4, p.47-53, 1974.

JOBLING, M. **Effect of feeding frequency on food intake and growth of Arctic charr**. *Salvelinus alpinus* (L.). J. Fish Biol. 23, 177-85. 1983.

JONES, L. P.; SILVA, S. S. **Influence of differential movement of the marker chromic oxide and nutrients on digestibility estimations in the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor***. Aquaculture, v.154, p.323-336, 1997.

KITAJIMA, R.E. **Digestibilidade da matéria seca, energia, proteína e aminoácidos pelo catfish americano, *Ictalurus punctatus***. Florianópolis SC, 2009. 54f. Dissertação (Mestrado Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

KONO, H.; NOSE, Y. **Relationship between the amount of food taken and growth in fishes**. 1. Frequency of feeding for a maximum daily ration. Bull. Jap. Sot. Sci. Fish., 3, 169-75. 1971.

LOURES, B. T. R. R.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L.; MARQUES, H. L. M.; SUSSEL, F.R.; POVH, J.A.; CAVICHIOLO, F. **Manejo alimentar de alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), associado às variáveis físicas, químicas e biológicas do ambiente**. Acta Scientiarum, Maringá, v.23, n.4, p.877-883, 2001.

LOVELL, R.T. **Digestibility of nutrientes in feedstuffs for catfish**. In: Stickney R.R. e Lowell, R.T. (Ed.), Nutrition and Feeding of channel catfish. Southern Cooperative Serial Bulletin. v.218, p.33-37. 1977

Ministério da Pesca e Aquicultura. 2010. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - Brasil - 2010. Brasília.

Ministério da Pesca e Aquicultura. 2011. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - Brasil - 2011. Brasília.

MOTA, C. S. **Diferentes métodos de coleta de fezes sobre os coeficientes de digestibilidade aparente para o tambaqui (*Colossoma macropomum*)**.

Monografia (Trabalho de graduação em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Jataí. 38f. 2012.

MOURIÑO, J. L. P.; STÉFANI, M. V. Avaliação de métodos de coleta de fezes para determinação da digestibilidade proteica em rã-touro (*Rana catesbeiana*). **Ciência Rural**, 2006, v.36, n.3, p.954-958, 2006.

MURAI, T.; ANDREWS, J. W. **Effect of frequency of feeding on growth and food conversion of channel catfish fry**. Bulletin of Japanese Society on Science of Fisheries, v.42, p.159-161, 1976.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirement of fish and shrimp**. Washington: National Academic Press, 2011. p.164-184, 2011.

NOSE, T. Recent advances in the study of fish digestion in Japan. In: SIMPOSIUM ON FINFISH NUTRITION AND FISH FEED TECHNOLOGY, 1966, Belgrade. **Proceedings...** Belgrade: EIFAC/FAO, 1966. 15p.

PERCIVAL, S. B.; LEE, P. S.; CARTER, C. G. **Validation of a technique for determining apparent digestibility in large (up to 5 kg) Atlantic salmon *Salmo salar* L. in seacages**. Aquaculture 201 (3-4), 315–327, 2001.

PEREGO, C.H. **Centrifugação das fezes em estudos de digestibilidade para tilápia do Nilo**. Jaboticabal – SP, 2010. 38f. Monografia (Trabalho de graduação em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2010.

PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; QUINTERO-PINTO, L.G.; FURUYA, W. M. BARROS, M. M. MAGALHÃES ROSA, G. J.; LANNA, E. A. T. **Avaliação de dois métodos de determinação do coeficiente de digestibilidade aparente com a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.)**. Acta scientiarum Animal Science v. 24, n. 4, p. 965-971, 2002.

PORTZ, L. **Recentes avanços na determinação das exigências e digestibilidade da proteína e aminoácidos em peixes**. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba, 2001. CD-ROM. Palestras.Semi 36, 2001.

RICHE, M.; WHITE, M. R.; BROWN, P. B. Barium carbonate as an alternative indicator to chromic oxide for use in digestibility experiments with rainbow trout. **Nutrition Research**, 1995, v.15, n.9, p.1323-1331, 1995.

SAMPATH, K. **Preliminary report on the effects of feeding frequency in *Channa striatus***. Aquaculture, 40, 301-6, 1984.

SANCHES, L. E. F.; HAYASHI, C. **Effect of feeding frequency on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fries performance during sex reversal in hapas**. Acta Scientiarum – Animal Sciences, v.23, n.4, p.871-876, 2001.

SATOH, S.; CHO, C. Y.; WATANABE, T. Effect of faecal retrieval timing on digestibility of nutrients in rainbow trout diet with the Guelph and TUF feces collection systems. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1992, v. 58, p.1123–1127, 1992.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Digestibility of seeds consumed by tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818): an experimental approach. In: VAL, A.L.; ALMEIDA VAL, V.M.F. (ed). **Biology of tropical fishes**. Manaus: INPA, 1999. Cap.11, p.137-148.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Frutos e sementes consumidos pelo tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), incorporados em rações. Digestibilidade e velocidade de trânsito pelo trato gastrointestinal. Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v.32, n.6, p. 1815-1824, 2003a (Supl. 2).

SPYRIDAKIS, P.; METAILLER, R.; GABAUDAN, J.; RIAZA, A. Studies on nutrient digestibility in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). 1. Methodological aspects concerning faeces collection. **Aquaculture**, 1989, v.77, p.61-70, 1989.

STOREBAKKEN, T.; KVIEN, I. S.; SHEARER, K. D.; GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S. J.; BERGE, G. M. The apparent digestibility of diets containing fish meal, soybeanmeal or bacterial meal fed to Atlantic salmon (*Salmo solar*): evaluation of different faecal collection methods. **Aquaculture**, 1998, v. 169, p. 195-210, 1998.

THOMASSEN, J. M.; FIGAERA, S. O. Studies of feeding frequency for Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquacultural Engineering**, 1996, v.15, n. 2, p. 149-157, 1996.

VICTORELLI, R. **Manejos alimentares e intervalos de coleta de fezes em estudos de digestibilidade para juvenis de tilápia do Nilo**. Jaboticabal - SP 2010. 50f. Monografia (Trabalho de graduação em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal. 2010.

WANG, N.; HAYWARD, R.S.; NOLTIE, D.B. Effect of feeding frequency on food consumption, growth, size variation, and feeding pattern of age-0 hybrid sunfish. **Aquaculture**, 1998, v.165, p.261-267, 1998.

WATANABE, T.; OHTA, M. Digestible and metabolizable energy of various diets for carp and rainbow trout. **Fisheres Science**, 1995, v.61, n.2, p.215-222, 1995.

WATANABE, T.; TAKEUCHI, T.; SATOH, S.; KIRON, V. **Digestible crude protein contents in various feedstuffs determined with four fresh water fish species**. *Fisheres Science* v.62 n.2, p.278-282, 1996.

WINDELL, J.T.; FOLTZ, J.W.; SAROKAN, J.A. **Methods of fecal collection and nutrient leaching in digestibility studies**. *Progressive Fish Culturist* 49, 51–55, 1978.

ZHOU Q. C.; YUE Y. R. Apparent digestibility coefficients of selected feed ingredients for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*. **Aquaculture Research**, 2001, v. 43, p. 806-814, 2001.

ZHOU, Z.; REN, Z.; ZENG, H.; YAO, B. Apparent digestibility of various feedstuffs for bluntnose black bream *Megalobrama amblycephala* Yih. **Aquaculture Nutrition**, 2008, v.14, p.153–165, 2008.