

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**OFERTA EFICIENTE DE PROTEÍNA COMO MITIGADOR DO
IMPACTO AMBIENTAL DA CRIAÇÃO DE ROBALO PEVA**
(Centropomus parallelus, POEY, 1860)

MARIA ARACI GRAPIUNA DE CARVALHO

VILA VELHA - ES

SETEMBRO/2015

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**OFERTA EFICIENTE DE PROTEÍNA COMO MITIGADOR DO
IMPACTO AMBIENTAL DA CRIAÇÃO DE ROBALO PEVA
(*Centropomus parallelus*, POEY, 1860)**

Tese apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas. para obtenção do título de Doutora em Ecologia de Ecossistemas

MARIA ARACI GRAPIUNA DE CARVALHO

VILA VELHA - ES

SETEMBRO/2015

C331o Carvalho, Maria Araci Grapiuna de.

Oferta eficiente de proteína como mitigador do impacto ambiental da criação de robalo peva (*centropomus parallelus*, POEY,1860) / Maria Araci Grapiuna de Carvalho. – 2015. 102 f.: il.

Orientador: Levy de Carvalho Gomes.

Tese (Doutorado em Ecologia de Ecossistemas)

Universidade Vila Velha, 2015.

Inclui bibliografias.

1. Ecologia. 2. Proteínas na nutrição animal. 3. Robalo (Peixe). I. Gomes, Levi de Carvalho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577

MARIA ARACI GRAPIUNA DE CARVALHO

**OFERTA EFICIENTE DE PROTEÍNA COMO MITIGADOR DO
IMPACTO AMBIENTAL DA CRIAÇÃO DE ROBALO PEVA
(*Centropomus parallelus*, POEY, 1860)**

Tese apresentada a Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para obtenção do título de Doutor em Ecologia de Ecossistemas.

Aprovada em 30 de setembro de 2015

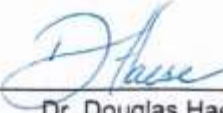
Banca Examinadora



Dr^a. Adriana Regina Chippari Gomes (UVV)



Dr. Bruno de Lima Preto (IFES - Alegre)



Dr. Douglas Haese (UVV)



Dr. Manuel Vasquez Vidal Júnior (UENF)



Dr. Levy de Carvalho Gomes (UVV)
Orientador

*Aos meus pais, irmãos e sobrinhas,
os quais amo profundamente e
que, apesar da distância física,
me deram muito carinho,
incentivo e apoio em todas
etapas acadêmica da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecossistema da Universidade Vila Velho, pela oportunidade de realização do Doutorado.

Em especial ao meu Orientador, professor Dr. Levy de Carvalho Gomes, por ter aceitado me orientar. Obrigada pela grande oportunidade, confiança, paciência, apoio, pelas inúmeras e importantes sugestões, pela orientação, incentivo e exemplo de profissionalismo.

A família Dantas, donos da Universidade Vila Velha, em especial a vice-reitora Luciana Dantas, pela oportunidade, incentivo e apoio emocional e financeiro.

A todos os professores do doutorado, pelo convívio e ensinamentos e aos funcionários da pós-graduação: Edson e Andreia por todo carinho e paciência.

Ao professor Dr. Luiz Fernando Loureiro Fernandes da UFES por ter cedido o espaço do laboratório da Base Oceanográfica da Universidade Federal do Espírito Santo e por todo apoio nesta caminhada. Também aos funcionários e seguranças da Base pelo carinho que sempre me receberam e pelo total apoio e companheirismo nos dias e noites de trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Edital nº 36/2009 por meio dos projetos 559090/2009-9 e 562821/2010-4 pelo apoio financeiro.

A fábrica de ração Nutriave, nas pessoas de Gláucio e Toni, pela doação das rações experimentais e pela confiança no projeto de pesquisa.

Aos colegas do laboratório de Ictiologia Aplicada da UVV, que são inúmeros e por isso não vou citar nomes para não ocorrer de esquecer algum, pelo auxílio nas análises e trocas de conhecimentos.

Aos colegas e técnicos do laboratório de Bromatologia da UVV: Ana Cláudia, Jean e Bianca, pela amizade, dedicação e competência.

Aos coordenadores dos cursos de graduação no qual ministro aulas, aos coordenadores de apoio, as secretárias, aos profissionais da biblioteca, aos seguranças, enfim, a todos da UVV pelo carinho e apoio.

Aos meus alunos queridos pela compreensão, palavras de força e apoio durante o período do doutorado.

A todos os meus familiares e meus amigos, que são muitos, por todo apoio, atenção, orações e conselhos.

Enfim, a todos meu Muito Obrigada!

*“Ninguém ignora tudo.
Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso aprendemos sempre.”*

Paulo Freire

*“A humildade exprime
uma das raras certezas de que estou certo:
a de que ninguém é superior a ninguém.”*

Paulo Freire

RESUMO

CARVALHO, Maria Araci Grapiuna. Universidade de Vila Velha, ES. Setembro de 2015. **Oferta eficiente de proteína como mitigador do impacto ambiental da criação de robalo peva (*Centropomus parallelus*, POEY, 1860).** Orientador: Dr. Levy de Carvalho Gomes.

O experimento foi realizado com robalo peva (*Centropomus parallelus*) objetivando determinar o nível de proteína bruta na ração (400, 440, 480, 520 e 560g kg⁻¹) que promove menor impacto ambiental com bom desempenho zootécnico e econômico. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade de Vila Velha número 307/2014. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. A avaliação do desempenho zootécnico e econômico de juvenil I de robalo com peso de 3.69 ± 0.05 g teve duração de 60 dias e foi realizada em 20 tanques de polietileno, sendo cada tanque uma unidade experimental. Os resultados mostraram que o ganho em peso e a taxa de crescimento específico foram afetados positivamente pelo aumento de concentração de proteína, enquanto o peso médio final e a conversão alimentar foram significativamente menores quando com a ração de 400 g kg⁻¹. O custo médio da dieta foi significativamente maior para a ração com concentração de proteína de 400 g kg⁻¹, e o índice de eficiência econômica foi significativamente menor para as concentrações de 520 e 560 g kg⁻¹. No experimento de excreção de amônia para juvenil I de robalo verificou que rações com níveis mais alto de proteína promovem maiores taxas de excreção de amônia. Já no experimento que analisou a toxicidade de efluentes, por meio do teste de toxicidade crônico de curta duração com ouriço do mar, verificou que o CENO e o CEO ocorreram com o tratamento de 480g kg⁻¹ e 520g kg⁻¹, respectivamente. Resumindo, na fase juvenil I de robalo peva as rações que promoveram os melhores resultados zootécnico e econômico foram de 520 e 560 g kg⁻¹ de proteína, porém do ponto de vista ambiental a ração recomendada é de 480 g kg⁻¹ por promover menor impacto ambiental. Foi objeto também da pesquisa gerar um modelo simplificado integrando os parâmetros: ambiente, produção e econômico para avaliar a concentração de proteína mais adequada na ração de juvenis II de robalo peva (27.02 ± 0.27 g). Para calcular os parâmetros foram considerados: ganho em peso para a produtividade (P), custo médio da alimentação para o econômico (E) e número de plúteos anormais para o ambiental (A). Vários cenários foram estudados usando os parâmetros, e com base no cenário que mais condiz com a realidade da atividade da piscicultura, ou seja, aquele que tem maior peso para os parâmetros produtividade e econômico recomenda-se a ração de 480 g kg⁻¹. Na determinação da taxa de retenção proteica em juvenis II de robalo peva observou-se um efeito quadrático positivo e a retenção máxima ocorreu com ração de 510,20 g kg⁻¹. A taxa de excreção de amônia total na água foi semelhante à fase I, ou seja, aumentou com o aumento dos níveis de proteína na dieta. Os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína foram aumentando com o aumento da proteína dietética até o nível de 520 g kg⁻¹ onde se estabilizou. Pela equação de regressão o nível de melhor digestibilidade é de 495,62 g kg⁻¹.

Palavras-chave: Piscicultura, amônia, toxicidade, nutrição, digestibilidade..

ABSTRACT

CARVALHO, Maria Araci Grapiuna. Universidade de Vila Velha, ES. September 2015. **Efficient supply of protein as mitigation of the environmental impact of fat snook (*Centropomus parallelus* POEY, 1860).** Advisor Dr. Levy de Carvalho Gomes.

The experiment was conducted with fat snook (*Centropomus parallelus*) and the aim of this study was to determine the level of crude protein in the diet (480, 400, 440, 520 and 560 g kg⁻¹) that promotes less environmental impact with good performance and economical. The research was approved by the Ethics Committee of the University of Vila Velha, Brazil # 3072014. The experimental design was completely randomized with five treatments and four replications. The research of performance and economic of sea bass with 3.69 ± 0.05g had duration of 60 days. Each survey was conducted in 20 polyethylene tanks, each tank an experimental unit. The results showed that the gain in weight and specific growth rate were positively affected by the increase of concentration of protein, while the final average weight and feed conversion were significantly lower when the ration of 400 g kg⁻¹. The average cost of the diet was significantly higher for the feed with protein concentration of 400 g kg⁻¹, and the index of economic efficiency was significantly lower for concentrations of 520 and 560 g kg⁻¹. In the experiment of ammonia excretion for juvenile sea bass found that rations with higher protein levels promote higher rates of ammonia excretion. In the experiment that examined the toxicity of effluents, through chronic toxicity test of short duration with sea urchin, lowest observed effects level (LOEC) and observed effects level (NOEC) occurred with the treatment of 480 g kg⁻¹ and 520 g kg⁻¹. Taking the experimental results into account, the concentration of 480 g.kg⁻¹ is recommended for promoting less environmental impact. Most existing studies use only growth and economic parameters as criteria to determine the best amount of protein. It is important that tests that indicate the environmental impact, as the rate of excretion and toxicity test, also be used as criteria for this determination, so that the determination of the most appropriate protein level for production will be more environmentally responsible. It was also the object search generate a simplified model integrating the parameters: environment, economic production and to assess the most appropriate concentration of protein in the diet of juvenile II of fat snook (27.02 ± 0.27 g). To calculate the parameters were considered: weight gain for the productivity (P), average cost of food for the economic (E) and number of plúteos freaks to the environment. Several scenarios have been studied using the parameters, and based on the scenario that more matches the reality of farming activity (has greater weight to the productivity and economic parameters) we recommend feed with 480 g kg⁻¹. In determining the retention rate protein in juvenile II fat Snook we observed a positive quadratic effect and maximum retention with feed 510.20 g kg⁻¹. The rate of excretion of total ammonia in the water increased with increased levels of protein in the diet. The apparent digestibility coefficients of protein were increasing with increasing dietary protein level where stabilized of 520 g kg⁻¹. By the regression equation better digestibility level is 495.62 g kg⁻¹.

Key words: Ammonia, toxicity, fish farming, nutrition, digestibility.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
Apresentação Geral	11
Introdução Geral	13
Referências	21
Artigo1: Protein levels for juvenile I fat snook <i>Centropomus parallelus</i> with an environmental approach	28
Abstract	29
Introduction	30
Materials and Methods	30
Results	40
Discussion	45
Conclusion	49
References	50
Artigo 2: Modelo simplificado integrando os parâmetros ambiente-produção-econômico na piscicultura de <i>Centropomus parallelus</i> (robalo peva)	56
Abstract	57
Resumo	58
Introdução	59
Material e Métodos	60
Resultados	61
Discussão	71
Conclusão	75
Referências	75
Artigo 3: Digestibilidade, taxa de retenção proteica e excreção de amônia em juvenis II de robalo peva (<i>Centropomus parallelus</i> , POEY, 1860) alimentados com diferentes níveis de proteína.	80
Abstract	81
Resumo	82
Introdução	83
Material e Métodos	84
Resultados	89
Discussão	93
Conclusão	95
Referências	96
Considerações Finais	99

APRESENTAÇÃO GERAL

A tese teve como objetivo central determinar, o nível de proteína em rações de robalo-peva (*Centropomus parallelus*), nas fases de recria e engorda, que promovem menor impacto ambiental, bons índices zootécnicos e econômicos. Os objetivos específicos foram: analisar o efeito da ração com cinco diferentes níveis de proteína na absorção de nutrientes e na excreção de compostos nitrogenados na fase de recria e engorda; avaliar o grau de toxicidade do efluente para cada nível de proteína; verificar qual dos cinco níveis de proteína proporciona a melhor relação produção animal versus impacto ambiental; analisar qual o nível de proteína na ração que promove a melhor relação custo de produção (Kg) versus impacto ambiental; gerar um modelo simplificado integrando os parâmetros produtividade, econômico e ambiental; e determinar o coeficiente de digestibilidade da proteína.

Com base nos objetivos propostos, a tese foi estruturada em cinco capítulos. No primeiro capítulo foi apresentada uma introdução geral com o intuito de fornecer um pouco mais de informações sobre o robalo peva. No capítulo dois os dados da pesquisa foram apresentados em forma de um artigo com o título “Oferta eficiente de proteína como mitigador do impacto ambiental da criação de robalo peva (*Centropomus parallelus*, POEY, 1860)”. O objetivo deste trabalho foi determinar o nível de proteína bruta, nas rações de o robalo-peva juvenil I (*Centropomus parallelus*), que promove o crescimento adequado, boa produtividade e índices econômicos e também verificar qual é menos tóxico para o meio ambiente. Esse artigo foi submetido à revista Aquatic Living Resouces em agosto e está em fase de análise. O terceiro capítulo da tese teve como objetivo gerar um modelo simplificado integrando os parâmetros: ambiente, produção e econômico para avaliar a concentração de proteína mais adequada na ração de juvenis II de *Centropomus*

parallelus (robalo peva). Os dados usados na confecção do modelo foram gerados nos experimentos: desempenho produtivo/econômico e de toxidade crônica em ouriço). Este capítulo, em forma de artigo, recebeu o título de “Modelo simplificado integrando os parâmetros ambiente-produção-econômico na piscicultura de *Centropomus parallelus* (robalo peva)”. O quarto capítulo teve como objetivo determinar o nível de proteína, nas rações de juvenis II de robalo-peva (*Centropomus parallelus*), que promove melhor coeficiente de digestibilidade aparente, retenção de proteína e menor excreção de amônia. Este capítulo também foi escrito em forma de artigo e recebeu o título de “Digestibilidade, taxa de retenção proteica e excreção de amônia em juvenis II de robalo peva (*Centropomus parallelus*, POEY, 1860) alimentados com diferentes níveis de proteína”. Finalizando a tese, o quinto capítulo trata das considerações finais elaboradas com o intuito de resumir aos leitores as principais conclusões da tese.

INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura é a cultura de organismos aquáticos e abrange as criações de peixes (piscicultura), camarões (carcinicultura), rãs (ranicultura), moluscos (malacocultura) e algas (algocultura). Ela tem se destacado, em nível mundial, com uma taxa de crescimento médio de 15,7% entre 2007 e 2010, enquanto a criação de bovinos, frangos e suínos cresceram -8,6%, 9,2% e 12,9%, respectivamente (FAO, 2013).

A aquicultura no Brasil também tem apresentado taxa de crescimento (56%) nos últimos 12 anos. Ela tem se destacado no setor do agronegócio, pois tem promovido um milhão de empregos diretos e indiretos e produção de ração de aproximadamente 900 milhões/ano (IBGE, 2013).

O Brasil é um país que possui clima propício, amplo litoral (aproximadamente 8,4 mil km) e várias espécies de peixes de interesses comerciais tais como o robalo-peva (*Centropomus paralellus*), o robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*), o beijupirá (*Rachycentron canadum*) a garoupa (*Epinephelus marginatus*), o dourado (*Coryphaena hippurus*) e o badejo (*Mycteroperca bonaci*), mas a criação comercial dessas espécies ainda não é uma realidade (Baldiasserotto & Gomes, 2010). Várias dessas espécies têm sido objetos de pesquisa, no exterior e no Brasil, em função do seu potencial na produção de carne de qualidade, no mercado esportivo e ornamental (Meurer et al., 2010; Tonini et al., 2007).

1.1 *Centropomus paralellus* (Robalo peva)

O *Centropomus parallelus* Poey 1960 é um peixe ósseo da família Centropomidae, da ordem dos Perciformes, com uma distribuição geográfica que vai da Carolina do Norte, nos Estados Unidos da América, até a Santa Catarina no Brasil, sendo encontrados na região costeira de águas quentes (Cerqueira, 2010).

Eles são diádromos, eurihalinos, estenotérmicos e estuarino-dependentes e raramente surgem em lagos ou lagoas que não possuam ligação permanente ou intermitente com o mar (Muhlia-Melo, 1995).

No Brasil, o *Centropomus parallelus* é uma das quatro espécies de robalos registradas nas águas salgadas e salobras da costa leste brasileira, do estado de Santa Catarina até Maranhão (Cerqueira, 2010).

O *Centropomus parallelus* (robalo peva) tem como característica um corpo alongado, comprimido, com o dorso convexo acentuado, e suave concavidade abaixo dos olhos, boca grande, dentes pequenos em forma de agulha nas maxilas, no vômer e nos palatinos. Ele apresenta uma carne de excelente qualidade organoléptica, baixo nível de gordura e valor calórico, bom teor de ácidos graxos poli-insaturados e cor branca, alcança um alto valor nos mercados interno e externo (Cerqueira, 2010). Além desse potencial, ele tem tido um importante valor nas atividades pesqueiras e esportiva (Soligo, 2007).

1.2 Nutrição proteica

As exigências nutricionais dos animais variam de acordo com o hábito alimentar, com a espécie e com a fase de criação (Cotan et al., 2006). Os profissionais da área de piscicultura têm concentrado esforços que permitam formular dietas para atender as exigências dos animais, com um bom custo de produção e menor impacto ambiental, ou seja, rações sustentáveis (Trushensk, Kasper & Kohler, 2006).

A proteína representa aproximadamente 70% do peso total dos peixes sendo o principal constituinte dos tecidos estruturais, moles e dos fluidos corporais (Lall & Anderson, 2005). Ela após ser consumida é hidrolisada resultando aminoácidos livres, que são absorvidos no intestino e distribuídos pelo sangue para as células

onde participarão da formação de novas proteínas para o crescimento, reprodução e manutenção (Lall & Anderson, 2005).

Na nutrição dos peixes são necessários 20 aminoácidos, sendo metade de aminoácidos essenciais, e a outra metade de não essenciais. Os aminoácidos essenciais (lisina, metionina, triptofano, arginina, histidina, treonina, leucina, isoleucina, valina e fenilalanina) são aqueles que os animais não conseguem sintetizar ou o sintetizam em quantidades insuficiente sendo necessários estar presentes na dieta. Já os aminoácidos não essenciais podem ser sintetizados pelo próprio organismo a partir de outro (Jobling, 2001).

Na alimentação, a nutrição proteica recebe uma atenção especial dos nutricionistas, porque ela é um dos mais importantes nutrientes na composição da dieta além de ser a mais cara (Souza et al., 2011).

Determinar o nível ótimo de proteína na dieta dos peixes, para promover o melhor desempenho animal, alcançar bom retorno econômico e minimizar o impacto ambiental, é um grande desafio (Braga & Baião, 2001). As necessidades nutricionais, para os peixes de água doce, estão bem determinadas o que não acontece para as espécies marinhas (NRC, 1993).

Na criação de robalo peva, há carência de estudos científicos nas áreas zootécnicas, econômica e ambiental. Essa carência de informações tem atrasado o crescimento da produção comercial de robalo peva.

O teor ideal de proteína bruta na dieta de robalo ainda não está determinado. Souza et al. (2011) pesquisando seis rações com teores de proteína bruta variando entre 37,5% a 49%, para o robalo peva, verificaram que a dieta com 49% promoveu melhor ganho de peso, redução no custo médio de alimentação, aumento no índice de eficiência econômica e redução no índice de custo. Eles relataram que novos estudos devam ser realizados, a partir da concentração de 49% de proteína na dieta,

para obtenção de novos índices, uma vez que não se atingiu o nível máximo de proteína para o máximo desempenho. Outra sugestão deles é que se analisem a digestibilidade das dietas e relacione com os índices zootécnicos e custo de ração.

Garcia (2001) também avaliou dietas com teor diferentes de proteína bruta (43, 47, 52 e 57%) no crescimento e composição corporal de juvenis de robalo-peva (*Centropomus parallelus*). Foi verificado aumento significativo na concentração de amônia total com o aumento da concentração da proteína na dieta (0,25 mg L⁻¹ e 0,64 mg L⁻¹ para dietas com 43 e 57% de proteína, respectivamente). As dietas de 52 e 57% de proteína foram significativamente superiores a de 47% quando foi avaliada a taxa de crescimento específico, porém os parâmetros: ganho de peso, taxa de conversão alimentar, razão de eficiência protéica e o valor e valor produtivo da proteína não apresentaram diferenças significativas entre as dietas. Conclui-se então que dieta de 43% proteína é a mais recomendada porque promove crescimento similar às demais dietas, com menor custo e menor comprometimento da qualidade de água.

Barbosa et al. (2011) investigaram o crescimento de robalos peva, alimentados com uma dieta comercial de 55,3% de proteína bruta, suplementados ou não com probióticos. Verificaram que a adição de probiótico não promoveu diferença significativa no crescimento, sobrevivência, taxa de crescimento específico, conversão alimentar e composição corporal.

Para Cerqueira (2010), os robalos necessitam de dietas com teores maiores de 50% de proteína para que possam expressar seu máximo desempenho produtivo. Para Giri et al. (2011), a quantidade proteica deve estar acompanhada da sua qualidade para expressar todo potencial zootécnico. O valor biológico de uma dada proteína na dieta depende tanto de sua digestibilidade quanto de seu equilíbrio de aminoácidos em relação aos requerimentos nutricionais dos peixes (NRC, 2011).

Quando os peixes consomem dietas deficientes de aminoácidos, as taxas de crescimento e de conversão alimentar pioram (Hardy, 2001). Entretanto, o consumo de proteína em excesso também promove prejuízo, porque parte dela será convertida a energia, não sendo usada para compor novas proteínas corporais (Lall & Anderson, 2005), irá aumentar o custo de produção (Deng et al, 2011; Hassani et al., 2011; Abdel-Tawwab et al., 2010), aumentar o teor de lipídios na carcaça de peixes (Abimorad & Carneiro, 2007) e elevar a excreção de produtos nitrogenados na água promovendo prejuízo ambiental e animal (Saavedra et al., 2009; Bechara et al., 2005).

1.3 Impacto ambiental da piscicultura

A qualidade da água de cultivo nos sistemas de criação de peixes é importante para obtenção de bons índices de produção, crescimento, reprodução, saúde, sobrevivência, qualidade e bem estar dos peixes e do meio ambiente.

Os parâmetros da água na criação de robalo devem estar dentro dos limites de 22 a 30 °C para temperatura, 5 a 6 mg L⁻¹ de oxigênio dissolvido, 35‰ de salinidade e 0,90 mg L⁻¹ de amônia não ionizada em pH 8 (Cerqueira, 2010, Okelsrud & Pearson, 2007).

Na piscicultura intensiva a fonte principal da alimentação é por meio da ração alto teor de proteína, e como os animais consomem somente parte do alimento fornecido, parte é disponibilizado para o meio aquático provocando impacto ambiental (Ye et al., 2015; Pillay, 2004) em função do aumento na concentração de amônio e amônia não ionizada (NH₄⁺ e NH₃-N), nitrito (NO₂), fósforo e do acúmulo de matéria orgânica nos sedimentos provocando uma maior demanda do oxigênio dissolvido na água e aumento na concentração de substâncias tóxicas resultando em uma piora na qualidade da água (Ye et al., 2015; Pietras et al., 2006).

A qualidade da água tende a diminuir com o aumento dos níveis de proteína na dieta, pois resulta em um aumento do catabolismo de aminoácidos no corpo do peixe, e consequentemente maior excreção de nitrogênio amoniacal na água de cultivo (Green and Hardy, 2008; Webb e Gatlin III, 2003; Yang et al., 2002).

A maioria das espécies de peixes não toleram altas concentrações de amônia, principalmente na forma não ionizada, porque causam vários problemas durante a criação, tais como a redução da taxa de crescimento e mortalidade em massa (Benli et al., 2008; Le François et al. 2008; El-Shafai et al., 2004). Além disso, uma elevada descarga de amônia no ambiente pode contribuir fortemente para a eutrofização da água causando impacto ambiental (Ye et al., 2015; Sinha et al., 2013; Pillay, 2004; Boyd, 2003).

Webb e Gatlin III (2003) estudando "red drum" (*Sciaenops ocellatus*) e Cheng, Hardy e Usry (2003) estudando truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) verificaram que o aumento do teor de proteína na dieta promoveu maior excreção da amônia na água de cultivo. A diminuição na quantidade de proteína bruta de 42% para 37%, promoveu uma diminuição na excreção total de amônia em 12%, corroborando com a afirmação de que existe uma relação direta entre a ingestão de proteína e a excreção de amônia nos peixes (Abdel-Tawwab et al., 2010; Melo et al., 2006; Peres & Oliva-Teles, 2001).

1.4 Testes toxicológicos na avaliação do Impacto ambiental da piscicultura

Para avaliar e controlar as alterações na qualidade da água, proveniente dos nutrientes dissolvidos, são usadas, dentre outras, análises de química analítica (Tello et al., 2010) e testes ecotoxicológicos. As análises químicas realizadas isoladamente não fornecem informações sobre os efeitos biológicos causados aos organismos aquáticos (Sarà, 2007), mas o uso de testes ecotoxicológicos,

internacionalmente recomendados, permite avaliar, por meio de organismos vivos, a influência de interações aditivas, sinérgicas e/ou antagônicas que podem interferir na biodisponibilidade e na toxicidade dos compostos químicos (Anderson et al., 2010; Hernando et al., 2007; Wolska et al., 2007).

Nos ensaios ecotoxicológicos, os organismos-teste são expostos a diferentes concentrações de substâncias químicas, amostras ambientais (efluentes e sedimentos) e variáveis ambientais (pH, oxigênio, temperatura) afim de determinar os efeitos destes no desenvolvimento dos organismos durante o período da exposição (Chapman & Long, 1983). Esses ensaios, em geral, são rápidos (apresentam resposta biológica entre algumas horas a alguns dias), simples (organismos utilizados são fáceis de capturar e manter no laboratório antes do teste), têm metodologia bem definida, são de baixo custo e podem avaliar várias amostras de uma só vez (César et al., 2009).

Muitos organismos marinhos são utilizados, como organismos-teste, nos ensaios ecotoxicológicos tais como: ouriços, misidáceos, artemia, copépodos e algas, sendo que o ouriço do mar tem sido usado regularmente para avaliar a toxicidade da água e dos sedimentos (Beiras et al., 2003; César et al., 2009). Ele tem sido um dos organismos testes mais utilizados nas pesquisas para avaliação ambiental (Carballeira et al., 2012; Carballeira et al. 2011, Cesar-Ribeiro & Palanch-Hans, 2010; Marin et al. 2007) porque as suas larvas e os embriões são sensíveis aos produtos nitrogenados excretados (Saco-Alvarez et al., 2010).

Marin et al. (2007) utilizando o teste de toxicidade, sobre o desenvolvimento de embrião de ouriço, na avaliação do impacto ambiental do alimento não consumido e da excreção dos peixes, presentes nos sedimentos dos tanques de duas piscicultura do Mediterrâneo, em duas estações (inverno e verão), concluíram que o uso do teste de toxicidade com ouriço promove uma avaliação de impacto

ambiental rápida e a baixo custo sendo altamente benéfico para a indústria da aquicultura.

Carballeira et al. (2012) estudaram o impacto ambiental de oito efluentes de piscicultura, na costa da Espanha, usando: bactéria bioluminescente, o crescimento de microalgas (*Phaeodactylum tricornutum* e *Isochrysis galbana*) e o teste de desenvolvimento embriolarval de ouriço do mar (*Paracentrotus lividus* e *Arbacia lixula*) e verificaram que os ouriços do mar foram os organismos-teste mais sensíveis, em metade das fazendas analisadas, e na outra metade, mostrou o mesmo efeito das microalgas

O teste de desenvolvimento sobre embriões de ouriço do mar é um método eficiente para verificar o efeito de poluentes específicos e misturados sobre a biota (Beiras et al., 2003; Cesar et al., 2009).

REFERÊNCIAS

- Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., Khattab, Y.A.E., Shalaby, A.M.E. (2010). Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 298, 267–274. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.10.027
- Abimorad, E.G.; Carneiro, D.J. (2007). Digestibility and performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. *Aquaculture Nutrition*, 13:1-9. doi: 10.1111/j.1365-2095.2007.00438.x
- Anderson, B.S.M; Phillips, B.M.; Hunt, J.W.; Clark, S.L.; Voorhees, J.P.; Tjeerdema, R.S.; Casteline, J.; Mekebri, A. (2010). Evaluation of methods to determine causes of sediment toxicity in San Diego Bay, California, USA. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 534-540.
- Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. (2010). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2 ed. Santa Maria, Editora da UFSM.
- Barbosa, M.C.; Jatobá, A.; Vieira, F.N.; Silva, B.C.; Mourino, J.L.P.; Andreatta, E.R.; Seiffert, W.Q.; Cerqueira, V.R. (2011). Cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, 795-801.
- Bechara, J.A.; Roux, J.P.; Díaz, J.R.F.; Quintana, C.I.F.; Meabe, C.A.L. (2005). The effect of dietary protein level on pond water quality and feed utilization efficiency of pacú *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Aquaculture Research*, 36:546-553. doi:10.1111/j.1365-2109.2005.01252.x
- Beiras, R.; Bellas, J.; Fernández, N.; Lorenzo, J.I.; Cobelo-García. (2003). Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryo-larval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Marine Environmental Research*, 56, 531-553.
- Benli, A.Ç.K.; Köksal, G.; Özkul, A. (2008). Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere*, 72: 1355–1358.

- Boyd, C.E. (2003). Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. *Aquaculture*, 226: 101– 112
- Braga, J.P.; Baião, N.P. (2001). O conceito de proteína ideal na formulação de ração para frangos de corte. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, 34, 29-37.
- Carballeira, C.; Martín-Díaz, L.; DelValls, T.A. (2011). Influence of salinity on fertilization and larval development toxicity tests with two species of sea urchin. *Marine Environmental Research* 72, 196-203.
- Carballeira, C.; Ramos-Gómez, J., Martín-Díaz, L., DelValls, T.A. (2012). Identification of specific malformations of sea urchin larvae for toxicity assessment: Application to marine pisciculture effluents. *Marine Environmental Research* 77, 12-22.
- Cerqueira V.R. (2010) Cultivo de robalo-peva (*Centropomus parallelus*). In: Baldisserotto B., Gomes L.C. (Eds.), *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*, Santa Maria, UFSM, pp.489-520.
- Cesar, A., Marín, A., Marin-Guirao, L., Vita, R., Lloret, J.; DelValls, T.A. (2009). Integrative ecotoxicological assessment of sediment in Portmán Bay (southeast Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1832-1841.
- Cesar-Ribeiro, C.; Palanch-Hans, M.F. (2010). Chronic toxicity test with sea urchin *Echinometra lucunter* and *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea), exposed to light-stick - flag paternoster used for longline surface fishing. *Brazilian Journal of Oceanography*, 58(3), 71-75.
- Chapman, P. M.; Long, E. R. (1983). The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Marine Pollution Bulletin*, 14(3), 81-84
- Cheng, Z.J.; Hardy, R.W.; Usry, J.L. (2003) Plant protein ingredients with lysine supplementation reduce dietary protein level in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets, and reduce ammonia nitrogen and soluble phosphorus excretion. *Aquaculture*, 218: 553-565

- Cotan, J.L.V.; Lanna, E.A.T.; Bom fim, M.A.D.; Donzele, J.L.; Ribeiro, F.B.; Antonio Serafini, M.A. (2006). Níveis de energia digestível e proteína bruta em rações para alevinos de lambari tambuí. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 634-640.
- Deng, D.F.; Ju, Z.Y.; Dominy, W.; Muraxhige, R.; Wiolson, R.P. (2011). Optimal dietary protein levels for juvenile Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) fed diets with two levels of lipid. *Aquaculture*, 316, 25-39.
- El-Shafai S.A., El-Gohary F.A., Nasr F.A., Steen N.P., Gijzen H.J. (2004). Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 232, 117–127. doi:10.1016/S0044-8486(03)00516-7
- FAO (2013). Global aquaculture production statistics 2011. Fisheries and Aquaculture Department of the Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 115p.
- FAO. (2010). The State of World Fisheries and Aquaculture 2008. Rome: FAO.
- Garcia, A.S. (2001). Influência do nível de proteína da dieta no crescimento e composição corporal de juvenis do robalo peva *Centropomus parallelus* Poey, 1860. 2001. 44p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Giri, S.S.; Sahoo, S.K.; Paul, B.N.; Mohanty, S.N.; Sahu, A.K. (2011). Effects of dietary protein levels on growth, feed utilization and carcass composition of endangered bagrid catfish *Horabagrus brachysoma* (Gunther 1864) fingerlings. *Aquaculture Nutrition*, 17, 332-337.
- Gracia-López, V.; García-Galano, T.; Gaxiola-Cortés, G.; Pacheco-Campos, J. (2003). Efecto del nivel de proteína en la dieta y alimentos comerciales sobre el crecimiento y la alimentación en juveniles del robalo blanco, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). *Ciencias Marinas*, 29, 585-594.
- Green, J.A.; Hardy, R.W. (2008). The effects of dietary protein:energy ratio and amino acid pattern on nitrogen utilization and excretion of Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Biology* 73, 663–668.

- Hardy, R.W. (2001). Nutritional deficiencies in commercial aquaculture. In Lim, C.; Webster, C.D. Nutrition and fish health. Binghamton, The Haworth Press. p.131-147.
- Hassani, M.H.S.; Mohseni, M.; Hosseini, M.R.; Sadati, M.H.Y.; Pourkazemi, M. (2011). The effect of various levels of dietary protein and lipid on growth and body composition of *Acipenser persicus* fingerlings. *Journal of Applied Ichthyology*, 27, 737-742.
- Hernando, M.D., De Vettori, S., Martínez Bueno, M.J. & Fernández-Alba, A.R. (2007). Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere*, 68, 724-730.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. (2013). Produção da Pecuária Municipal. Prod. Pec. munic., Rio de Janeiro, 41,1-108.
- Jovling, M. (2001). Feed composition and analyses. In Houlihan, D.; Boujard, T.; Jobling, M. Food intakes in fish. Malden, Blackwell Science, p.1-24.
- Lall, S.P.; Anderson, S. (2005). Amino acid nutrition of salmonids: dietary requirements and bioavailability. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 63, 73-90.
- Le François, N.R.; Savoie A.; Siikavuopio, S.I. (2008). Gill metabolic and osmoregulatory responses of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) to chronic ammonia exposure. *Journal of Applied Ichthyology*, 24: 112–115.
- Marin, A., Montoya, S., Vita, R., Marín-Guirao, L., Lloret, J.; Aguado, F. (2007). Utility of sea urchin embryo–larval bioassays for assessing the environmental impact of marine fishcage farming. *Aquaculture*, 271, 286–297.
- Melo, J.F.B.; Lundstedt, L.M.; Meton, I.; Baanante, I.V.; Moraes, G. (2006). Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145: 181-187.
- Meurer, F.; Oliveira, S.T.L.; Santos, L.D.; Oliveira, J.S.; Colpini, L.M.S. (2010). Níveis de oferta de pós-larvas de tilápia do Nilo para alevinos de pacamã (*Lophosilurus alexandri*). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 5, 111-116.

- Nutrient Requirement Council-NRC. (1993). Nutrient requirements of fish. Washington, Estados Unidos, National Academy Press.
- Nutrient Requirement Council-NRC. (2011). Nutrient requirements of fish. Washington, Estados Unidos, National Academy Press.
- Okelsrud, A.; Pearson, R.G. (2007). Acute and Postexposure Effects of Ammonia Toxicity on Juvenile Barramundi (*Lates calcarifer* [Bloch]). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 53: 624–631.
- Peres, H.; Oliva-Teles, A. (2001). Effect of dietary protein and lipid level on metabolic utilization of diets by european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. Fish Physiology Biochemistry, 25: 269-275
- Piedras, S.R.N.; Pouey, J.L.O.F.; Moraes, P.R.R.; Cardoso, D.F. (2006). Lethal concentration (CL50) of un-ionized Ammonia for Ppejerrey larvae in acute exposure. Sci. Agric. 63, 184-186.
- Pillay, T.V.R. (2004). Aquaculture and environment. 2 ed. Blackwell Publishing, Oxford, USA.
- Saavedra, M.; Pousão-Ferreira, P.; Yúfera, M.; Dinis, M.T.; Conceição, L.E.C. (2009). A balance amino acid diet imptoves *Diplodus sargus* larval quality and reduce nitrogen excretion. Aquaculture Nutrition, 15:517-524. doi: 10.1111/j.1365-2095.2008.00618.x
- Saco-Alvarez L.; Duran I.; Lorenzo J.L.; Beiras R. (2010). Methodological basis for the optimization of a marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. Ecotox. Environ. Safe. 73, 491–499. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.01.018
- Sanches, E.G.; Oliveira, I.R.; Serralheiro, P.C.S.; Ostini, S. (2011). Cultivo de robalo peva (*Centropomus parallelus*) em sistema de recirculação. Arq. Cien. Mar. 44, 40-46.
- Sarà, G.(2007). A meta-analysis on the ecological effects of aquaculture on the water column: dissolved nutrients. *Marine Environmental Research*, 63, 390-408

- Silva, J.E. (1976) Fisiocologia do camorim, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). Estudo experimental em ambiente confinado. São Paulo. 101p. (Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo).
- Silva, S.S.; Gunasekara, R.M.; Collins, R.A.; Ingram, B.A. (2002). Performance of juvenile Murray cod, *Maccullochella peelii peelli* (Mitchell), fed with diets of different protein to energy ratio. *Aquaculture Nutrition*, 8, 79-85.
- Sinha, A.K.; Giblen, T.; AbdElgawad, H.; De Rop, M.; Asard, H.; Blust, R.; Boeck G. (2013). Regulation of amino acid metabolism as a defensive strategy in the brain of three freshwater teleosts in response to high environmental ammonia exposure. *Aquatic Toxicology*, 130-131: 86-96.
- Soligo, T.A. (2007). Primeiras experiências com a reprodução, larvicultura e desmame do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis* no Brasil. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, 40p.
- Souza, J.H., Fracalossi, D.M., Garcia, A.S., Ribeiro, F.F., Tsuzuki, M.Y., 2011. Desempenho zootécnico e econômico de juvenis de robalo-peva alimentados com dietas contendo diferentes concentrações proteicas. *Pesq. Agropec. Bras.* 46,190-195.
- Tello, A., Corner, R.A. & Telfer, T.C. (2010). How do land-based salmonid farms affect stream ecology? *Environmental Pollution*, 158, 1147-1158.
- Tonini W.C.T.; Braga L.G.T.; Vila Nova D.L.D. (2007). Dieta de juvenis do robalo *Centropomus parallelus* POEY, 1860 no sul da Bahia, Brasil. *B. Inst. Pesca*, 33, 85 - 91.
- Trushenski, J.T.; Kasper, C.S.; Kohler, C.C. (2006). Challenges and opportunities in finfish nutrition. *North American Journal of Aquaculture*, 68, 122-140.
- Webb, K.A.; Gatlin III, D.M. (2003). Effects of dietary protein level and form on production characteristics and ammonia excretion of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 225: 17-26.

- Wolska, L., Sagajdakow, A., Kuczynska, A.; Namiesnik, J. (2007). Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: possibilities and problems. Trends in Analytical Chemistry, 26, 332-344.
- Yang, S.D.; Liou, C.H.; Liu, F.G. (2002). Effects of dietary protein level on growth performance, carcass composition and ammonia excretion in juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). Aquaculture, 213: 363-372.

ARTIGO 1

Protein levels for juvenile I fat snook *Centropomus parallelus* with an environmental approach

Submetido à revista Aquatic Living Resouces em 11 de agosto de 2015

Abstract

The aim of this study was to evaluate the growth, economic performance, ammonia excretion, and effluent toxicity of juvenile I fat snook (*Centropomus parallelus*) fed five diets containing 400, 440, 480, 520 and 560 g protein kg⁻¹. The weight gain and the specific growth rate were positively affected by the protein concentration increase. The survival rate did not differ between the experimental concentrations, while the final average weight and feed conversion ratio were significantly lower in the fish fed with 400 g kg⁻¹. The average cost of the diet was significantly higher for the protein concentration of 400 g kg⁻¹, and the index of economic efficiency was significantly lower for the concentrations of 520 and 560 g kg⁻¹. Ammonia excretion increased with dietary protein level. The results of toxicity test, considering the larval development of the sea urchin *Echinometra lucunter* showed toxic effects when the fish were fed with 520 and 560 g kg⁻¹. From the growth and economic points of view, the rations with best results were 520 and 560 g kg⁻¹ of protein, but from an environmental point of view, the 480 g.kg⁻¹. These results show the importance of addition of regulamentary means to mitigate the impact of fat snook production.

Keywords: growth, economic performance, ammonia excretion, effluent toxicity

1. Introduction

Brazil has a great potential to promote marine fish farming due its diversity of native coastal species with high economic value and wide acceptance in the consumer market. Additionally, its coastline of approximately 8400 km and its enabling environment are also positive factors (Cerqueira 2013). In most developing countries, like Brazil, marine fish farming still takes place in experimental range (Baldan and Bendhack 2009). Brennan and Leber (2001) report that in marine fish farming the fish of the genus *Centropomus* (Centropomidae), including the *C. undecimalis* (Common snook) and *C. parallelus* (Fat snook) have the potential for aquaculture despite not having a culture of large-scale commercial cultivation.

O *C. parallelus* is one of the few species of marine fish in Brazil with research in the areas of nutritional program and larviculture (Cerqueira and Brugger 2001; Alvarez-Lajonchère et al. 2002; Gracia-López et al. 2003; Ferraz et al. 2011), frequency of feeding strategies and densities (Ribeiro and Tsuzuki 2010) but Cerqueira (2013) reports that the information of the nutritional requirements for the fat snook are insufficient to establish adequate diets for growing species. In addition, the impact of the creation of this species on the environment are not known (Souza et al. 2011).

It is known that the fat snook for being carnivorous requires a diet with a high content of protein in order to provide amino acids for muscle development, the formation of enzymes and hormones in addition to serving as a source of energy (Souza et al., 2011). In accordance with the recommendations of the Nutrient Requirements of Fish (NRC 1993), the requirement of carnivorous fish in relation to crude protein is around 400 e 500 g kg⁻¹, however these levels were determined with semi-purificadas diets with high digestibility. Dias et al.(1998) verified that the diet with PB of 43 and 501 kcal digestible energy of 100 g-1 provided better production

rates for seabass (*Dicentrarchus labrax*). However, Souza et al. (2011) evaluating the performance and cost of Fat snook (*Centropomus parallelus*) fed with six types of feed have found that with 49 of PB and ration protein energy of 7.27 Mcal kg⁻¹ provided better rates production and economical.

Carnivorous fish diets with high protein content they are very common which leads to an increased discharge of nitrogen (N) in ecosystems. It is important to endeavor to reduced the amount of protein to maintain to maintain ecosystem environmental (Verdegem 2013). The of large fration anual of 120 million metric tonnes of N₂ is converted into reactive N-forms, slowly eroding the resilience of earth support systems (Rockstrom et al. 2009). The quantity and quality of nitrogen produced by the residues are related to species, feeding and production system (Verdegem 2013). Para Kubitza (1999), the unionized ammonia values above 0.20 mg. L⁻¹ is sufficient to induce chronic toxicity and decrease the growth and tolerance of fish to disease. He reports that levels of ammonia between 0.70 and 2.40 mg. L⁻¹ can be lethal to the fish, when exposed for a short period and that continuous exposure to toxic ammonia concentrations above 0.02 mg. L⁻¹ can cause intense irritation and inflammation in the gills. He describes a good growth of fish can be obtained when water production units to present, among others, the following characteristics: dissolved oxygen greater than 5 mg. L⁻¹; carbon dioxide below 10 mg. L⁻¹; concentrations of unionized ammonia below 0.05 mg. L⁻¹; pH between 6.5 and 8.5. Ammonia is a toxic compound that can put the bass in terms of risk and there is little information reported in relation to toxicity. In intensive cultivation of juvenile with copies of 0.1 to 1.0 g of weight, the maximum observed value of ammoniacal nitrogen total of 1.5 mg L⁻¹, corresponding to 0.01 mg. L⁻¹ of non-ionized ammonia, and the results showed that if this condition does not remain constant and is episodic, there is a consequence in the cultivation of fish (Cerqueira 2013).

To determine the relative toxicity of a substance to an aquatic organism is important to the realization of the toxicity test to estimate the median lethal concentration (EC 50) of the substance in the water where the bodies are exposed (Martinez and Cólus, 2002). However, to ensure success in the production of native species is of fundamental importance to know the sensitivity of these species to water quality parameters, as the nitrogenous waste, since these are limiting factors for the survival and growth of fish in containment.

This test was used as Brazilian legislation work with discharged effluent without take in to consideration dilution power of the receptor water body and addition of filtrations systems.

Several studies that have determined the optimal concentration of protein for fish husbandry take into account the growth, yield and economic parameters but ignore the environmental aspects. Thus, the aim of this study was to determine the level of crude protein necessary to feed the juvenile I fat snook (*Centropomus parallelus*) that can promote greater growth, yield and economic viability and is also with lower discharge of ammonia.

2 Materials and Methods

Three experiments were conducted (growth and economic performance, ammonia excretion and effluent chronic toxicity) to evaluate the best concentration of protein for rearing the juvenile I fat snook, *Centropomus parallelus*. To make this determination, the following different dietary protein levels were tested: 400, 440, 480, 520 and 560 g kg⁻¹. The research was approved by the ethics committee for the use of animals in research of the Vila Velha University, Brazil (# 3072014).

2.1. Formulated Diets

The fish diet formulas were produced in a commercial animal food factory, and for all protein levels, the same ingredients were used: finely grind, mixed, extrudates (130°C), dried, packaged and stored at -18°C. The diet formulas were isocaloric, isolipidic and used the same premix. The pellet diameter was 2.5 mm. The composition of diets (g kg⁻¹) is shown in table 1.

Table 1. Composition of diets (g kg⁻¹) with different protein levels for juvenile I fat snook (*Centropomus parallelus*).

Ingredients (%)	Dietary protein level (g kg ⁻¹)				
	400	440	480	520	560
Fish flour 55	25	25	25	25	25
Fish guts 60	5	5	5	5	5
Toasted soy flour 44	8.41	9.85	11.29	5	5
Soy protein concentrate	5	5	5	5	5
Minced corn	18.29	12.00	5.72	3.45	2
Rice flour	10	10	10	10	10
Rice grits	10	10	10	10	6.04
Fish oil	2.8	2.9	3	3.07	3.05
Premix ¹	1	1	1	1	1
Whey gluten	2.50	7.25	11.99	20.48	25.91
Blood cells AP301	12	12	12	12	12
Proximate analysis (% of dry matter)					
Moisture	7,65	7,57	7,76	9,77	6,63
Crude protein	39,91	43,33	47,25	52,21	55,83
Nitrogen-free extract	30,53	24,56	21,82	15,16	15,75
Crude lipid	10,31	10,87	9,96	9,99	10,81
Crude fiber	1,52	3,33	3,16	2,59	2,19
Ash	10,07	10,42	10,61	10,00	8,84
Crude energy (Mcal/Kg) ²	4,55	4,68	4,72	4,75	4,98
P/E ratio (Mcal/Kg)	11,40	10,80	9,99	9,10	8,92

¹Premix Nutriave: Vit. A 2000,000.00 UI; Vit. D3 500,000.00; Vit. E 15,000.00 UI; Vit. K3 1,000.00 mg; Vit. B1 2,500.00 mg; Vit. B2 3,000.00 mg; Vit. B6 5,000.00 mg; Vit. B12 6,250.00 mg; Pantothenic Acid 3,750.00 mg; Niacin 10,000.00 mg; Folic Acid 1,250.00 mg; Biotin 1,250.00 mg; Choline 125,000.00 mg; Selenium 75.00 mg; Copper 3,750.00 mg; Iron 15,000.00 mg; Manganese 7,500.00 mg; Iodine 125.00 mg; Zinc 20,000.00 mg; ²Crude energy: calculated with the use of the average values of energy from combustion of nutrients (5,65 kcal/g crude protein; 9,40 kcal/g lipid e 4,15 kcal/g crude fiber e Nitrogen-free extract) (Maynardi; Loosli, 1974).

2.2. Experiment 1: Growth and Economic Performance

Six hundred juvenile I fat snook (3.69 ± 0.05 g and 7.46 ± 0.08 cm) were randomly distributed in 20 polyethylene tanks with a 400 L the volume of water maintained (30 fish per tank). The tanks were kept constantly aerated using an air

stone, and the temperature was controlled at 28°C with the aid of a 400 W thermostat. The water was collected directly from the sea, and on the common water intake line passed through a filter system with a sequence of Cuno filters (20, 10, and 5 µm) and was sterilized using an ultraviolet filtration system (Bio-Logic Pure Water Pack System). The tank water was cleaned twice a day to remove feces and spare rations and the water was 50% of the volume removed daily.

The experimental design was completely randomized with five treatments (protein level: 400; 440, 480, 520 and 560 g.kg⁻¹) and four replicates. The fish were fed daily with a feed amount equal to 2% of biomass divided into two meals (8:00 am and 4:00 pm). To measure the water quality parameters (total ammonia and nitrite) weekly water samples from each experimental unit were collected using a plastic bottle (1,000 mL). Analysis the ammonia total and nitrite was according to the American Public Health Association (APHA 2012). All the analysis were done in triplicate. The parameters of dissolved oxygen (mg.L⁻¹), temperature (°C) and salinity were monitored daily.

At the end of the experimental period (60 days), the fish were submitted to 24 h fasting for emptying the digestive tract and then were anesthetized with benzocaine (50 mg.L⁻¹) for biometric analysis.

The following parameters were analyzed: survival, weight gain, specific growth rate, feed conversion rate and biomass. They were calculated using the following formulas:

$$\text{Survival (S, \%)} = 100 \times (\text{initial number of fish} / \text{final number of fish})$$

$$\text{Weight gain (WG, g)} = \text{final weight} - \text{initial weight}$$

Specific growth rate (SGR; %/day) = $100 \times (\ln W_2 - \ln W_1) / t$, where W_1 and W_2 are the initial and final weight respectively, and T is the number of days in the feeding period;

Feed conversion rate (FCR) = feed intake (g)/ weight gain (g);

Biomass (g) = S x WG

For the analysis of Apparent net protein retention (ANPR), 20 fish were taken randomly from the initial batch of fish, and at the end of the experiment four fish were captured from each tank. The fish were euthanized with a benzocaine overdose (200 mg.L⁻¹) and frozen for later analysis of the whole fish protein according to the methodology described in the Association of Official Analytical Chemists (AOAC 2000). The following formula was used to calculate the ANPR (%) = 100 x (final body protein - initial body protein/ protein consumed).

The costs of the fish feed were calculated using the market price multiplied by the quantity of each ingredient; the values for each ingredient were then added to determine the total values. The cost of the five treatments (protein level: 400; 440, 480, 520 and 560 g.kg⁻¹) had four replicates.

The following indicators were used to assess the feed costs: feed cost per kg fish production (FC) and economic efficiency index (EEI) using the equations: FC (feed cost/Kg⁻¹ fish) = average ration consumed X average price ration / weight gain; EEI (%) = (minor average cost observed in feed per kg of weight gain between treatments / average cost treatment considered) x100.

The average data of Weight gain and Specific growth rate were subjected to regression analysis. The body composition and economic data were subjected to an ANOVA followed by the Tukey test at the 5% level of significance.

2.3. Experiment 2: Ammonia excretion

At the end of the growth and economic performance experiment, the juvenile fat snook (n = 90; weight, 7.53 ± 0.74 g) were transported to the Ichthyology laboratory UVV. The animals (n = 18 for each aquarium) were divided and acclimated

in five aquariums the 25 L for 30 day. Before the start of the experiment, one fish were transferred to 5 L aquariums at each protein level (n = 14 aquariums for each protein level - 400, 440, 480, 520 and 560 g.kg⁻¹ -, totalling 70 experimental aquariums). The fish were anesthetized with a solution of 0.1 g.L⁻¹ of benzocaine and weighed. The average biomass of each aquarium was then determined. The fish were fed at the rate of 2% of the biomass and acclimated under those conditions for 1 month. The amount of water in each tank was determined according to the density of 1 g L⁻¹. The experimental design was completely randomized with five protein levels (400, 440, 480, 520 and 560 g kg⁻¹) and 14 replicates. An air stone was used for continuous aeration in each aquarium, and 50 % of the water was changed daily.

Before starting the experimental period, the aquariums were washed and received clean water. The fish were anesthetized with benzocaine (50 mg L⁻¹) and weighed. Afterwards, fish were returned to their respective aquarium, and fasted for 48 hour to empty the digestive tract. After the fasting period, all 70 aquariums had 100% of their water replaced and the animals received 1% of their biomass in food. The experiment lasted 48 hours, and during this period the animals were not fed and the water was not changed. During the experiment, the water presented the following characteristics (no difference between treatments): conductivity 49.95± 0.17 mS/cm, salinity 31.91±0.05, temperature 25.19±0.11 °C, dissolved oxygen 5.77±0.06 mg L⁻¹ and pH 8.74±0.06.

Water was collected from each tank at the beginning and end of the experiment. Analyses for the determination of the total ammonia were carried out immediately after each sample collection. Ammonia analysis was performed by the endofenol method, in accordance with the APHA (2012).

The excretion of ammonia was calculated according to Altinok and Grizzle (2004) using the following formula: excretion rate= {[FAC-IAC / g total] / L}, where

FAC corresponds to the final ammonia concentration and IAC corresponds to the initial ammonia concentration, which was divided by the biomass of each tank and finally divided by 3 (which corresponds to the amount of water in each tank in L). The average result of the excretion of ammonia for different concentrations of protein was subjected to an exponential regression analysis with the program SigmaStat 12.5.

2.4. Experiment 3: Toxicity test using sea urchin (Echinodermata: Echinoidea)

The toxicity test, considering the larval development of the sea urchin *Echinometra lucunter*, followed the international methodologies of the Environmental Protection Agency of the United States of America (USEPA 2002) and Environment Canada (1999) with adaptations by the Brazilian Association of Technical Standards NBR 15350: 2012 (2012). This test was used as this is the only one preconized by Brazilian environmental legislation to regulate gross effluent from antropical activities, like fish culture.

Two hundred and sixty-five juvenile fat snook were used from the first experiment, and the fish were not mixed between treatments. The fish that received a given level of protein in the first experiment continued receiving this level of protein in the toxicity test. The fish were anesthetized with benzocaine (50 mg L^{-1}), weighed and returned to their tank. Each protein level (400, 440, 480, 520 and 560 g kg^{-1}) had four replicates. Twenty 500 L polyethylene tanks were used in a density of 2 g L^{-1} (12 to 14 fish in 160 to 165 L of water in each tank) where they stayed for 15 days for adaptation. During this period, the fish were fed daily with 2% of biomass with their respective feed, and each tank had a daily exchange of 50% of the water. Two days before starting the trial period, the tanks were washed and the fish starved for 48 hour to empty the digestive tract. At the end of the period of fasting, all tanks had 100% of the water replaced and fish from each experimental unit was fed with 2% of

their biomass. Afterwards, the animals were not fed, and water exchange was not conducted. Forty-eight hours after feeding, 1 L of the water from each tank was collected to perform the toxicity testing. The quality of the water used in the toxicity tests is described in Table 2.

Table. 2. Water quality parameters during sea urchin test to evaluate the effluent toxicity for juvenile I fat snook (*Centropomus parallelus*) fed with different protein level. Data are presented as mean and standard error. Cond. = Conductivity, Temp. = Temperature, DO = Dissolved Oxygen, TA = Total ammonia and UA = Un-ionized ammonia.

Parameters	Dietary protein level (g kg ⁻¹)				
	400	440	480	520	560
Cond. (mS cm ⁻¹)	49.43±0.13	48.63±0.12	48.88±0.11	48.54±0.07	48.88±0.12
Salinity (ppt)	33.25±0.21	33.13±0.28	33.65±0.20	33.55±0.18	33.45±0.22
Temp. (°C)	24.9 ±0.19	25.08±0.18	24.92±0.17	25.15±0.12	25.20±0.14
DO (mg L ⁻¹)	7.83±0.27	7.65±0.22	7.88±0.21	7.75±0.21	7.78±0.22
pH	8.28±0.01	8.20±0.06	8.21±0.03	8.28±0.01	8.25±0.03
TA (mg L ⁻¹)	0.19±0.08	0.21±0.03	0.21±0.07	0.22±0.09	0.25±0.04
UA (µg L ⁻¹)	16.01±6.79	17.56±2.18	17.67±5.58	18.20±7.56	21.14±3.70

Adults of *E. lucunter* were collected at sea in Vila Velha (Espírito Santo State, Brazil). For spawning, 2.5 mL of potassium chloride (KCl to 0.5 M) was injected into the sea urchins (n= 6, 3 males and 3 females) in the intracoelomic region for the collection of gametes and subsequent fertilization to obtain eggs.

The experimental design was completely randomized with water from the five treatments with dietary protein levels of 400, 440, 480, 520 and 560 g kg⁻¹. Each treatment had four repetitions each with 5 replicates for the chronic toxicity test,

totaling 100 tests. The tests were conducted in tubes containing 10 ml of the water collected in the rearing tanks. In each tube, approximately 300 sea urchin eggs were added; at least 90% of these were divided into two blastomeres. Eggs exposed to water of different protein levels were maintained under controlled conditions of temperature (26° C) and a light-dark cycle of 12:0 for 36 hours or until the pluteus phase was achieved on the control tubes. With a minimum of 80% of pluteus present in the control vial, the test was terminated and two drops of formalin buffered with borax was added. The pluteus were counted under a microscope with one Sedgwick-Rafter chamber, and their morphology was used to identify normal and abnormal larvae, checking the occurrence of anomalies in the first 100 organisms.

For validation of the tests, two procedures were simultaneously conducted with the experiment: 1) a control with seawater (10 repetitions), filtered and sterilized by UV to remove possible bacteria and algae. The test was considered valid when presented at least 80% fertilized eggs; 2) a test was conducted for the determination of a EC 50 with a reference substance. The reference substance, zinc sulfate, was tested in concentrations of: 0.06; 0.13; 0.19; 0.25 and 0.50 mg.L⁻¹ (5 replicates each). The control from lab estimates state that the EC 50 should be between 0.08 and 0.11 mg.L⁻¹ of zinc for the test to be considered valid.

The following parameters were calculated: lowest observed effects level (LOEC), no observed effects level (NOEC) and the effective concentration which causes an inhibitory effect to 50% of pluteus (EC50). To determine the LOEC and the NOEC, abnormal pluteus resulting from the different protein levels were compared with the control (seawater) for an analysis of variance and Dunnett's test. NOEC was considered the last protein level that did not differ from the control and LOEC the first concentration that differed from control. The EC50 was estimated from a polynomial

regression. A Pearson linear correlation between the amount of abnormal larvae and the concentration of unionized ammonia were tested.

3. Results

3.1. Experiment 1: Growth and Economic Performance

During the experiment, the average physical-chemical parameters for water temperature, dissolved oxygen, salinity and pH were $27.5 \pm 1.2^{\circ}\text{C}$, $8.1 \pm 0.27 \text{ mg L}^{-1}$, $33.4 \pm 0.17 \text{ ppt}$ and 8.57 ± 0.09 , respectively. The values of ammonia and nitrite ($p < 0,001$) increased with the addition of protein in the diet (Table 3). Ammonia did not presented a significant difference between the two lower protein levels tested but showed a significant increase for the remaining protein levels. Nitrite presented a similar pattern to ammonia.

Table 3. Ammonia, nitrite and phosphorus during 60 days for the different protein level feed trial for juvenile I fat snook (*Centropomus parallelus*). Data are presented as mean and standard error. Means followed by different letters in the same column differ significantly for the Tukey test at 5%.

Dietary protein level (g kg^{-1})	Ammonia (mg L^{-1})	Nitrite (mg L^{-1})	Phosphorus (mg L^{-1})
400	0.10 ± 0.001^c	0.13 ± 0.0073^c	0.07 ± 0.002^a
440	0.13 ± 0.002^c	0.16 ± 0.0113^{bc}	0.07 ± 0.003^a
480	0.18 ± 0.005^b	0.20 ± 0.0180^{bc}	0.07 ± 0.002^a
520	0.23 ± 0.009^a	0.24 ± 0.0204^b	0.07 ± 0.003^a
560	0.26 ± 0.009^a	0.40 ± 0.0237^a	0.08 ± 0.003^a

The weight gain and the specific growth rate responded to increased protein level in the diet (fig.1). For the treatments with 560, 520, 480, 400 and 440 g.kg⁻¹ of protein, the specific growth rate was 1.72, 1.58, 1.40, 1.42, and 1.07, respectively.

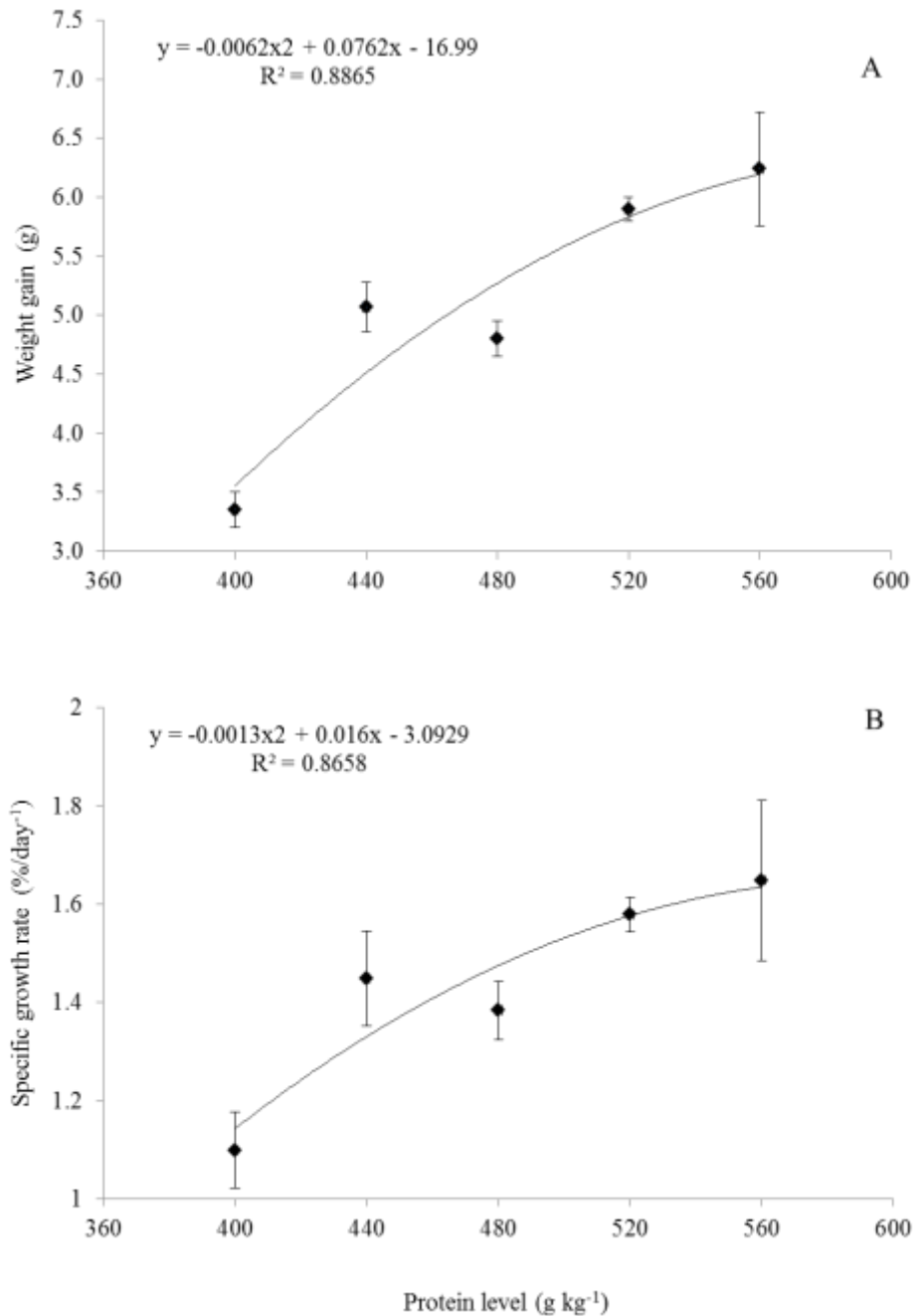


Fig. 1. Weight gain (A) and specific growth rate (B) during 60 days different protein level fed trial for juvenile I fat snook (*Centropomus parallelus*). Data are presented as mean and standard error.

The survival of juvenile fat snook did not differ statistically between protein levels ($p = 0.08$) (Table 4). The feed conversion rate was significantly lower in fish fed with 400 g.kg^{-1} of protein ($p < 0.001$). Sixty days after the experiment, the fat snook showed a significant growth of biomass with increasing protein levels in the ration ($p < 0.001$).

The protein content in fish body was 15.55 ± 0.18 , 17.88 ± 0.19 , 23.91 ± 0.08 , 23.08 ± 0.30 , $23.01 \pm 0.25 \text{ g.kg}^{-1}$ for fish fed with 400, 440, 480, 520, 560 g.kg^{-1} of protein, respectively. The protein retention rate differed among treatments ($p < 0.001$), and the greater retentions were verified when the fish were fed with rations of 520 and 560 g.kg^{-1} of protein (Table 4).

The protein content in fish body was 15.55 ± 0.18 , 17.88 ± 0.19 , 23.91 ± 0.08 , 23.08 ± 0.30 , $23.01 \pm 0.25 \text{ g.kg}^{-1}$ for fish fed with 400, 440, 480, 520, 560 g.kg^{-1} of protein, respectively. The protein retention rate differed among treatments ($p < 0.001$), and the greater retentions were verified when the fish were fed with rations of 520 and 560 g.kg^{-1} of protein (Table 4).

Table 4. Yield during 60 days different protein level fed trial for juvenile I fat snook (*Centropomus parallelus*). Data are presented as mean and standard error. Means followed by different letters in the same row indicate a significant difference by the Tukey test at 5%. S = survival; FCR = food conversion rate; FB = final biomass; APRR = apparent protein retention rate.

Parameters	Dietary protein level (g kg^{-1})				
	400	440	480	520	560
S (%)	92 ± 3.6^a	92 ± 2.1^a	92 ± 1.6^a	99 ± 0.8^a	99 ± 1.3^a
FCR	1.72 ± 0.19^b	1.29 ± 0.04^a	1.33 ± 0.05^a	1.03 ± 0.02^a	0.98 ± 0.03^a
FB (g)	190.5 ± 10.7^c	237.9 ± 5.3^b	234.9 ± 5.1^b	285.4 ± 2.4^a	299.9 ± 1.8^a
APRR	2.4 ± 0.26^c	4.7 ± 0.20^b	6.4 ± 0.31^b	9.8 ± 0.22^a	9.7 ± 0.53^a

The protein content in fish body was 15.55 ± 0.18 , 17.88 ± 0.19 , 23.91 ± 0.08 , 23.08 ± 0.30 , 23.01 ± 0.25 g.kg⁻¹ for fish fed with 400, 440, 480, 520, 560 g.kg⁻¹ of protein, respectively. The protein retention rate differed among treatments ($p < 0.001$), and the greater retentions were verified when the fish were fed with rations of 520 and 560 g.kg⁻¹ of protein (Table 4).

Table 5. Economic index during 60-day different protein level feed trial for juvenile I fat snook (*Centropomus parallelus*). Data are presented as mean and standard error. Means followed by different letters in the same row differ significantly by the Tukey test at 5%. ACD = average cost of the diets; CI = cost index; EEI = economic efficiency index.

Dietary protein level (g kg ⁻¹)	Feed Cost (\$ Kg ⁻¹)	ACD (\$ Kg ⁻¹)	CI (%)	EEI (%)
400	0.62	1.15 ± 0.33^a	156.2 ± 5.73^a	65.70 ± 5.62^c
440	0.65	0.85 ± 0.08^{ab}	114.5 ± 4.02^{ab}	87.62 ± 3.05^{ab}
480	0.69	0.92 ± 0.10^{ab}	124.6 ± 4.72^{ab}	80.62 ± 3.10^{bc}
520	0.74	0.76 ± 0.03^b	103.2 ± 1.68^b	96.97 ± 1.56^{ab}
560	0.77	0.74 ± 0.06^b	100.0 ± 2.79^b	100.2 ± 116^a

3.2. Experiment 2: Excretion of Ammonia

The experimental diets with higher levels of protein resulted in higher rates of excretion of ammonia into the water, presenting a positive quadratic effect (Figure 2). The average total ammonia excretion in fish fed with 400 g.kg⁻¹ of protein was 3.2 µg.g⁻¹.day⁻¹, while for the fish fed with 560 g.kg⁻¹ it was 5.85 µg.g⁻¹.day⁻¹, which represented an increase of 54.70%.

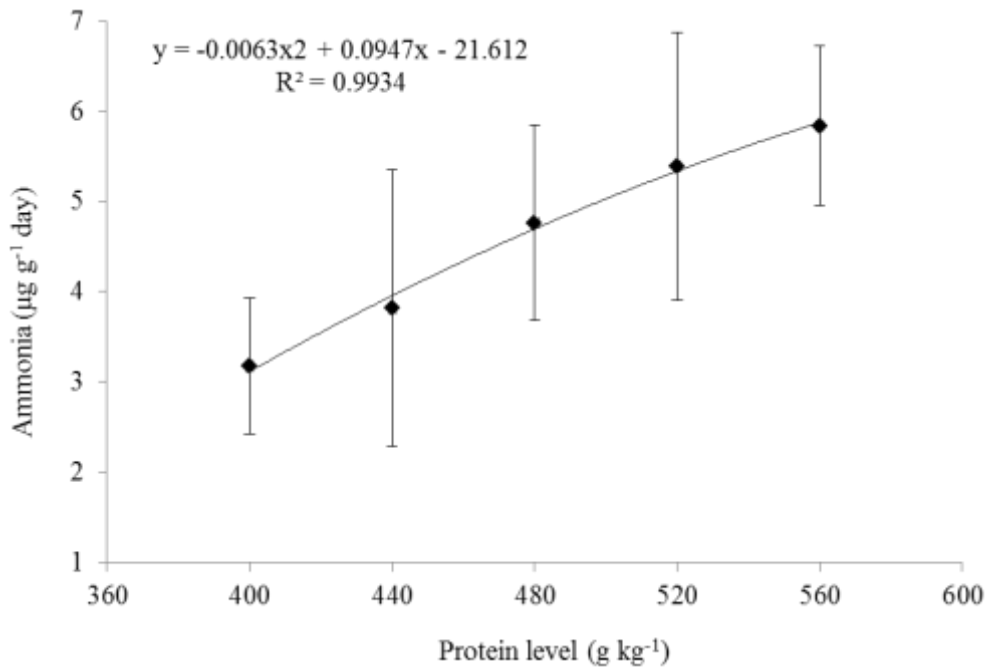


Fig. 2. Ammonia excretion rate of juvenile I of fat snook (*Centropomus parallelus*) fed with different protein level. Data are presented as mean and standard error.

3.3. Experiment 3: Toxicity test using sea urchin (Echinodermata: Echinoidea)

The quality control tests were within the expected parameters, validating the tests conducted. The percentage of fertilized eggs in the control was 87%, which was higher than the minimum acceptable (80%). The EC50 of zinc was 0.10 mg L⁻¹, which was within the acceptable range presented in the lab control letter.

The results of the average and standard deviations of abnormal pluteus after 48 h in culturing waters of fat snook juveniles are presented in Figure 3. The NOEC occurred in the treatment of 480 g.kg⁻¹, and the LOEC was observed at 520 g.kg⁻¹. The EC50, estimated by polynomial regression ($y = 0.0884x^2 - 7.6382x + 178.83$; $R^2 = 0.99$), was reached only with 860 g.kg⁻¹ protein in the ration.

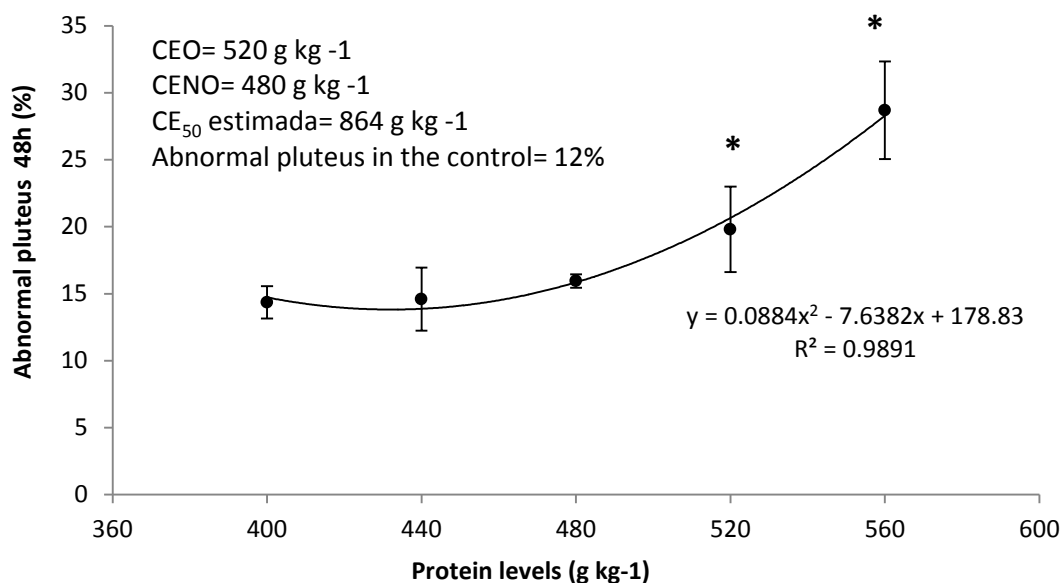


Fig. 3. Abnormal pluteus of *Echinometra lucunter* exposed to effluent of fat snook (*Centropomus parallelus*) fed with different protein level. Data are presented as mean and standard error. * Indicate a significant difference from the control by ANOVA and Dunnett's test.

The Pearson correlation demonstrated a strong relationship between the un-ionized ammonia test water and the rate of abnormal pluteus ($r = 0.994$; $p = 0.00$).

4. Discussion

4.1. Experiment 1: Growth and Economic Performance

The quality of the cultivation water in the systems of rearing fish is important to obtain good indexes of production, growth, reproduction, health, survival, quality and the welfare of the fish and the environment. In 20 experimental tanks, the parameters of salinity, pH, dissolved oxygen and water temperature remained within the limits recommended by Cerqueira (2010), which are as follows: 22 to 30° C for temperature, 5 to 6 mg.L⁻¹ of dissolved oxygen and salinity of 35p for fat snook rearing.

The increased levels of protein in the diet resulted in an increase in the catabolism of amino acids in the body of the fish and consequently greater excretion of ammonia and other nitrogen in waste water cultivation (Yang et al. 2002; Webb and Gatlin III 2003). Webb and Gatlin III (2003) studying red drum (*Sciaenops ocellatus*) also verified that the increase of the levels of protein in the diet promoted an increased excretion of ammonia. Despite the increase in the concentration of ammonia from 400 g.kg⁻¹ to 560 g.kg⁻¹, the protein level values are within the limits recommended by Okelsrud and Pearson (2007), which is 0.90 mg L⁻¹ un-ionized ammonia at pH 8 for 95 % of aquatic life.

Under the experimental conditions tested, the weight gain of fat snook juveniles I increased as the levels of protein in the diet increased. Quadratic regression demonstrated that to achieve the maximum weight gain, the percentage of protein in the diet should be 620 g.kg⁻¹. This value was also found, through the regression equation, as the best outcome for the specific growth rate. The study conducted by Tsuzuki and Berestinas (2008), with the same species fed twice a day with a commercial diet with 45% protein, found a specific growth rate (1.3%) similar to that found in this research. Souza et al. (2011) searching six rations with protein contents ranging from 375 g.kg⁻¹ to 490 g.kg⁻¹ for the fat snook of similar size found there were significant performance increases associated with increases in the protein content in the feed. The results of weight gain per individual found by these authors were similar to those obtained in this research. Cerqueira (2010) reports that because the fat snook is a carnivorous fish, it requires diets formulated with a high concentration of protein for the formation of organs and tissues and that the protein value must be above 500 g.kg⁻¹. In the present research, the maximum weight gain has not yet been reached, even with two protein levels above 500 g.kg⁻¹.

The increase in protein levels in the diet promoted a better feed conversion and protein retention rates. The smaller value of food conversion increased the efficiency in the use of the feed for the animals and, consequently, greater biomass production and protein retention. Barbosa et al. (2011) when investigating the effect of rations (550 g.kg^{-1}) supplemented with probiotics on the growth of juvenile fat snook, found food conversion values similar to those found in this research (0.98). According to Souza et al. (2011), the increase in the concentration of protein in the diet improves the feed conversion of the fat snook, but the values found by these authors were 1.58 and 1.48% for diets with 470 g.kg^{-1} and 490 g.kg^{-1} of protein, respectively. This result indicates that the feed used in this experiment best meet the nutritional requirement of the species.

The cost of feed, the marketing value of the fish, feed conversion ratio, survival rate and the cost of the larvae are some of the factors used in determining the economic feasibility of fish farming. For the economic evaluation, this research took into account only the cost of the feed. Other costs were understood as constants and equal to the situations analyzed and were not objects of analysis. The cost of rations ($\$ \text{ Kg}^{-1}$) varied according to the protein content because it is the most expensive ingredient used in the feed formulation (Robinson and Li 1997; Kim and Lee 2005). By analyzing the cost of the feed associated with the feed conversion ratio, it was observed that as the protein levels in the diet increase, the average cost of food and the cost index showed a negative effect, while the economic efficiency index was positive. The feed conversion influences the cost of production, because the smaller the feed conversion index, the better the nutrient utilization by the fish; namely, less broken protein can be used as an energy source, reducing the cost of food (Lovell, 1989). In animal production systems, the maximum performance should

be sought while, at the same time, reducing the cost of production and the environmental impact, and increasing animal welfare.

4.2. Experiment 2: Excretion of Ammonia

The feeding of carnivorous fish is commonly carried out with high levels of protein being partially assimilated by the animal and converted to protein, while another part is eliminated in the feces (organic nitrogen) or excreted as ammonia and urea (Baldisserotto 2002); this explains the increased excretion of ammonia in fish that received higher concentrations of protein. Most species of fish do not tolerate high concentrations of ammonia, especially un-ionized, because it can cause several rearing problems, such as the reduction in the rate of growth and high mortality (El-Shafai et al. 2004; Benli et al. 2008; Le François et al. 2008). In addition, a high discharge of ammonia into the environment may contribute strongly to the eutrophication of the water (Boyd 2003). Therefore, it is possible that pollution caused by ammonia can disturb aquatic ecosystem stability (Sinha et al. 2013).

The results obtained in this study agree with those of Cheng et al. (2003) with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), who found that while decreasing the amount of protein from 42% to 37%, total ammonia excretion decreased by 12%. This corroborates the assertion that there is a direct relationship between protein intake and the excretion of ammonia in fish (Peres and Oliva-Teles 2001; Melo et al. 2006; Abdel-Tawwab et al. 2010). From an environmental point of view, the results indicate that the supply of concentrated protein increases the environmental impact of the fish-farming establishment on the basis of the higher rate of excretion of ammonia, which is more than 50% higher in fish fed with 560 g.kg⁻¹ than fish fed with 400 g.kg⁻¹.

4.3. Experiment 3: Toxicity test using sea urchin (Echinodermata: Echinoidea)

The dissolved nutrients in the water cause changes in the dynamics of ecosystems. To assess the quality of sea water, a test of its toxicity to the sea urchin,

which is a biological tool that is fast, sensitive and inexpensive (Beiras et al. 2001; Losso et al. 2007), was conducted.

The pluteus exposed to the waters used for the cultivation treatments showed increased abnormality as the protein levels in the diet increased. This indicates a decline in water quality (Hargreaves and Kucuk 2001), especially when the fish are fed with feed containing 520 and 560 g.kg⁻¹ protein, since at these levels, the abnormal pluteus were 20 and 29%, respectively.

According to Saco-Alvarez et al. (2010), the fraction of un-ionized ammonia is toxic to sea urchin embryos. Thus, it is concluded that the main reason for a strong relationship between the rate of abnormality and protein levels is the quantity of ammonia excreted by the fish. In support of this hypothesis, the Pearson correlation coefficient between the ammonia of the specimen and the abnormality rate was higher than 99%.

The toxicity test results show an association with the results from the excretion of ammonia and indicate a greater environmental impact with the highest protein levels.

5. Conclusion

The results bring a paradigm for determining the best concentration of protein for the fat snook and other fish. From the growth and economic points of view, the rations with concentrations of 520 and 560 g.kg⁻¹ of protein in the diet promote the best growth and economic performance. However, from an environmental point of view, we observed that the higher protein level in the diet increased the environmental impact because of the increased excretion of ammonia, which is toxic to the environment. Taking the experimental results into account, the concentration of 480 g.kg⁻¹ is recommended for promoting less environmental impact. Most existing

studies use only growth and economic parameters as criteria to determine the best amount of protein. It is important that tests that indicate the environmental impact, as the rate of excretion and toxicity test, also be used as criteria for this determination, so that the determination of the most appropriate protein level for production will be more environmentally responsible.

Acknowledgements

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grants # 5590902009 -9 and 5628212010-4, FAPES grant # 53235282/11 and the Vila Velha University for financial support. The authors would also like to thanks the Nutriave Alimentos, Ltda. for the donation of the experimental feed.

6. References

- Abdel-Tawwab M., Ahmad M.H., Khattab Y.A.E., Shalaby A.M.E., 2010, Effect of dietary protein level, initial body weight and their interaction on the growth, feed utilization and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture, 298, 267-274. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.10.027
- Altinok I., Grizzle J.M., 2004, Excretion of ammonia and urea by phylogenetically diverse fish species in low salinities. Aquaculture, 238, 499–507. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.06.020
- Alvarez-Lajonchère, L. et al., 2002, Mass production of juveniles of the fat snook *Centropomus parallelus* in Brazil. Journal of the World Aquaculture Society, 33, 506-516.
- American Public Health Association (APHA), 2005, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Standard Methods on line. 2005. Section

9060. Samples. Disponível em: <http://www.standardmethods.org>. (03 fevereiro 2015).

Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 15350:2012., 2012, Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). Rio de Janeiro, ABNT.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2000, Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, Association of Official Analytical Chemists.

Baldisserotto B., 2002, Fisiologia de peixes aplicada a aquicultura. Santa Maria Editora, UFSM.

Baldan A.P., Bendhack F., 2009, Maricultura sustentável no litoral do Paraná, Brasil: atualidades e perspectivas. Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient., 4, 491-497.

Barbosa M.C., Jatobá A., Vieira F.N., Silva B.C., Mourino J.L.P., Andreatta E.R., Seiffert W.Q., Cerqueira V.R., 2011, Cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. Braz. arch. biol. technol, 54,795-801. doi: 10.1590/S1516-89132011000400020.

Beiras R., Vazquez E., Bellas J., Lorenzo J.I., Fernandez N., Macho G., Marin J.C., Casas L., 2001, Sea-urchin embryo bioassay for in situ evaluation of the biological quality of coastal sea water. Estuarine Coastal and Shelf Science, 52, 29–32.

Benli A.Ç.K., Köksal G., Özkul A., 2008, Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): effects on gill, liver and kidney histology. Chemosphere, 72, 1355–1358. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.04.037

Boyd C.E., 2003, Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. Aquaculture, 226, 101– 112 doi:10.1016/S0044-8486(03)00471-X

- Brennan N.P., Leber K.M., 2001, Survival, growth, and recruitment of stocked juvenile snook to an adult fishery in Sarasota Bay, Florida. In: Aquaculture, A Fantasy Come True, Book of Abstracts. World Aquaculture Society, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA, p. 79.
- Cerqueira V.R., 2010, Cultivo de robalo-peva (*Centropomus parallelus*). In: Baldisserotto B., Gomes L.C. (Eds.), Espécies nativas para piscicultura no Brasil, Santa Maria, UFSM, pp.489-520
- Cheng Z.J., Hardy R.W., Usry J.L., 2003, Plant protein ingredients with lysine supplementation reduce dietary protein level in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets, and reduce ammonia nitrogen and soluble phosphorus excretion. *Aquaculture*, 218, 553-565. doi:10.1016/S0044-8486(02)00502-1
- Cochava M., Diab S., Avnimelech Y., Mires D., Amit Y., 1990, Intensive growth of fish with minimal water exchange. *Fish. Fish-breeding Israel*, 23, 174-181.
- El-Shafai S.A., El-Gohary F.A., Nasr F.A., Steen N.P., Gijzen H.J., 2004, Chronic ammonia toxicity to duckweed-fed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 232, 117–127. doi:10.1016/S0044-8486(03)00516-7
- Environment Canada., 1992, Biological test method: fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars). *Env. Prot. Series. EPS 1/RM/27*.
- Gracia-López, V. et al., 2003, Efecto Del nivel de proteína en la dieta y alimentos comerciales sobre el crecimiento y la alimentación en juveniles del robalo blanco, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). *Ciencias Marinas*, 29, 585-594.
- Hargreaves J.A., Kucuk S., 2001, Effects of diel un-ionized ammonia fluctuation on juvenile hybrid striped bass, channel catfish, and blue tilapia. *Aquaculture*, 195, 163-181. doi:10.1016/S0044-8486(00)00543-3

- Kim L.O., Lee S.M., 2005, Effects of the dietary protein and lipid levels on growth and body composition of bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*, 243, 323-32. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.11.003
- Kubitza, F. 1999, Qualidade da água na produção de peixes. 3. ed. Jundiaí: Degaspari. 97p
- Le François N.R., Savoie A., Siikavuopio S.I., 2008, Gill metabolic and osmoregulatory responses of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) to chronic ammonia exposure. *J. Appl. Ichthyol.*, 24, 112–115. doi:10.1111/j.1439-0426.2007.01012.x
- Losso C., Picone M., Arizzi-Novelli A., Delaney E., Ghetti P.F., Volpi-Ghirardini A., 2007, Developing toxicity scores for embryo toxicity tests on elutriates with the sea urchin *Paracentrotus lividus*, the oyster *Crassostrea gigas*, and the mussel *Mytilus galoprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 53, 220–226.
- Lovell R.T., 1989, Weight gain versus protein gain for evaluating fish feeds. *Aquaculture Magazine*, 12, 45-47.
- Martinez, C.B.R., Cólus, I.M., 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In M.E. Medri, E. Bianchini, O.A. Shibatta, and J. A. Pimenta, editors. *A Bacia do Rio Tibagi*. Edição dos Editores, Londrina, PR. Pp. 551-577
- Maynard L.A., Loosli J.K., 1974, *Nutrição animal*. São Paulo, F. Bastos.
- Martinez, C.B.R., Cólus, I.M., 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In M.E. Medri, E. Bianchini, O.A. Shibatta, and J. A. Pimenta, editors. *A Bacia do Rio Tibagi*. Edição dos Editores, Londrina, PR. pp. 551-577.

- Melo J.F.B., Lundstedt L.M., Meton I., Baanante I.V., Moraes G., 2006, Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Comp. Biochem. Phys.*, 145, 181-187.
- Mires D., 1995, Aquaculture and the aquatic environment: mutual impact and preventive management. *Isr. J. Aquacult. - Bamidgeh*, 47, 163-172.
- Okelsrud A., Pearson R.G., 2007, Acute and Postexposure Effects of Ammonia Toxicity on Juvenile Barramundi (*Lates calcarifer* [Bloch]). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 53, 624–631.
- Peres H., Oliva-Teles A., 2001, Effect of dietary protein and lipid level on metabolic utilization of diets by european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Fish Physiol. Biochem.*, 25, 269-275.
- Ribeiro, F.F., Tsuzuki, M.Y., 2010, Compensatory growth responses in juvenile fat snook, *Centropomus parallelus* Poey, following food deprivation. *Aquaculture Research*, 41, 226-233.
- Robinson E. H., Li M.H., 1997, Low protein diets for channel catfish *Ictalurus punctatus* raised in earthen ponds at high density. *J. World Aquac. Soc.*, 28, 224 – 229. doi 10.1111/j.1749-7345.1997.tb00637.x
- Rockstrom J, Steffen W, Noone K, Persson A, Chapin FS, Lambin EF et al., 2009, A safe operating space for humanity. *Nature* 461: 472–475.
- Saco-Alvarez L., Duran I., Lorenzo J.L., Beiras R., 2010, Methodological basis for the optimization of a marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. *Ecotox. Environ. Safe.* 73, 491–499.
- Sinha A.K., Giblen T., AbdElgawad H., De Rop M., Asard H., Blust R., De Boeck G., 2013, Regulation of amino acid metabolism as a defensive strategy in the brain of three freshwater teleosts in response to high environmental ammonia exposure. *Aquatic Toxicol.*, 130-131, 86-96. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.01.003

- Souza J.H, Fracalossi D.M., Garcia A.S., Ribeiro F.F., Tsuzuki, M.Y., 2011, Desempenho zootécnico e econômico de juvenis de robalo-peva alimentados com dietas contendo diferentes concentrações proteicas. *Pesq. Agrop. Bras.*, 46,190-195. doi: 10.1590/S0100-204X2011000200011
- Tsuzuki M.Y., Berestinas A.C., 2008, Desempenho de juvenis de robalo-peva *Centropomus parallelus* com diferentes dietas comerciais e frequência alimentares. *Bol. Inst. Pesca*, 34, 535-541.
- USEPA., 2002, Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. Third Edition – EPA-821-R-02-014.
- Verdegem, M.C.J., 2013, Nutrient discharge from aquaculture operations in function of system design and production environment. *Reviews in Aquaculture* 5, 158–171.
- Webb K.A, Gatlin III D.M., 2003, Effects of dietary protein level and form on production characteristics and ammonia excretion of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 225, 17–26. doi:10.1016/S0044-8486(03)00274-6
- Yang S.D, Liou C.H., Liu F.G., 2002, Effects of dietary protein level on growth performance, carcass composition and ammonia excretion in juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*, 213, 363-372. doi:10.1016/S0044-8486(02)00120-5

ARTIGO 2

Modelo simplificado integrando os parâmetros: ambiente-produção-econômico na piscicultura de *Centropomus parallelus* (robalo peva)

Abstract

The aim of the research was to generate a simplified model integrating the parameters: environment, economic production and to assess the most appropriate concentration of protein in the diet of juvenile II of *Centropomus parallelus* (Fat Snook). Two experiments were performed (productive/economical performance and chronic toxicity in Hedgehog) to generate the data used in the model. Were tested five levels of crude protein in the diet (480, 400, 440, 520 and 560 g kg⁻¹). productive/economical performance was observed, that as the protein concentration in the diet increased increase occurred in the gain in weight and growth rate, decreased food conversion and there was no difference in the average cost of food. The experimental water from the treatments with the highest protein levels resulted in higher abnormality in pluteus, however in any protein level searched noted inhibitory effect to 50 of organisms. To calculate the parameters used in the simplified model were considered: weight gain for productivity (P), average cost of food for the economic (E), and the number of pluteus morons, through chronic toxicity test of short duration with sea urchin, for the environment. For each of the parameters used a score. Five scenarios were developed, with different weights between the parameters to determine the level of protein in the diet more indicated. For each scenario was indicated a concentration of this protein differs between the scenarios. Among the scenarios studied, which gives a greater weight to economic and productivity more than matches the reality of the activity, and because of this it is recommended that, for the studied biological model (Fat Snook), 480 g ration kg⁻¹

Keywords: Aquaculture, Ecological modelling, Environmental impact, Fish farming

Resumo

O objetivo da pesquisa foi gerar um modelo simplificado integrando os parâmetros: ambiente, produção e econômico para avaliar a concentração de proteína mais adequada na ração de juvenis II de *Centropomus parallelus* (robalo peva). Foram realizados dois experimentos (desempenho produtivo/econômico e de toxicidade crônica em ouriço) para gerar os dados usados na confecção do modelo. Foram testados cinco níveis de proteína bruta na ração (400, 440, 480, 520 e 560 g kg⁻¹). Observou-se no desempenho produtivo/econômico, que à medida que a concentração proteica na ração aumentou ocorreu aumento no ganho em peso e na taxa de crescimento, diminuição na conversão alimentar e não houve diferença no custo médio de alimentação. A água experimental proveniente dos tratamentos com os maiores níveis de proteína resultaram em maiores anormalidade nos plúteos, entretanto em nenhum nível proteico pesquisado observou efeito inibitório a 50% dos organismos. Para calcular os parâmetros utilizados no modelo simplificado foram considerados: ganho em peso para a produtividade (P), custo médio da alimentação para o econômico (E), e número de plúteos anormais, por meio do teste de toxicidade crônico de curta duração com ouriço do mar, para o ambiental (A). Para cada um dos parâmetros utilizados foi estabelecido um escore. Foram elaborados cinco cenários, com pesos diferentes entre os parâmetros, para determinar o nível de proteína na ração mais indicada. Para cada cenário foi indicada uma concentração diferente de proteína. Dentre os cenários estudados, o que confere um maior peso aos parâmetros de produtividade e econômico é o que mais condiz com a realidade da atividade, e em função disso recomenda-se, para o modelo biológico estudado (robalo peva), a ração de 480 g kg⁻¹

Palavras-chave: Aquicultura, modelo ecológico, impacto ambiental e piscicultura.

1. Introdução

A aquicultura, como qualquer outra criação animal, provoca alterações no meio ambiente pelo uso inadequado pelo homem dos recursos naturais: água, solo, fauna e flora. Essas alterações ambientais devem ser minimizadas, ao máximo possível, para reduzir os prejuízos à biodiversidade, o esgotamento dos recursos ambientais e as mudanças nos ecossistemas (Subasinghe et al., 2009).

A exploração excessiva dos recursos marinhos e o aumento da poluição têm resultado na diminuição dos estoques pesqueiros (Oliveira and Crispim, 2013) e em contrapartida, a aquicultura tem crescido suprindo a carência dos estoques naturais, mas promovendo consequências negativas com as alterações ambientais dos ecossistemas costeiros e sócio econômico (Tacon et al. 2010). Para que a atividade seja perene é importante à conscientização de uma produção baseada no desenvolvimento tecnológico, na viabilidade econômica e na integridade ambiental e social (FAO, 2012).

Na aquicultura intensiva a fonte principal da alimentação é a ração, e principalmente para os peixes carnívoros como o robalo, que necessitam de alto teor de proteína. Os peixes consomem parte do alimento fornecido e o que não é consumido vai parar no meio aquático provocando impacto ambiental (Ye et al., 2015; Pillay, 2004) em função do aumento na concentração de amônio e amônia não ionizada (NH_4^+ e $\text{NH}_3\text{-N}$), nitrito (NO_2), fósforo e do acúmulo de matéria orgânica nos sedimentos resultando em uma piora na qualidade da água (Ye et al., 2015; Pietras et al., 2006).

As alterações na qualidade da água comprometem o equilíbrio da vida aquática e para avaliar e controlar essas alterações são usadas análises de química analítica (Tello et al., 2010) e testes ecotoxicológicos. Os testes de ecotoxicidade são internacionalmente recomendados porque não avaliam somente a quantidade

das substâncias, mas avaliam, por meio de organismos vivos, a influência de interações aditivas, sinérgicas e/ou antagônicas que podem interferir na biodisponibilidade e na toxicidade dos compostos químicos (Anderson et al., 2010; Hernando et al., 2007; Wolska et al., 2007). O ouriço do mar tem sido um dos organismos testes mais utilizados nas pesquisas para avaliação ambiental (Carballeira et al., 2012; Carballeira et al. 2011a, Cesar-Ribeiro and Palanch-Hans, 2010; Marin et al. 2007) por apresentar sensibilidade aos contaminantes, disponibilidade e abundância no ambiente, ampla distribuição geográfica, facilidade de cultivo e adaptação às condições laboratoriais, metodologia bem definida, além de facilidade de interpretação de resultados (César et al., 2009).

Água de baixa qualidade além de comprometer o equilíbrio do meio ambiente pode provocar no animal baixo desempenho produtivo, alta mortalidade e, conseqüentemente, menor lucratividade para o piscicultor. A piscicultura, como qualquer outra atividade econômica, deve contemplar, rentabilidade, produtividade (Garcia et al., 2013) e sustentabilidade.

A pesquisa teve como objetivo gerar um modelo simplificado integrando os parâmetros: produtivos, econômicos e ambiental que permite avaliar a concentração de proteína mais adequada na ração para alimentar juvenis II de *Centropomus parallelus* (robalo peva).

2. Material e Métodos

Foram realizados dois experimentos (desempenho produtivo e econômico e de toxidade crônica em ouriço) para gerar os dados usados na confecção do modelo simplificado.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Universidade de Vila Velha (UVV), ES, Brasil sob o número # 307/2014.

2.1. Preparo da ração

As rações com os cinco níveis de proteína bruta testada (400, 440, 480, 520 e 560 g kg⁻¹) foram produzidas por uma fábrica de ração comercial. Elas eram isocalóricas, isolipídicas e possuíam diâmetro dos pellets de 2,5mm e os mesmo ingredientes. Os ingredientes usados foram finamente moídos, misturados e extrusados a 130°C depois secos, resfriados, embalados e armazenados a 18°C durante todo o período experimental. Na tabela 1 encontra-se a composição percentual e bromatológica das rações experimentais.

Tabela 1: Composição percentual e bromatológica das rações experimentais

Ingredientes (%)	Níveis de proteína bruta (g kg ⁻¹)				
	400	440	480	520	560
Farinha de peixe 55	25	25	25	25	25
Farinha de vísceras 60	5	5	5	5	5
Farelo de soja tostado 44	8.41	9.85	11.29	5	5
Concentrado proteico de soja	5	5	5	5	5
Milho integral moído	18.29	12.00	5.72	3.45	2
Farelo de arroz	10	10	10	10	10
Quirera de arroz	10	10	10	10	6.04
Óleo de peixe	2.8	2.9	3	3.07	3.05
Premix ¹	1	1	1	1	1
Glúten de Trigo	2.50	7.25	11.99	20.48	25.91
Hemácias AP301	12	12	12	12	12
Composição proximal (% matéria seca)					
Umidade	7.65	7.57	7.76	9.77	6.63
Proteína Bruta	39.91	43.33	47.25	52.21	55.83
Extrato não nitrogenado	30.53	24.56	21.82	15.16	15.75
Lípido	10.31	10.87	9.96	9.99	10.81
Fibra Bruta	1.52	3.33	3.16	2.59	2.19
Matéria mineral	10.07	10.42	10.61	10.00	8.84
Energia bruta (Mcal/Kg) ²	4.55	4.68	4.72	4.75	4.98
Relação Energia bruta/Proteína bruta (Mcal/Kg)	11.40	10.80	9.99	9.10	8.92

¹Premix marca registrada Nutriave. Níveis de garantia por quilograma de ração: Vit. A 2.000.000,00 UI; Vit. D3 500.000,00; Vit. E 15.000,00 UI; Vit. K3 1.000,00 mg; Vit. B1 2.500,00 mg; Vit. B2 3.000,00 mg; Vit. B6 5.000,00 mg; Vit. B12 6.250,00 mg; Ácido Pantotênico 3.750,00 mg; Niacina 10.000,00 mg; Ácido Fólico 1.250,00 mg; Biotina 1.250,00 mg; Colina 125.000,00 mg; Selênio 75,00 mg; Cobre 3.750,00 mg; Ferro 15.000,00 mg; Manganês 7.500,00 mg; Iodo 125,00 mg; Zinco 20.000,00 mg;

²Energia bruta (EB): calculada com a utilização dos valores médios de energia de combustão dos nutrientes (5,65 kcal/g PB; 9,40 kcal/g lipídeo e 4,15 kcal/g de fibra e carboidrato) (Maynardi and Loosli, 1974).

2.2. Experimento 1: Desempenho produtivo e econômico

Foram utilizados 200 juvenis de robalos peva com peso médio de 27.02 ± 0.27 g distribuídos aleatoriamente em 20 tanques de polietileno que possuíam capacidade para 500 L, mas foram utilizados 400 L por tanque e em cada tanque 10 peixes. A água utilizada nos tanques era coletada diretamente do mar e passava por uma sequência de filtros Cuno (20, 10, e 5 μm) e em seguida era esterilizada por ultravioleta. Os tanques recebiam aeração constante por meio de compressores e a temperatura era controlada em torno de 28°C com auxílio de termostato de 400 W. A renovação da água era de 50% diariamente. Os peixes foram arraçoados diariamente, na quantidade de 2% da biomassa, divididos em duas refeições (8h e 16h) e após uma hora realizava o sifonamento para remoção das fezes e sobra das rações.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (concentrações de proteína bruta em g kg^{-1} : 400; 440, 480, 520 e 560) e quatro repetições e a duração do experimento foi de 60 dias.

Semanalmente coletava-se uma fração da água dos tanques para análise das concentrações amônia, nitrito e fósforo de acordo com American Public Health Association (APHA, 1998). Os parâmetros de oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), temperatura($^{\circ}\text{C}$) e salinidade (ppt) eram monitorados diariamente.

Os animais eram submetidos à 24h de jejum, para esvaziamento do trato digestório, e em seguida anestesiados com benzocaína (50mg L^{-1}) para a realização da biometria em 100% dos peixes no início e final do experimento. Os parâmetros analisados foram: ganho de peso ($\text{GP (g)} = \text{Pf} - \text{Pi}$), taxa de crescimento específico ($\text{TCE (\%)} = 100 \times (\ln \text{Pf} - \ln \text{Pi}) / t$) e conversão alimentar aparente ($\text{CAA} = \text{Qro} / (\text{Pf} - \text{Pi})$).

Na pesquisa levou-se em consideração na avaliação econômica somente o custo da ração uma vez que os outros custos foram constantes e iguais para as

situações analisadas. Os custos das rações foram realizados com o preço de mercado de cada ingrediente multiplicado pela quantidade e depois somados os valores totais. O preço em real foi transformado em dólar do dia (\$ 1,00 = R\$ 2,80). A avaliação do custo médio de alimentação foi realizada pela fórmula: CMA (\$/Kg) = média da ração consumida X preço médio da ração / ganho de peso.

2.3. Experimento 2: Toxicidade crônica de curta duração com uso de ouriço-do-mar (*Echinodermata: Echinoidea*).

O teste de toxicidade, considerando o desenvolvimento larval do ouriço do mar *Echinometra lucunter*, seguiu as metodologias internacionais do Órgão de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (USEPA, 2002) e da Environment Canada (1999) com adaptações da Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 15350:2012 (2012).

Foram utilizados 160 juvenis de robalos peva, provenientes do experimento de desempenho produtivo e econômico, com peso médio de 38.37 ± 1.01 g. Estes foram distribuídos aleatoriamente em 20 tanques de polietileno na quantidade de oito peixes em 150 a 155 L de água (densidade 2g L^{-1}). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (concentrações de proteína bruta: 400, 440, 480, 520 e 560 g kg^{-1}) e quatro repetições. Os animais permaneceram 15 dias em adaptação recebendo sua respectiva ração, na quantidade de 2% da biomassa divididas em dois horários (8h e 16h). Diariamente era realizada troca de 50% do volume da água e realizado as medições de temperatura, salinidade e oxigênio. Dois dias antes de iniciar o período experimental os tanques foram lavados, trocado 100% da água e iniciou ao jejum para esvaziar o trato digestório.

Passado o período de jejum, todos os tanques tiveram 100% da água trocada e os robalos peva receberam 1% da biomassa de ração respectiva a cada unidade

experimental dando início ao período experimental que teve duração de dois dias. Durante o período experimental os robalos peva não foram alimentados e nem houve troca de água dos tanques. Ao final do experimento foi coletada 1 L da água de cada tanque para realização do teste de toxicidade. A qualidade da água do teste de toxidade está descrita na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros físicos e químicos da água experimental.

Parâmetros	Concentração de proteína bruta na ração (g/kg)				
	400	440	480	520	560
Condutividade (mS/cm)	50,43±0,11	49,89±0,12	49,98±0,11	50,04±0,07	50,02±0,10
Salinidade (ppt)	33,65±0,11	33,25±0,28	33,15±0,20	33,45±0,18	33,25±0,22
Temperatura (°C)	26,9 ±0,10	27,08±0,08	26,92±0,10	27,15±0,12	27,92±0,14
Oxigênio (mg/L)	7,83±0,27	7,65±0,22	7,88±0,21	7,75±0,21	7,78±0,22
pH (unidades)	8,18±0,01	8,21±0,06	8,21±0,03	8,18±0,01	8,20±0,03
Amônia total (mg/L)	0,76±0,10	0,84±0,13	0,89±0,17	1,00±0,10	1,12±0,14
Amônia ionizada (mg/L)	0,07±0,89	0,08±0,65	0,09±0,94	0,09±0,56	0,11±0,70

Os adultos de ouriços (*E. lucunter*) foram coletados no mar de Vila Velha (Estado do Espírito Santo, Brasil). Para a desova, foram injetados nos ouriços (n = 6; 3 machos e 3 fêmeas) 2,5 mL de cloreto de potássio (KCl a 0,5M) na região intracelômica para coleta dos gametas e posterior fertilização para obtenção de ovos.

No laboratório, a água coletada de cada um dos 20 tanques experimentais foi replicada cinco vezes, para o desenvolvimento do teste de toxicidade crônica, totalizando 100 testes. Os testes foram realizados em tubos de ensaio contendo 10 ml da água experimental. Em cada tubo foram adicionados aproximadamente 300

ovos de ouriços que apresentavam no mínimo 90% deles divididos em dois blastômeros. Os tubos com os ovos foram mantidos em condições controladas de temperatura (26° C) e um ciclo luz / escuro de 12h por 36 horas, ou até que a fase de plúteos fosse alcançada nos frascos controles (água do mar). Com um mínimo de 80% de plúteos presentes no frasco controle, o teste foi encerrado e adicionado duas gotas de formol (4%) tamponado com borax. Os 100 primeiros plúteos eram contados no microscópio com uso da câmara de contagem Sedgwick-Rafter para verificar a ocorrência de anomalias nos organismos.

Para validação dos testes foram realizados dois procedimentos concomitantes com o experimento: 1) Foi realizado um controle com água de mar (10 repetições), filtrada e esterilizada por UV para eliminação de possíveis bactérias e algas. O teste foi considerado válido quando apresentou no mínimo 80% dos ovos fecundados; 2) foi realizado um teste completo de CE_{50} com a substância de referência sulfato de zinco testado nas concentrações de: 0,06; 0,13; 0,19; 0,25 e 0,50 mg/L (5 réplicas para cada). A carta controle do laboratório estima que para o teste ser válido a CE_{50} deve ficar entre 0,08 a 0,11 mg L⁻¹ de zinco.

Com o resultado da contagem foi determinada a concentração de proteína com efeito observado (CEO), a concentração proteína de efeito não observado (CENO) e estimada a CE_{50} . Para determinar o CEO e o CENO, o total de plúteos anormais das diferentes concentrações de proteína foi comparado com o controle por uma análise de variância e teste de Dunnett's. Foi considerado CENO a última concentração de proteína que não diferiu do controle, e o CEO a primeira concentração que diferiu do controle. A CE_{50} foi estimada a partir de uma regressão polinomial.

2.4. Determinação de um modelo simplificado de avaliação

Para gerar o modelo simplificado de avaliação proposto na pesquisa foram considerados três parâmetros: o ganho de peso como parâmetro de produtividade (P), o custo médio da alimentação como parâmetro econômico (E) e o teste de toxicidade crônico de curta duração com ouriço do mar como parâmetro ambiental (A).

Para cada uma dos parâmetros utilizados foi estabelecido um escore, onde a concentração de proteína com o melhor resultado ganhou 100 e a nota das demais concentrações de proteína foram calculadas proporcionalmente. O escore foi realizado com base na média do ganho de peso para o parâmetro produtivo, custo médio de alimentação para o econômico, e sobrevivência de plúteus para o ambiental.

Para calcular o índice proposto tomou-se como base o modelo usado para estimar o índice de danos no ensaio de cometa (Collins et al. 1995; Kobayashi et al., 1995). Esse modelo prevê pesos diferenciados para cada parâmetro analisado. Em função disso, foram elaborados alguns cenários para determinar qual o melhor nível de proteína na ração. No cenário 1 os pesos para os três parâmetros foram iguais. No cenário 2 atribuiu-se peso 2 ao parâmetro de produtividade enquanto no cenário 3 atribuiu-se peso 2 ao parâmetro econômico e no cenário 4 atribuiu-se peso 2 ao parâmetro ambiental. Finalmente, no cenário 5 foi dado peso 2 aos parâmetros de produtividade e econômico .

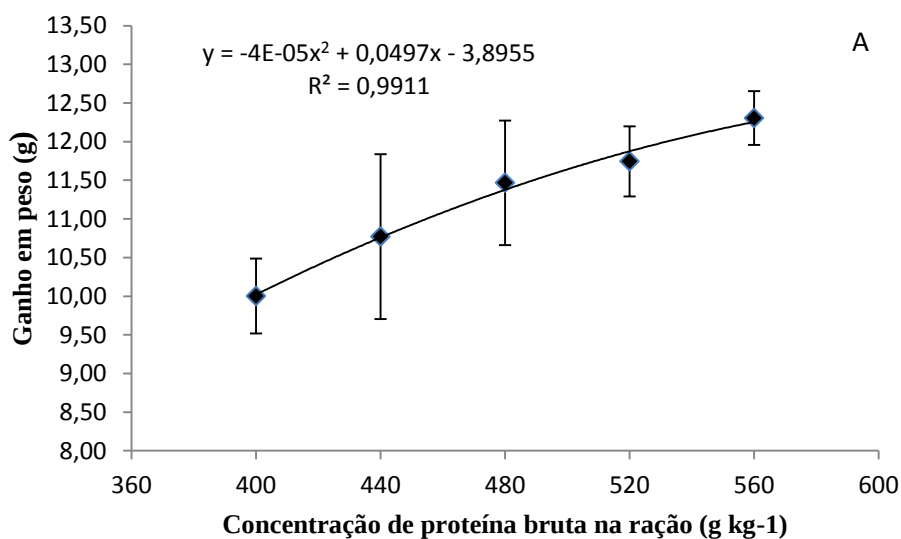
3. Resultados

3.1. Experimento 1: Desempenho Zootécnico e Econômico

Durante os 60 dias experimentais os valores médios da água foram: temperatura (27.2 ± 1.2 °C), oxigênio dissolvido (8.4 ± 0.33 mg L⁻¹), salinidade

(32.3 ± 1.1 ppt), pH (8.32 ± 0.19 unidades), amônia (0.24 ± 0.04 mg L⁻¹), nitrito (0.30 ± 0.08 mg L⁻¹) e fósforo (0.14 ± 0.02 mg L⁻¹).

O ganho em peso e a taxa de crescimento específico responderam de forma quadrática ao aumento da concentração proteica da ração e foram afetados positivamente pelo aumento na concentração proteica da ração (Fig. 1A, 1B). Já a conversão alimentar diminuiu com o aumento das concentrações de proteína (Fig. 1C) sendo que a ração de concentração de 560 g kg⁻¹ foi a que promoveu melhor conversão alimentar (2.92) quando comparada com as demais (3.06, 3.20, 3.36, e 3.62 para as rações com 520, 480, 440 e 400 g kg⁻¹, respectivamente). O ganho em peso e taxa de crescimento específico foram melhores com a ração de maior concentração de proteína (560 g kg⁻¹).



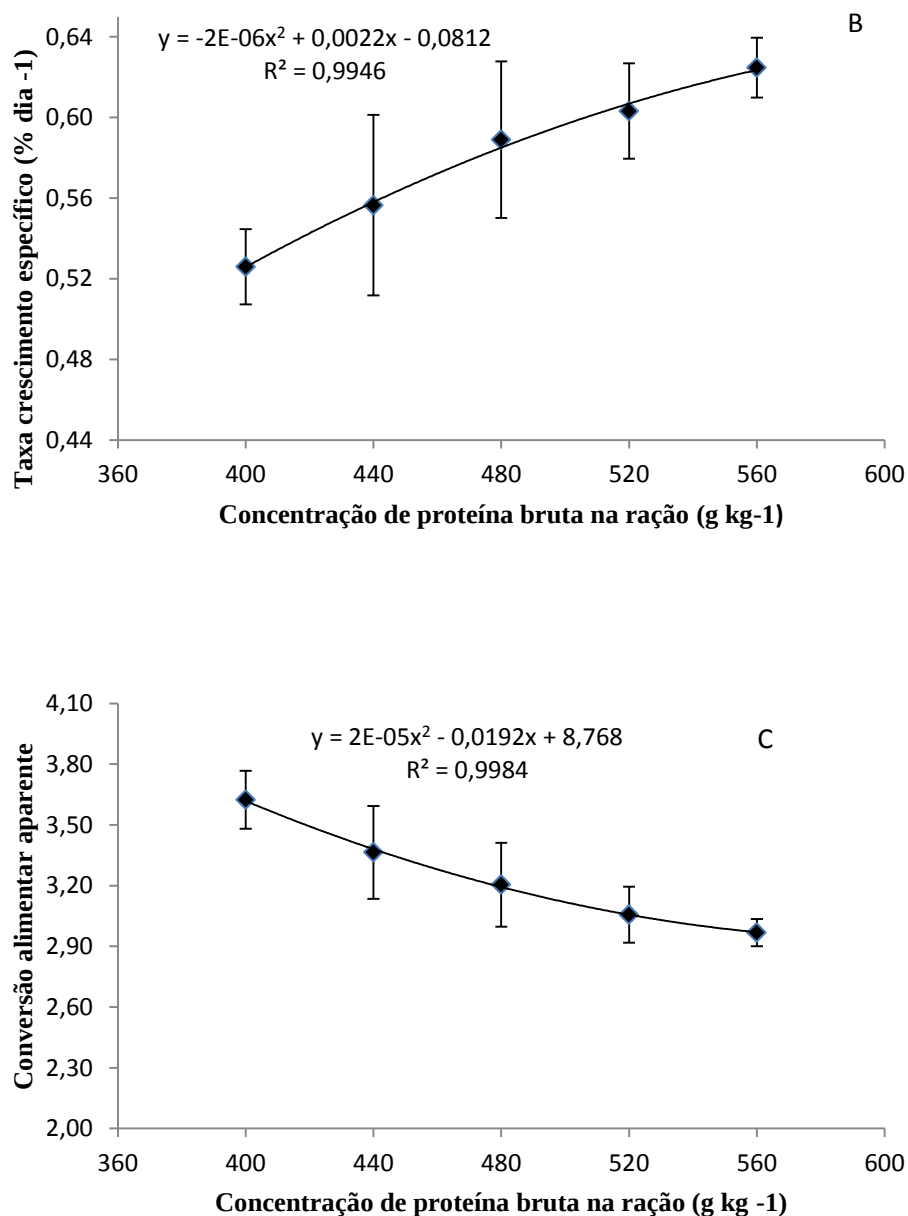


Fig. 1. Ganho de peso (A), taxa de crescimento específico (B) e conversão alimentar aparente (C) dos juvenis de robalo peva (média $\pm$ desvio padrão) alimentados com rações contendo diferentes concentrações de proteína bruta (PB).

O custo médio de alimentação (CMA- \$/Kg) não diferiu entre as concentrações de proteína nas rações. Os tratamentos de 400, 440, 480, 520 e 560 g kg⁻¹ de proteína apresentaram o CMA de 2.24, 2.20, 2.22, 2.25 e 2.29, respectivamente (Fig. 2)

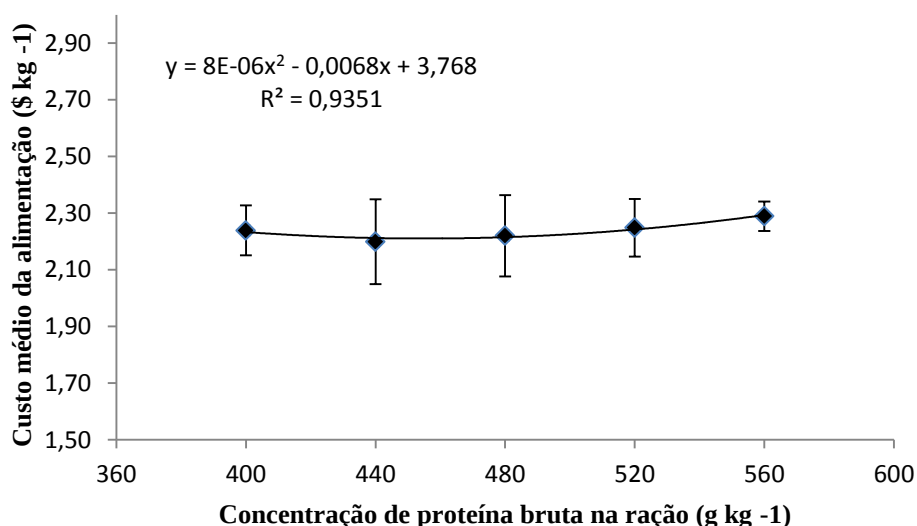


Fig. 2. Custo médio da alimentação dos juvenis de robalo peva quando alimentados com rações contendo diferentes concentrações de proteína bruta (PB).

3.2. Experimento 2: Toxicidade crônica de curta duração com uso de ouriço-do-mar (*Echinodermata: Echinoidea*).

Os testes de controle de qualidade ficaram dentro dos parâmetros esperados, validando o teste realizado. A porcentagem de ovos fecundados do controle foi de 91%, ou seja, superior ao mínimo aceitável que é de 80%. A CE_{50} de zinco foi de $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ estando dentro do intervalo aceitável para a carta controle do laboratório que é de $0,08$ a $0,11 \text{ mg L}^{-1}$ de zinco.

Os resultados das médias e desvio padrão dos plúteos anormais em 48h, nas águas de cultivo dos juvenis de robalo peva, estão apresentados na figura 3. Não foi possível obter o CENO, pois a primeira concentração testada (400 g kg^{-1}) já apresentou diferença significativa do controle e foi considerado o CEO. Entretanto, em nenhum tratamento pesquisado foi observado efeito inibitório a 50% dos organismos. A CE_{50} , que causa o efeito inibitório a 50% dos organismos, estimada pela regressão polinomial ($y = -0.0004x^2 + 0.5525x - 130.24$; $R^2 = 0.96$) só será atingida com uma ração de 610 g kg^{-1} de proteína bruta.

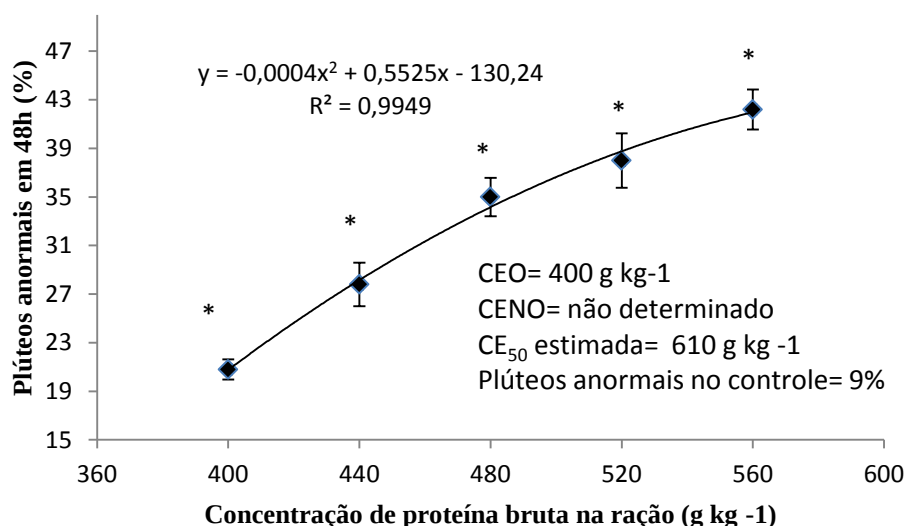


Fig. 3. Plúteos anormais de *E. lucunter* provenientes do teste de toxicidade aguda realizado com água dos diferentes tratamentos experimentais. * indica diferença significativa do controle por uma ANOVA e teste de Dunnett's.

3.3. Modelo simplificado integrado de avaliação

Observa-se que no cenário 1, quando os pesos são iguais para os três parâmetros, a melhor concentração de proteína na ração é a de 400 g kg⁻¹. Já quando o peso é maior para a produtividade animal, a ração indicada é a de 560 g kg⁻¹. Quando o parâmetro econômico tem um peso maior, as melhores rações são a de 400 e 440 g kg⁻¹. Já quando o índice ambiental é o mais pontuado verifica-se que a ração de 400 g kg⁻¹ é a recomendada. Levando em consideração um peso maior na produtividade e na econômica, que são índices importantes para a manutenção da piscicultura, as melhores rações são as de concentração de 440 e 480 g kg⁻¹ (Tab. 3).

Tabela 3: Índice de cada nível de proteína na ração em relação ao parâmetro analisado e os resultados do modelo simplificado de avaliação para os cinco cenários considerando pesos diferentes para a produtividade (P), econômico (E) e ambiental (A).

Parâmetro	Níveis de proteína bruta (g kg ⁻¹)				
	400	440	480	520	560
Produtividade	81	87	93	95	100
Econômico	98	100	99	97	96
Ambiental	100	90	80	76	70
Cenários	Nota final				
(1) P + E + A	279	277	272	268	266
(2) 2xP + E +A	360	364	365	363	366
(3) P + 2xE +A	377	377	371	365	362
(4) P + E + 2xA	379	367	352	344	336
(5) 2xP + 2xE +A	458	464	464	460	462

4. Discussão

O aumento na concentração de proteína bruta na ração promoveu aumento no ganho em peso e na taxa de crescimento específico (Fig. 1 A e B) pois houve maior disponibilidade desse nutriente para a síntese de novos tecidos (Guo et al., 2012). Os robalos, por terem o hábito alimentar carnívoro, segundo Cerqueira (2010) necessitam de dietas com teores de proteína maiores de 50% para expressar seu máximo desempenho produtivo e isso foi observado na pesquisa com os melhores resultados de ganho em peso e crescimento específico com as dietas de maiores teores proteico.

Há uma relação positiva entre a ingestão de dietas ricas em proteína e a maior excreção de nitrogênio amoniacal de acordo com Green and Hardy (2008).

Quanto maior a concentração de amônio e amônia não ionizada no meio aquático, maior o impacto ambiental (Ye et al., 2015; Pillay, 2004) sendo este comprovado com os resultados do teste de toxicidade que mostram aumento de danos nos plúteos (Fig. 3). As concentrações de proteína pesquisadas, apesar de impactar o ecossistema aquático, não provocaram efeito agudo (dano) a 50% dos plúteos no tempo de exposição e nas condições do teste. A concentração que provocaria esse efeito, de acordo com a equação quadrática, seria de 620 g kg^{-1} .

Usando o modelo simplificado de avaliação proposto na pesquisa, com base no modelo biológico robalo peva, verifica-se que a concentração de proteína ideal varia de cenário para cenário.

No cenário 1 e 4 o modelo simplificado de avaliação indica como ideal a concentração de proteína de 400 g kg^{-1} . Como nesses cenários o parâmetro ambiental teve peso igual (cenário 1) e maior (cenário 4) em relação aos parâmetros produtivo e econômico, a dieta de 400 g kg^{-1} foi a recomendada porque apresentou menor quantidade de amônia total na água ($0,76 \text{ mg L}^{-1}$) e o maior número de plúteos vivos (80), impactando menos o meio ambiente. Provavelmente, o menor nível de amônia é em função da redução do catabolismo dos aminoácidos e a maior retenção destes para a produção de tecidos. Com o aumento da concentração de proteína na dieta, observou-se maior concentração de amônia em função da deaminação dos aminoácidos e, conseqüentemente, maior poluição ambiental (Mohanta et al., 2008; Gao et al, 2005;) sendo comprovado pelo aumento de plúteos anormais (Fig. 3).

No cenário 2, quando a produtividade tem peso maior em relação aos parâmetros econômico e ambiental, a ração de 560 g kg^{-1} promoveu melhor resultado, apesar desse nível ainda não ter atingido o platô ou inflexão no ganho em peso. O aumento na concentração de proteína na dieta resultando em melhor ganho

em peso, taxa de crescimento específico e conversão alimentar aparente (Fig.1) se deve ao maior suprimento dos aminoácidos pela dieta que são fundamentais para o desenvolvimento da musculatura, formação de enzimas e fonte de energia (Souza et al., 2011).

A proteína na composição das dietas é o nutriente com maior custo na alimentação (Abdel-Tawwab et al., 2010). Logo, no cenário 3, quando o parâmetro econômico foi considerado com maior peso, as rações de 400 e 440 g kg⁻¹ foram as indicadas como as melhores pois são as que possuem menores níveis de proteína, logo o melhor preço. Diante da crise econômica que esta ocorrendo no século XXI é importante que o piscicultor esteja atento ao parâmetro econômico da criação, porém ele deve relacionar o custo da ração aos índices produtivos (Souza et al., 2011) pois muitas vezes a ração mais barata pode levar a problemas na reprodução e crescimento.

No cenário 5, levando-se em consideração os parâmetros produtividade e econômico com maiores pesos em relação ao ambiental, as rações com 440 e 480 g kg⁻¹ foram as recomendadas. Um grande desafio da piscicultura intensiva, na atualidade, é conciliar a obtenção de alta produtividade, com bom retorno econômico e menor descarga de resíduos nos efluentes (Pezzato et al., 2009; Furuya et al., 2005). A maioria dos piscicultores tem seu foco principalmente na parte produtiva e econômica, porém há necessidade de ajustar o foco e incluir as questões ambientais para preservar o ambiente para as gerações presentes e futuras. Com o crescimento da aquicultura a preocupação com a produtividade, a rentabilidade e o menor impacto ambiental tem sido intensificada devendo ser compartilhada pelo produtor, profissionais da área, pelas fábricas de rações, agências regulatórias, instituições de ensino e pesquisa e por todos que de forma direta ou indireta participam da cadeia produtiva (Cyrino et al., 2010)

Para o desenvolvimento de uma piscicultura sustentável e ecologicamente correta é importante ressaltar que dependendo onde ela se localiza, o cenário a ser selecionado para tomar a decisão da ração ideal a ser ministrada vai variar. Por exemplo, área próxima a área de preservação ambiental como manguezal e recifes de corais, deve-se considerar o parâmetro ambiental com maior peso, ou seja, o cenário 1 e 4 do modelo proposto, na tomada de decisão da ração, pois assim irá conferir ao ecossistema maior capacidade de preservação e manutenção da estrutura da comunidade dos organismos aquáticos. Quando a criação de peixes for realizada em gaiolas flutuantes localizadas em áreas marinhas protegidas ou em mar aberto, sem contaminações dos despejos domésticos e industriais, os parâmetros produtivos e ambientais (cenários 2, 3 e 5) devem ser mais valorizados. A tomada de decisão da ração, a ser utilizada em determinado local, deve sempre levar em consideração o desenvolvimento sustentável, ou seja, a preservação dos recursos bióticos e abióticos, a parte econômica e social (Cyrino et al., 2010).

Os modelos matemáticos têm sido utilizados em algumas pesquisas (Byron et al., 2015; Byron et al., 2011a; Byron et al., 2011b; Skogen et al., 2009; Dalton, 2004; Jin et al., 2003) para análise integrada da aquicultura nos moldes produtivo, econômico e ecológicos. De forma semelhante, o modelo simplificado de avaliação proposto nessa pesquisa, procurou oferecer a importância de uma visão integrada da produtividade animal, das questões econômicas e das ambientais para auxiliar nas decisões dos empreendimentos aquícolas levando em consideração a sustentabilidade.

5. Conclusão

O modelo simplificado de avaliação proposto nessa pesquisa não é estático podendo mudar dependendo dos aspectos sistema de criação, manejo empregado e espécie de peixe.

Observou na pesquisa uma boa eficiência do modelo proposto uma vez que as rações indicadas como as melhores mudam de acordo com o cenário escolhido.

Dentre os cenários estudados, o que coloca um menor peso no parâmetro ambiental é o que mais condiz com a realidade da atividade, e em função disso recomendamos, para o modelo biológico estudado (robalo peva), a ração de 480 g kg⁻¹.

6. Referências

- Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., Khattab, Y.A.E., Shalaby, A.M.E., 2010. Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 298, 267–274. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.10.027
- American Public Health Association – APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Standard Methods on line. 2005. Section 9060. Samples. <http://www.standardmethods.org>.
- Anderson, B.S.M.; Phillips, B.M.; Hunt, J.W.; Clark, S.L.; Voorhees, J.P.; Tjeerdema, R.S.; Casteline, J.; Mekebri, A., 2010. Evaluation of methods to determine causes of sediment toxicity in San Diego Bay, California, USA. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 534-540.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 15350:2012, 2012. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – Método de ensaio com *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). ABNT, Rio de Janeiro.

- Byron, C., Link, J., Bengtson, D., Costa-Pierce, B., 2011a. Calculating carrying capacity of shellfish aquaculture using mass-balance modeling: Narragansett Bay, Rhode Island. *Ecol. Model.* 222, 1743–1755.
- Byron, C., Link, J., Costa-Pierce, B., Bengtson, D., 2011b. Modeling ecological carrying capacity of shellfish aquaculture in highly flushed temperate lagoons. *Aquaculture* 314, 87–99.
- Byron, C.J., Jinb, D., Dalton, T.M., 2015. An Integrated ecological–economic modeling framework for the sustainable management of oyster farming. *Aquaculture*, 447, 15–22.
- Carballeira, C., Martín-Díaz, L., DelValls, T.A., 2011. Influence of salinity on fertilization and larval development toxicity tests with two species of sea urchin. *Marine Environmental Research* 72, 196-203.
- Carballeira, C., Ramos-Gómez, J., Martín-Díaz, L., DelValls, T.A. 2012. Identification of specific malformations of sea urchin larvae for toxicity assessment: Application to marine pisciculture effluents. *Marine Environmental Research* 77, 12-22.
- Cerqueira V.R., 2010, Cultivo de robalo-peva (*Centropomus parallelus*). In: Baldisserotto B., Gomes L.C. (Eds.), *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*, Santa Maria, UFSM, pp.489-520
- Cesar-Ribeiro, C., Palanch-Hans, M.F., 2010. Chronic toxicity test with sea urchin *Echinometra lucunter* and *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea), exposed to light-stick - flag paternoster used for longline surface fishing. *Brazilian Journal of Oceanography* 58(3), 71-75.
- Cesar, A., Marín, A., Marin-Guirao, L., Vita, R., Lloret, J., DelValls, T.A., 2009. Integrative ecotoxicological assessment of sediment in Portmán Bay (southeast Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1832-1841.
- Cyrino, J.E.P., Bicudo, A.J.A., Sado, R.Y., Borghesi, R., Dairiki, J.K., 2010. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *R. Bras. Zootec.* 39, 68-87.

- Collins, R.A., Ai-Guo, M., Duthie, S.J., 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.* 336, 69-77.
- Dalton, T.M., 2004. An approach for integrating economic impact analysis into the evaluation of potential marine protected area sites. *J. Environ. Manag.* 70, 333–349.
- Environment Canada, 1992. Biological test method: fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars). *Env. Prot. Series. EPS 1/RM/27*.
- Food and Agriculture Organization – FAO, 2012. El Estado mundial de la pesca y la acuicultura, Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma.
- Furuya, W. M., Botaro, D., Macedo, R.M.G., Santos, V. G., Silva, L.C.R., Silva, T.C., Furuya, V.R.B., Sales, P.J.P., 2005. Aplicação do Conceito de Proteína Ideal para Redução dos Níveis de Proteína em Dietas para Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 34, 1433- 1441.
- Gao, Y., Lv, J., Lin, Q., Li, L., 2005. Effect of protein levels on growth, feed utilization, nitrogen and energy budget in juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Aquaculture Nutrition* 11, 427–433.
- Garcia, F., Romera, D.M., Gozi, K.S., Onaka, E.M., Fonseca, F.S., Schalch, S.H.C., Can-deira, P.G., Guerra, L.O., Carmo, F.J., Carneiro, D.J., Martins, M.I.E., Portella, M.C., 2013. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir. *Aquaculture* 410, 51–56.
- Green, J.A., Hardy, R.W., 2008. The effects of dietary protein: energy ratio and amino acid pattern on nitrogen utilization and excretion of Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Biology* 73, 663–668.
- Guo, Z., Zhu, X., Liu, J., Han, D., Yang, Y., Lan, Z., Xie, S., 2012. Effects of dietary protein level on growth performance, nitrogen and energy budget of juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser baerii* ♀ × *A. gueldenstaedtii* ♂. *Aquaculture* 338, 89–95.

- Hernando, M.D., De Vettori, S., Martínez Bueno, M.J., Fernández-Alba, A.R., 2007. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere* 68, 724-730.
- Jin, D., Hoagland, P., Dalton, T.M., 2003. Linking economic and ecological models for a marine ecosystem. *Ecol. Econ.* 46, 367–385.
- Kobayashi, H., Suguyama, Y., Hayashi, T., Sofuni, A., 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in single cell gel electrophoresis, *MMS Commun.* 3, 103-115.
- Marin, A., Montoya, S., Vita, R., Marín-Guirao, L., Lloret, J., Aguado, F., 2007. Utility of sea urchin embryo–larval bioassays for assessing the environmental impact of marine fishcage farming. *Aquaculture* 271, 286–297.
- Maynard L.A., Loosli J.K., 1974. *Nutrição animal*. São Paulo, F. Bastos.
- Mohanta, K.N., Mohanty, S.N., Jena, J.K., Sahu, N.P., 2008. Protein requirement of silver barb, *Puntius gonionotus*, fingerlings. *Aquaculture Nutrition* 14, 143–152.
- Oliveira, F.M.F., Crispim, M.C., 2013. Aquicultura sustentável como forma alternativa de minimizar os impactos desta produção em comunidades pesqueiras. *Gaia Scientia* 7, 64-79.
- Pezzato L. E., Barros, M.M., Furuya, W. M., 2009. Valor nutritivo dos alimentos utilizados na formulação de rações para peixes tropicais. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38, 43-51.
- Piedras, S.R.N., Pouey, J.L.O.F., Moraes, P.R.R., Cardoso, D.F., 2006. Lethal concentration (CL50) of un-ionized Ammonia for *Ppejerrey* larvae in acute exposure. *Sci. Agric.* 63, 184-186.
- Pillay, T.V.R., 2004. *Aquaculture and environment*. Two ed. Blackwell Publishing, Oxford, USA.
- Skogen, M.D., Eknes, M., Asplin, L.C., Sandvik, A.D., 2009. Modelling the environmental effects of fish farming in a Norwegian fjord. *Aquaculture*, 298, 70–75. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.10.018

- Souza, J.H., Fracalossi, D.M., Garcia, A.S., Ribeiro, F.F., Tsuzuki, M.Y., 2011. Desempenho zootécnico e econômico de juvenis de robalo-peva alimentados com dietas contendo diferentes concentrações proteicas. *Pesq. Agropec. Bras.* 46,190-195. doi: 10.1590/S0100-204X2011000200011
- Subasinghe, R., Soto, D., Jia, J., 2009. Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture* 1, 2–9. doi: 10.1111/j.1753-5131.2008.01002.x
- Tacon, A.G.J., Metian, M., Turchini, G.M., Silva, S.S., 2010. Responsible aquaculture and trophic level implications to global fish supply. *Reviews in fisheries science* 18, 94-105.
- Tello, A., Corner, R.A., Telfer, T.C., 2010. How do land-based salmonid farms affect stream ecology? *Environmental Pollution* 158, 1147-1158.
- USEPA., 2002. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms. Third Edition – EPA-821-R-02-014.
- Wolska, L., Sagajdakow, A., Kuczynska, A., Namiesnik, J., 2007. Application of ecotoxicological studies in integrated environmental monitoring: possibilities and problems. *Trends in Analytical Chemistry* 26, 332-344.
- Ye, W., Han, D., Zhu, X., Yang, Y., Jin, J., Xie, S., 2010. Comparative studies on dietary protein requirements of juvenile and on-growing gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) based on fishmeal-free diets. *Aquaculture Nutrition* 21, 286-299. doi:10.1111/anu.12156

ARTIGO 3

Digestibilidade, taxa de retenção proteica e excreção de amônia em juvenis II de robalo peva (*Centropomus parallelus*, POEY, 1860) alimentados com diferentes níveis de proteína.

Abstract

The aim of this research was to determine the level of crude protein in the diet (480, 400, 440, 520 and 560 g kg⁻¹) in the juvenile II ration of fat snook (*Centropomus parallelus*), which promotes better apparent digestibility coefficient, retention of protein and less ammonia excretion. The experimental design was completely randomized, with five treatments and four replicates. On determination of protein retention rate were used 220 juvenile fat snook with an average weight of 27.02 ± 0.27 g distributed in 20 polyethylene tanks (10 fish per tank) and arraçoados daily, in the amount of 2% biomass during 60 days. At the end of this experiment, the experiment of ammonia excretion, the same 20 tanks, and on each tank were distributed nine fish (38.28 ± 1.07 g). After fasting for 48 h the fish received 1% of the biomass, of their respective feed, and water collected from each tank at the beginning and end of the experiment for analysis of total ammonia. Apparent digestibility test fish were housed in 20 incubators of fiberglass with conical bottom for collecting feces by decanting. Each incubator received three fish with an average weight of 37.28 ± 0.69g. The faeces collection period lasted two months. The fish were arraçoados with 1% day and collecting stool held twice a day. The data from the experiments were analyzed through exponential regression. The retention rate of protein presented positive quadratic effect and maximum retention, calculated by the equation, was with 510.20 g kg⁻¹. The increased levels of protein in the diet resulted in greater total ammonia excretion rate in water. The average values of apparent digestibility coefficients of protein were increasing with increasing dietary protein level of 520 g kg⁻¹, where stabilized. By the regression equation determined level that promotes a better digestibility was 495.62 g kg⁻¹.

Keywords: crude protein digestible, ammonia, fish culture, diet

Resumo

O objetivo da pesquisa foi determinar o nível de proteína bruta na dieta (400, 440, 480, 520 e 560g kg⁻¹), nas rações de juvenis II de robalo-peva (*Centropomus parallelus*), que promove melhor coeficiente de digestibilidade aparente, retenção de proteína e menor excreção de amônia. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (cinco tratamentos e quatro repetições). Na determinação da taxa de retenção proteica foram utilizados 220 juvenis de robalos peva com peso médio de 27.02 ± 0.27 g distribuídos em 20 tanques de polietileno (10 peixes por tanque) e arraçoados diariamente na quantidade de 2% da biomassa durante 60 dias. Ao final deste experimento, iniciou-se o experimento de excreção de amônia, nos mesmos 20 tanques, onde foram distribuídos nove peixes por tanque (38,28 ± 1,07g). Após jejum de 48h os animais receberam 1% da biomassa e a água foi coletada em cada tanque no início e final do experimento para análise de amônia total. Para o teste de digestibilidade os peixes foram alojados em 20 incubadoras com o fundo cônico para a coleta de fezes por decantação. Distribuiu três peixes por incubadora (37, 28 ± 0,69g) e o período de coleta de fezes teve duração de dois meses. Os peixes foram arraçoados com 1% ao dia e a coleta de fezes realizada duas vezes ao dia. A taxa de retenção proteica apresentou efeito quadrático positivo sendo que a retenção máxima, calculada pela equação, se deu com a proteína de 510,20 g kg⁻¹. O aumento dos níveis de proteína na dieta resultou em maiores taxa de excreção de amônia total na água. Os valores médios dos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína foram aumentando com o aumento da proteína dietética até o nível de 520 g kg⁻¹ onde se estabilizou. Pela equação de regressão o nível determinado que promove a melhor digestibilidade é de 495,62 g kg⁻¹.

Palavras-chave: Proteína bruta digestível, amônia, piscicultura

1 Introdução

Na nutrição animal a avaliação do coeficiente de digestibilidade das rações é importante para poder maximizar a utilização dos nutrientes, diminuir os custos de produção e minimizar a poluição da água devido a menor quantidade de nitrogênio, fósforo e matéria orgânica eliminada (Canesin et al., 2012). A determinação da digestibilidade, habilidade com que o animal digere e absorve os nutrientes contidos na ração, é um dos critérios utilizados para quantificar a eficiência de utilização dos nutrientes das dietas (Berchielli et al., 2011; Pond et al., 2005).

A proteína é um dos nutrientes mais importantes na dieta dos peixes em função de sua participação no crescimento, manutenção e reprodução, podendo ainda ser utilizada como importante fonte energética (Martínez-Palácios et al., 2007). Ela deve ser incluída na dieta em níveis adequados para assegurar uma boa eficiência proteica (Carvalho et al., 2010), pois quando incluída em excesso resultará em aumento da excreção de amônia (Sá et al., 2008) levando a prejuízos ambientais aos ecossistemas.

Nas dietas dos peixes carnívoros a participação da proteína deve estar em torno de 40 a 50% (Deng et al., 2006), e no caso dos robalos peva, Souza et al. (2011) sugerem níveis acima de 50%.

A determinação da proteína ótima na dieta dos peixes permitirá a elaboração de dietas que maximize a retenção do nutriente e promova a redução da excreção de nitrogênio reduzindo os custos e os impactos ambientais causados pela atividade (Cyrino et al., 2010, Webb et al., 2010, Ahmed & Khan, 2004).

Nesse sentido, o objetivo da pesquisa foi determinar qual o nível de proteína, nas rações de juvenis II de robalo-peva (*Centropomus parallelus*), que promove melhor coeficiente de digestibilidade aparente, retenção de proteína e menor excreção de amônia.

2 Material e Métodos

Foram testadas dietas com diferentes níveis de proteína (400, 440, 480, 520 e 560 g kg⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. A designação das dietas, para as unidades experimentais, realizou-se mediante sorteio. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Universidade de Vila Velha (UVV), ES, Brasil sob o número 307/2014.

2.1 Preparo da ração

As rações foram produzidas por uma fábrica de ração comercial. Todas as rações continham os mesmo ingredientes que foram finamente moídos, misturados e extrusados a 130°C, depois secos, resfriados, embalados e armazenados a 18°C. O diâmetro dos pellets era de 2,5mm e todas as rações eram isocalóricas, isolipídicas e continham o mesmo premix. Para avaliar a digestibilidade aparente da proteína foi utilizado o método indireto de coleta de fezes por sedimentação e óxido de titânio (TiO₂). O TiO₂ foi utilizado como indicador externo na proporção de 1% nas dietas. As vantagens do uso TiO₂, segundo Titgemeyer et al. (2001), é o custo reduzido e uma recuperação em torno de 95,5 a 101,5%. Na tabela 1 encontra-se a composição percentual e bromatológicas das cinco rações experimentais.

Tabela 1. Composição percentual e bromatológica das rações experimentais

Ingredientes (%)	Níveis de proteína bruta (g/ kg)				
	400	440	480	520	560
Farinha de peixe 55	25	25	25	25	25
Farinha de vísceras 60	5	5	5	5	5
Farelo de soja tostado 44	8,41	9,85	11,29	5	5
Concentrado proteico de soja	5	5	5	5	5
Milho integral moído	18,29	12,00	5,72	3,45	2
Farelo de arroz	9	9	9	9	9
Quirera de arroz	10	10	10	10	6,04
Óleo de peixe	2,8	2,9	3	3,07	3,05
Premix ¹	1	1	1	1	1
Glúten de Trigo	2,50	7,25	11,99	20,48	25,91
Hemácias AP301	12	12	12	12	12
Dióxido de titânio	1	1	1	1	1
Composição proximal (% matéria seca)					
Umidade	7,65	7,57	7,76	9,77	6,63
Proteína Bruta	39,91	43,33	47,25	52,21	55,83
Extrato não nitrogenado	30,53	24,56	21,82	15,16	15,75
Lipídeo	10,31	10,87	9,96	9,99	10,81
Fibra Bruta	1,52	3,33	3,16	2,59	2,19
Matéria mineral	10,07	10,42	10,61	10,00	8,84
Energia bruta (Mcal/Kg) ²	4,55	4,68	4,72	4,75	4,98
Relação Energia bruta/Proteína bruta (Mcal/Kg)	11,40	10,80	9,99	9,10	8,92

¹Premix marca registrada Nutriave. Níveis de garantia por quilograma de ração: Vit. A 2.000.000,00 UI; Vit. D3 500.000,00; Vit. E 15.000,00 UI; Vit. K3 1.000,00 mg; Vit. B1 2.500,00 mg; Vit. B2 3.000,00 mg; Vit. B6 5.000,00 mg; Vit. B12 6.250,00 mg; Ácido Pantotênico 3.750,00 mg; Niacina 10.000,00 mg; Ácido Fólico 1.250,00 mg; Biotina 1.250,00 mg; Colina 125.000,00 mg; Selênio 75,00 mg; Cobre 3.750,00 mg; Ferro 15.000,00 mg; Manganês 7.500,00 mg; Iodo 125,00 mg; Zinco 20.000,00 mg;

²Energia bruta (EB): calculada com a utilização dos valores médios de energia de combustão dos nutrientes (5,65 kcal/g PB; 9,40 kcal/g lipídeo e 4,15 kcal/g de fibra e carboidrato) (Maynardi & Loosli, 1974).

2.2 Experimento 1: Taxa de Retenção Proteica

Foram utilizados 220 juvenis de robalos peva (27.02 ± 0.27 g) distribuídos aleatoriamente em 20 tanques de polietileno com capacidade para 500 L, mas foram utilizados 400 L por tanque. Cada tanque recebeu 10 peixes. A água utilizada nos tanques era coletada diretamente do mar e passava por uma sequência de filtros Cuno (20, 10, e 5 μ m), e em seguida era esterilizada por ultravioleta. Os tanques recebiam aeração constante por meio de compressores e a temperatura era controlada em torno de 28°C com auxílio de termostato de 400 W. A renovação da

água era de 50% diariamente. Duas vezes por dia (manhã e tarde) os tanques eram sifonados para remoção das fezes e sobra das rações.

Os peixes eram arraçoados diariamente na quantidade de 2% da biomassa divididos em duas refeições (8h e 16h) durante 60 dias.

Semanalmente coletava-se uma fração da água dos tanques para análise das concentrações amônia, nitrito e fósforo de acordo com American Public Health Association (APHA, 2005), e diariamente eram monitorados os parâmetros de oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), condutividade (mS cm^{-1}) e salinidade (ppt).

No início e no final do experimento 100% dos peixes foram submetidos à 24h de jejum para esvaziamento do trato digestório, e em seguida anestesiados com benzocaína (50mg L^{-1}), para realização de biometria. A análise corporal foi realizada com uma amostra de quatro animais por tratamento e por concentração de proteína. Estes peixes foram eutanasiados com overdose de benzocaína (200 mg L^{-1}) e congelados para posterior análise da composição química dos peixes inteiros segundo metodologia descrita na Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000). A taxa de retenção proteica aparente (TRPA) foi calculada a partir da fórmula: $\text{TRPA (\%)} = [(\text{Pf} \times \text{PCf}) - (\text{Pi} \times \text{Pci})/\text{CTP}] \times 100$, onde Pf= peso final; PCf = Proteína corporal final; Pi= peso inicial; PCi = Proteína corporal inicial; CTP= consumo total de proteína.

2.3 Experimento 2: Excreção de amônia

Ao final do experimento de taxa de retenção proteica, os juvenis de robalo peva permaneceram nos seus respectivos tanques para adaptação, durante uma semana, na densidade de 2g L^{-1} . Cada tanque, com nove peixes ($38,28 \pm 1,07\text{g}$), foi considerado uma unidade experimental. A água era proveniente do mar e

diariamente era trocada 50% do seu volume. Os tanques recebiam aeração constante por meio de compressores.

Antes de iniciar o período experimental os peixes, de cada tanque, foram anestesiados com benzocaína (50mg L^{-1}) e pesados na balança de precisão ($0,01\text{g}$), e em seguida retornados para seu tanque, que tinha sido lavado e recebido água limpa. Após esse processo deu-se início ao jejum de 48h para esvaziamento do trato digestório. Passado o período de jejum, todos os 20 tanques tiveram 100% da água substituída, e os animais receberam 1% da biomassa de seu respectivo tratamento. O teste de excreção teve duração de 48h, e nesse período os animais não foram arraçoados e nem tiveram a água trocada. Foi coletada água de cada aquário no início e no final do experimento. A análise para determinação da amônia total foi realizada no mesmo dia da coleta pelo método do endofenol, de acordo com APHA (2005).

A excreção de amônia foi calculada de acordo com Altinok e Grizzle (2004) utilizando a seguinte fórmula: taxa de excreção = $\{[(\text{NHF}-\text{NHI}) / \text{g total}] / \text{L}\}$, onde NHF corresponde à concentração final amônia e NHI corresponde à concentração inicial de amônia, que foi dividido pela biomassa e pela quantidade de água de cada tanque. Também foi calculada a quantidade de amônia excretada em relação à quantidade de proteína ingerida e o resultado foi expresso em porcentagem

2.3 Experimento 3: Digestibilidade Aparente de Proteína

Para a realização do teste de digestibilidade aparente os peixes foram alojados em 20 incubadoras de fibra de vidro, com o fundo cônico ligado a um tubo coletor de fezes provido de registro, para a interrupção da passagem de água durante a coleta das fezes que entravam nesse coletor por decantação.

Cada incubadora tinha capacidade para 80 litros, sendo utilizados 70 litros. Eles possuíam aeração mecânica constante através de pedras porosas acopladas a

um aerador central e estas eram colocadas a 10 cm de profundidade para evitar que o fluxo de ar suspendesse as fezes e assim promovesse um aumento da sua lixiviação. O oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e salinidade (ppt) foram monitorados diariamente.

Em cada uma das 20 incubadoras foram distribuídos aleatoriamente três peixes ($37, 28 \pm 0,69 \text{ g}$) de modo que o peso total das incubadoras fosse o mais uniforme possível. Cada unidade experimental foi composta de uma incubadora.

O período de adaptação dos robalos às instalações, ao ambiente e ao manejo geral (alimentação, limpeza e troca de água das incubadoras) foi de um mês. Eles foram arraçoados com 2% da biomassa, sendo 1% na parte da manhã e à tarde.

O período de coleta de fezes foi de dois meses e os peixes foram alimentados com 1% da sua biomassa ao dia, dividido em duas vezes (8h e 18h). Uma hora após a alimentação, as paredes das incubadoras eram escovadas e 90% da água renovada para remover alimentos não consumidos e resíduos fecais. As fezes foram então deixadas decantar até o próximo do horário de coleta (7h e 17h). As fezes coletadas eram transferidas para um pote identificado, e estes acondicionadas a -10°C até encerramento do período de coleta. Ao final do período experimental os potes contendo as fezes coletadas foram descongelados e as fezes foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C e depois moídas em moinho de bola para a realização das análises bromatológicas e de titânio.

As análises de proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e matéria seca (MS) das dietas e das fezes foram determinadas segundo os métodos padronizados pela AOAC (2000) e realizadas no Laboratório de Bromatologia da Universidade Vila Velha, ES. A PB ($N \times 6,25$) foi determinada pelo método de Kjeldahl de acordo com a metodologia descrita por AOAC (2000). A MS foi determinada por secagem em estufa a 105°C , durante 24 h (AOAC, 2000). A EB foi calculada com a utilização dos

valores médios de energia de combustão dos nutrientes (5,65 kcal/g PB; 9,40 kcal/g lipídeo e 4,15 kcal/g de fibra e carboidrato) segundo Maynardi e Loosli (1974). O EE foi determinado por extração com éter etílico em aparelho do tipo Soxhlet, segundo AOAC (2000). A determinação de fibra bruta seguiu orientações da AOAC (2000), ou seja, digestão ácida (H₂SO₄ 1,25%); lavagem com água quente até a neutralização; digestão alcalina (NaOH 1,25%) ;lavagem com água quente até neutralização e depois, lavagem da amostra utilizando 5 mL de acetona e 5 mL de álcool etílico; filtragem a vácuo, e após as amostras serem secas calculado o percentual de FB. A determinação da concentração do titânio, nas fezes e nas dietas, foi realizada segundo a metodologia de Myers et al.(2004), ou seja, uma amostra de 0,5 g de fezes foi digerida por 2 horas em temperatura de 400°C, e a leitura de titânio feita em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 410 nm.

O Coeficiente de Digestibilidade Aparente (ADC) foi calculado de acordo com a equação de Cho et al. (1982):

$$CDA = 1 - (F/D \times Di/Fi)$$

Onde:

D= % de nutriente na dieta

F= % de nutriente das fezes

Di= concentração do indicador na dieta

Fi= concentração do indicador nas fezes

2.4 Análise estatística

Os resultados dos parâmetros foram submetidos à análise de regressão exponencial por meio do programa SigmaStat 12.5.

3 Resultados

3.1 Experimento 1: Taxa de Retenção Proteica

Os parâmetros de qualidade da água: temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, pH, amônia total dissolvida, nitrito e fósforo permaneceram, durante os 60 dias de experimento, em torno de $27,2 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$, $8,4 \pm 0,33 \text{ mg L}^{-1}$, $32,3 \pm 1,1 \text{ ppt}$, $8,32 \pm 0,19$ unidades, $0,24 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$, $0,30 \pm 0,08 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,14 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

A taxa de retenção proteica apresentou efeito quadrático positivo ($p < 0,01$; Figura 2). O aumento da concentração proteica na dieta promoveu um aumento na taxa de retenção proteica, sendo que o máximo se deu com a proteína na dieta de $510,20 \text{ g kg}^{-1}$.

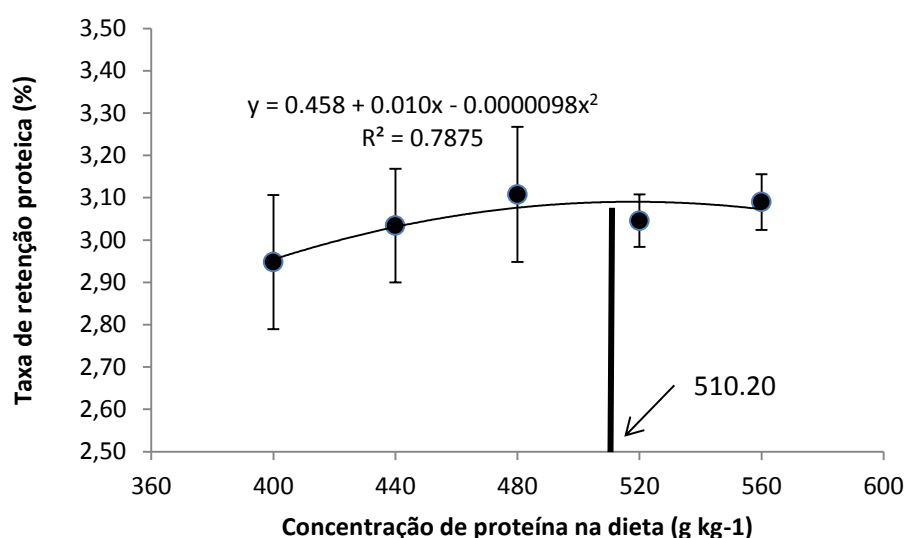


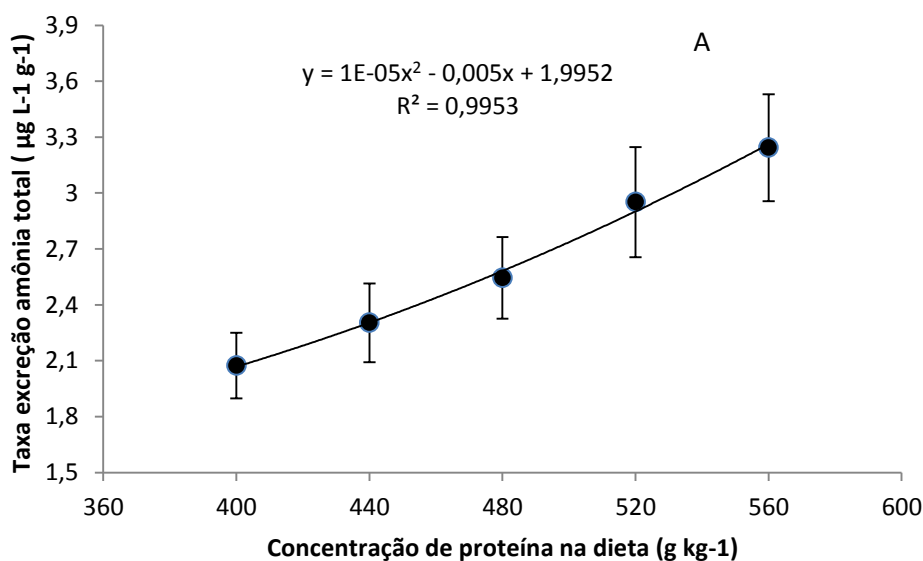
Fig. 1. Taxa de retenção proteica dos juvenis de robalo peva (média $\pm$ desvio padrão) alimentados com rações contendo diferentes concentrações de proteína bruta (PB).

3.2 Experimento 2: Excreção de amônia

Os valores médios das variáveis físicas da água durante o período experimental foram: condutividade ($50,01 \pm 0,17 \text{ mS cm}^{-1}$), salinidade ($32,91 \pm 0,05 \text{ ppt}$), temperatura ($26,89 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido ($5,77 \pm 0,06 \text{ mg L}^{-1}$) e pH ($8,34 \pm 0,05$).

Com o aumento dos níveis de proteína na dieta houve aumento da taxa de excreção de amônia total na água, apresentando um efeito quadrático positivo ($p < 0,01$; Figura 2). A dieta com a concentração de proteína de 400 g kg^{-1} apresentou uma excreção média de amônia total de $2,07 \mu\text{g g}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ dia}$, enquanto os peixes alimentados com 560 g kg^{-1} a excreção foi de $3,43 \mu\text{g g}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ dia}$, representando um aumento de 60,34%.

Na figura 2B observa-se aumento da excreção de amônia total em relação à proteína ingerida. Nas dietas de 400, 440, 480, 520 e 560 g kg^{-1} , a ingestão média de proteína foi de $1,15 \pm 0,06\text{g}$, $1,34 \pm 0,05\text{g}$, $1,46 \pm 0,11\text{g}$, $1,62 \pm 0,02$ e $1,69 \pm 0,11\text{g}$, respectivamente, e a excreção proporcional de amônia (%) em relação à quantidade da proteína ingerida foi de $52,54 \pm 4,46$, $52,69 \pm 4,83$, $53,16 \pm 6,31$, $56,12 \pm 5,61$ e $58,25 \pm 8,74$, respectivamente.



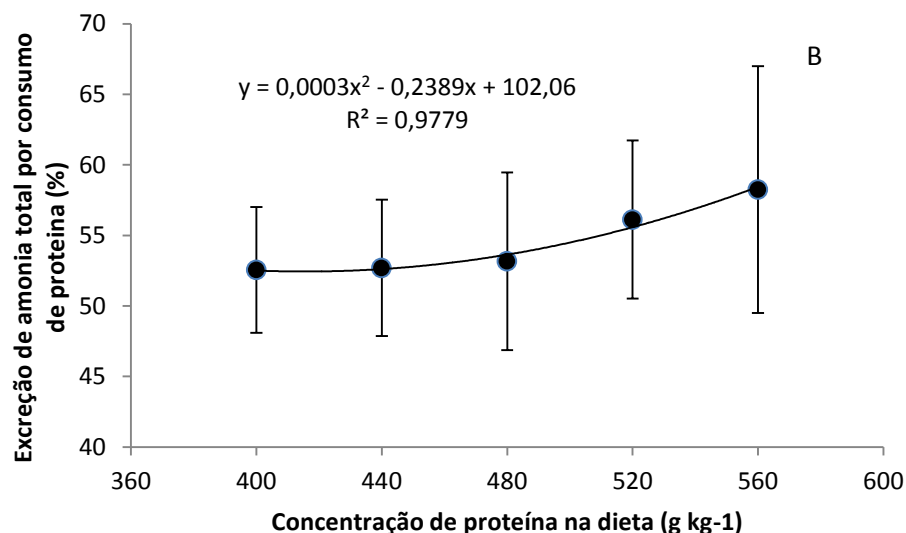


Fig. 2. Taxa de excreção de amônia total (A) e excreção de amônia por consumo de proteína (B) dos juvenis de robalo peva (média $\pm$ desvio padrão) alimentados com rações contendo diferentes concentrações de proteína bruta (PB).

3.3 Experimento 3: Digestibilidade Aparente de Proteína

Durante o período experimental, os parâmetros de qualidade da água apresentaram valores médios de temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido de $26,30 \pm 0,32^{\circ}\text{C}$, $32,14 \pm 0,69$ ppt, $51,02 \pm 0,12$ mS cm^{-1} , $7,92 \pm 0,07$ e $5,77 \pm 0,06$ mg L^{-1} , respectivamente.

Observou-se efeito quadrático ($P < 0,01$) da concentração de proteína na dieta sobre a digestibilidade aparente da proteína. O maior coeficiente de digestibilidade ocorreu nas rações 520 e 560 g kg^{-1} , sendo que as duas apresentaram valores médios semelhantes (Fig. 3). Por meio da equação quadrática, o nível de 495,62 g kg^{-1} de proteína na dieta é o que proporciona o melhor coeficiente de digestibilidade aparente.

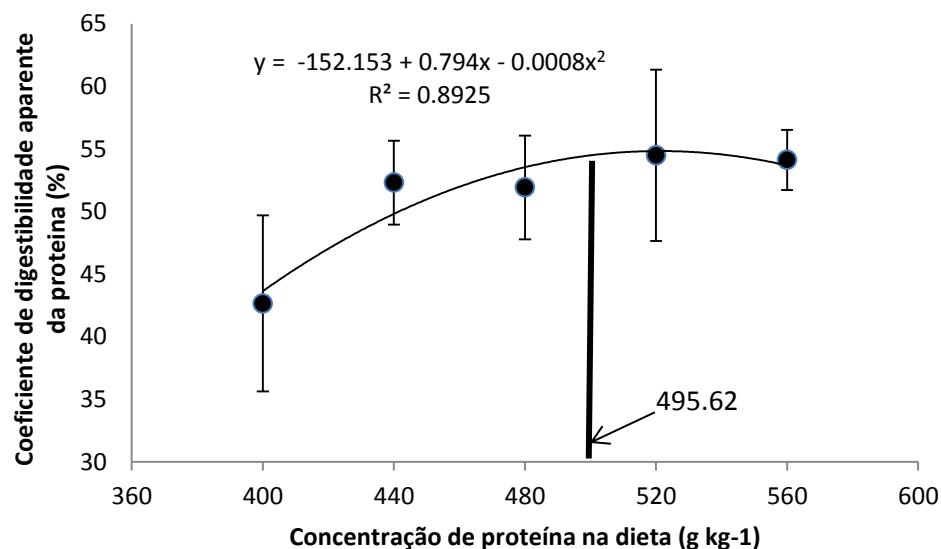


Fig. 3. Coeficiente de digestibilidade aparente dos juvenis de robalo peva (média $\pm$ desvio padrão) alimentados com rações contendo diferentes concentrações de proteína bruta (PB).

4 Discussão

Os parâmetros de qualidade da água, nos três experimentos, mantiveram-se dentro das faixas de conforto do robalo peva (Cerqueira, 2010) e, portanto não influenciaram os resultados observados na pesquisa.

A taxa de retenção de proteína aumentou nas dietas com teor de proteína de 400 até 480 g kg⁻¹ sugerindo que está ocorrendo deposição nos tecidos. De acordo com Carvalho et al. (2010), é importante a inclusão de níveis adequados de proteína na dieta para promover bons índices zootécnicos nos peixes e minimizar custos pois Souza et al. (2011) relatam que a proteína é o nutriente mais caro nas formulações de dietas para organismos aquáticos.

Observa-se que a excreção de amônia total, nas concentrações iniciais, é pequena, elevando nas duas últimas (Fig. 2). Isso provavelmente está ocorrendo em função de um excesso de proteína, pois, de acordo com Melo et al. (2006), quando a proteína está em excesso os seus aminoácidos são transaminados e/ou desaminados e o esqueleto carbônico resultante é desviado para rotas metabólicas

energéticas resultando de acordo com Sá et al. (2008) em um aumento da excreção de nitrogênio. O aumento do consumo de proteína bruta entre as dietas de 400 e 560 g kg⁻¹ promoveu um aumento na excreção de amônia total na água de 62% demonstrando assim que existe uma relação direta entre a ingestão de proteína e a excreção de amônia nos peixes. Esse resultado está de acordo com os obtidos por Abdel-Tawwab *et al.* (2010) com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), Peres e Oliva-Teles (2007) com robalo (*Dicentrarchus labrax*) e Melo *et al.* (2006) com jundiá (*Rhamdia quelen*).

A determinação dos coeficientes de digestibilidade é uma ferramenta importante na elaboração de dietas para promover uma boa nutrição aos peixes, e consequentemente obter melhores respostas de ganho de peso, conversão alimentar, taxa de retenção proteica, maiores retornos financeiros e menores impactos ambientais (Ono et al., 2010; Sakomura & Rostagno, 2007). O coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta variou, de forma não linear, de 42,66 para 54,12 quando a concentração da proteína na dieta aumentou de 400 para 560 g kg⁻¹, comprovando o relatado por Furuya et al. (2001), que o aumento na digestibilidade da dieta está diretamente relacionado com o melhor aproveitamento dos nutrientes. Porém, de acordo com Gonçalves et al. (2009) deve-se estar atento ao nível de proteína na ração, porque níveis elevados pode não ser uma boa estratégia, uma vez que o excesso pode ser convertido em energia ou excretado. Para evitar o desperdício de proteína a pesquisa recomenda que se use uma concentração de proteína na dieta de 495,62 g kg⁻¹, pois esse foi o nível determinado pela equação de regressão como o que promove a melhor digestibilidade.

Thoman *et al.* (1999) relatam que a taxa de retenção proteica tem relação positiva, entre outros fatores, com a digestibilidade e conteúdo de proteína na dieta,

sendo essa relação também observada para o robalo peva. O nível de proteína que promove maior retenção proteica e a maior digestibilidade é muito similar (diferença de 15 g kg^{-1}) e é coincidente com o aumento da excreção proporcional de amônia. Esses resultados indicam que a partir do momento que o animal diminui a absorção de proteína ele aumenta a excreção de amônia. Rações com nível de proteína superior a 50 g kg^{-1} podem causar um maior crescimento e ganho de peso como visto por Carvalho et al. (2015), mas os resultados obtidos no presente trabalho inviabilizam o seu uso. Essa afirmação está relacionada com uma ineficiência no aumento de retenção de proteína e a um maior potencial de impacto ambiental com a descarga de uma concentração mais elevada de amônia para o ambiente.

O arraçãoamento dos peixes carnívoros é comumente realizado com níveis alto de proteína (NRC, 2011; Souza et al. 2011; Cerqueira, 2010).

5. Conclusão

Com base na pesquisa realizada, a maior digestibilidade e absorção de proteína e menor excreção relativa de amônia se dá com concentrações de proteína entre 496 e 510 g kg^{-1} .

Agradecimento

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Edital nº 36/2009 por meio dos projetos 559090/2009-9 e 562821/2010-4 e a Universidade Vila Velha pelo apoio financeiro. A Empresa Nutriave pela ração experimental. Ao professor Dr. Francisco Monteiro do departamento de Ciência do Solo da USP/ESALQ pelas análises do dióxido de titânio.

6 Referências

- Abdel-Tawwab, M.; Ahmad, M.H.; Khattab, Y.A.E.; Shalaby, A.M.E. (2010). Effect of dietary protein level, initial body weight and their interaction on the growth, feed utilization and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 298: 267-274.
- Ahmed, I.; Khan, M.A. (2004). Dietary lysine requirement of fingerling Indian major carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Aquaculture*, 235: 499-511.
- Altinok, I.; Grizzle, J.M. (2004). Excretion of ammonia and urea by phylogenetically diverse fish species in low salinities. *Aquaculture*, 238: 499–507.
- American Public Health Association. (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Standard Methods on line. 2005. Section 9060. Samples. Disponível em: <http://www.standardmethods.org>. (03 fevereiro 2015).
- Association of Official Analytical Chemists-AOAC.(2000). Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Berchielli, T.T.; Vega-Garcia, A.; Oliveira, S.G. (2011). Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição. Jaboticabal: Funep.
- Canesin, R.C.; Fiorentini, G.; Berchielli, T.T. (2012). Inovações e desafios na avaliação de alimentos na nutrição de ruminantes. *Rev. bras. saúde prod. anim.*, 13, 938-953
- Carvalho, C.V.A.; Bianchini, A.; Tesser, M.B.; Sampaio, L.A.N. (2010). The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus* (Günther). *Aquac. Res.*, 41, 511-518.
- Cerqueira, V.R. 2010. Cultivo de robalo-peva (*Centropomus parallelus*). p p. 489-520. In: Baldisserotto, B. & L. C. Gomes (Eds.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria, UFSM.
- Cho, C.Y.; Slinger, S.J.; Bayley, H.S. (1982). Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity, *Comp. Biochem. Physiol.* 73, 25-41.

- Cyrino, J.E.P.; Bicudo, Á.J.D.A.; Sado, R.Y.; Borghesi, R.; Dairiki, J.K. (2010). A piscicultura e o ambiente: o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 68-87.
- Deng, J.; Mai, K.; Al, Q.; Zhang, W.; Wang, X.; Xu, W.; Liufu, Z. (2006). Effects of replacing fish meal with soy protein concentrate on feed intake and growth of juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 258, 503-513.
- Gonçalves, G.S.; Pezzato, L.E.; Barros, M.M.; Hisano, H.; Rosa, M.J.S. (2009), Níveis de proteína digestível e energia digestível em dietas para tilápias do Nilo formuladas com base no conceito de proteína ideal. *R. Bras. Zootec.*, 38, 2289-2298.
- Martínez-Palacios, C.A.; Ríos-Durán, M.G.; Ambriz-Cervantes, L. (2007). Dietary protein requirement of juvenile Mexican Silverside (*Menidia estor* Jordan 1879), a stomachless zooplanktophagous fish. *Aquacult. Nutr.*, 13, 304-310.
- Maynard, L.A.; Loosli, J.K. (1974). *Nutrição animal*. São Paulo, F. Bastos.
- Melo, J.F.B.; Lundstedt, L.M.; Metón, I.; Baanante, I.V.; Moraes, G. (2006). Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 145, 181-187.
- Myers, W.D.; Ludden, P.A.; Nayigihugu, V. (2004). Technical Note: a procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *Journal of Animal Science*, 82, 179-183.
- Nutrient Requirement Council-NRC (2011). *Nutrient requirements of fish*. Washington, Estados Unidos, National Academy Press.
- Oliveira, P. R. (2005). Coeficiente de digestibilidade aparente de ingredientes para juvenis de Jundiá, *Rhamdia quelen*. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.
- Ono, E.A.; Nunes, É.S.S.; Cedano, J.C.C.; Pereira Filho, M.; Roubach, R. (2008). Digestibilidade aparente de dietas práticas com diferentes relações energia:proteína em juvenis de pirarucu. *Pesq. agropec. bras.*, 43, 249-254.

- Peres, H.; Oliva-Teles, A. (2007). Effect of the dietary essential amino acid pattern on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 267, 119-128.
- Pond, W. G.; Church, D. C.; Pond, K. R. (2005). Basic animal nutrition and feeding. Hoboken, Wiley.
- Sá, R.; Pousão-Ferreira, P.; Oliva-Teles, A.(2008). Dietary protein requirement of white sea bream (*Diplodus sargus*) juveniles. *Aquacult. Nutr.*, 14, 309-317..
- Sakomura, N. K.; Rostagno, H. S. (2007). Métodos de Pesquisa em Nutrição de Monogástricos.
- Satpathy, B.B.; Mukherjee, D.; Ray, A.K. (2003). Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed conversion and body composition in rohu (*Labeo rohita*). *Aquaculture Nutrition*, 9, 17-24.
- Souza, J.H, D.M. Fracalossi, A.S. Garcia, F.F. Ribeiro & M.Y. Tsuzuki. 2011. Desempenho zootécnico e econômico de juvenis de robalo-peva alimentados com dietas contendo diferentes concentrações proteicas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46:190-195. doi: 10.1590/S0100-204X2011000200011
- Statistical Analyses System- SAS. (2002). SAS/STAT User guide, Version 9.1.2. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Thoman, E.S.; David, D.A.; Arnold, C.R. (1999). Evaluation of grow out diets with varying protein and energy levels for red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 176, 343-353.
- Titgemeyer, E.C.; Armendariz, C.K.; Bindel, D.J.; Greenwood, R.H.; Loest, C.A. (2001). Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *Journal of Animal Science*, 79, 1059-1063.
- Webb, K.A.JR.; Rawlinson, L.T.; Holt, G.J. (2010). Effects of dietary starches and the protein to energy ratio on growth and feed efficiency of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture Nutrition*, 16, 447–456.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização da pesquisa espera-se ter contribuído para trazer novas informações referentes à concentração ideal de proteína nas dietas de robalo peva (*Centropomus parallelus*), nas fases de recria e engorda que promovem menor impacto ambiental, bons índices zootécnicos e econômicos.

O presente estudo foi pioneiro em integrar as áreas de produção zootécnica e econômica com a ambiental proporcionando informações úteis para piscicultores, profissionais e fabricantes de ração.

É necessária ampliar a pesquisa realizando experimentos com a aplicação do conceito de proteína ideal na formulação de rações de robalos, ou seja, reduzir a concentração de proteína bruta da dieta com a adição de aminoácidos industriais.

Todas as dificuldades encontradas durante a pesquisa foram muito valiosas e contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

Em síntese, com base nos resultados da pesquisa, considera-se:

1. Concentração ideal de proteína bruta na dieta para fase de recria (3g)

1.1 Desempenho zootécnico:

O ganho de peso e a taxa de crescimento específico aumentaram à medida que os teores de proteínas na ração elevaram, porém como não atingiu o máximo de desempenho. O valor, calculado pela regressão quadrática, para maior desempenho é de 620 g kg^{-1} de proteína na dieta.

A conversão alimentar, o peso médio final, a biomassa e a taxa de retenção proteica tiveram os piores resultados com a concentração de 400 g kg^{-1} .

O teor de proteína bruta corporal foi afetado pelo nível de proteína na dieta, enquanto os teores de extrato etéreo, cinzas e umidade não diferiram. Como o nível

de lipídeos não diferiu entre as dietas experimentais pode concluir que os níveis de proteína pesquisados não estão em excesso.

Os parâmetros econômicos: custo da ração, custo médio de alimentação, índice de eficiência econômica e índice de custo foram significativamente menores nas concentrações de 520 e 560 g kg⁻¹ de proteína.

1.2 Excreção de amônia:

As dietas experimentais com nível mais alto de proteína resultaram em maiores taxas de excreção de amônia na água, apresentando um efeito quadrático positivo.

1.3 Toxicidade crônica de curta duração com uso de ouriço-do-mar

A concentração de efeito não observado (CENO) se deu no tratamento de 480g kg⁻¹ e a concentração de efeito observado (CEO), no de 520 g kg⁻¹ e a concentração que causa efeito inibitório a 50% dos organismos foi estimada, pela regressão, em 860 g kg⁻¹ de proteína bruta.

2 Concentração ideal de proteína bruta na dieta para fase de engorda (27 g)

2.1 Desempenho zootécnico:

A dieta com maior concentração de proteína (560 g kg⁻¹) teve a melhor resposta para o ganho em peso, a taxa de crescimento específico e conversão alimentar.

O custo médio de alimentação (CMA- \$/Kg) não diferiu entre as concentrações de proteína nas rações.

2.2 Toxicidade crônica de curta duração com uso de ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea):

Não houve CENO, pois a primeira concentração testada (400 g kg^{-1}) já apresentou diferença significativa do controle e foi considerado o CEO apesar de não ter sido observado efeito inibitório a 50% dos organismos em nenhuma das concentrações.

A CE_{50} , determinada pela regressão polinomial, se dá com dieta de concentração de 610 g kg^{-1} de proteína.

2.3 Modelo simplificado integrado de avaliação

Baseada nos cenários propostos, para o modelo biológico robalo peva, verificou-se que a concentração de proteína ideal variou de cenário para cenário sendo que no cenário onde os pesos são iguais para os três parâmetros (produtividade, econômico e ambiental) e onde o peso foi maior para o ambiental, a concentração de proteína na dieta recomendada é de 400 g kg^{-1} . Quando houve um peso maior para a produtividade animal, a ração indicada foi de 560 g kg^{-1} . Já quando o parâmetro econômico teve um peso maior, foram recomendadas duas dietas, as 400 e 440 g kg^{-1} .

Em função da realidade atual da piscicultura, o cenário que coloca um maior peso nos parâmetros produtivo e econômico é o que mais condiz com a atividade, e em função disso, recomenda-se, para o modelo biológico estudado (robalo peva) a ração de 480 g kg^{-1} .

2.4 Taxa de Retenção Proteica

A maior retenção proteica, determinada pela função quadrática, ocorreu com a maior concentração de proteína na dieta.

2.5 Excreção de amônia

Com o aumento da concentração de proteína na dieta, ocorre um aumento não linear dos valores médios da excreção de amônia total.

O maior teor de proteína nas dietas (400 a 560 g kg⁻¹) promoveu aumento na excreção de amônia total na água de 62% demonstrando assim que existe uma relação direta entre a ingestão de proteína e a excreção de amônia nos peixes.

2.6 Digestibilidade Aparente de Proteína

A digestibilidade aparente da proteína apresentou um efeito quadrático positivo em relação à concentração de proteína na dieta tendo o maior coeficiente de digestibilidade nas rações 520 e 560 g kg⁻¹.

Por meio da equação quadrática, o nível de 495,62 g kg⁻¹ de proteína na dieta é o que proporciona o melhor coeficiente de digestibilidade aparente.

As concentrações de proteína na dieta, recomendada pela pesquisa, para maior digestibilidade e absorção de proteína, e menor excreção relativa de amônia são entre 496 e 510 g kg⁻¹.