

MARCADORES INTERNOS COMO ALTERNATIVA AO ÓXIDO DE CRÔMIO-III NA DETERMINAÇÃO DA DIGESTIBILIDADE APARENTE EM TILÁPIA DO NILO

Renan de Mattos Botelho¹
Rafael Lopes da Silva²
Mariucha Karina Honório Ribeiro Rocha³
Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho³
Flávia Mota Damasceno³
Hinglidj de Carvalho Muller⁴
Heraldo César Gonçalves⁵
Luiz Edivaldo Pezzato⁶

RESUMO

Foram avaliadas cinco técnicas para determinação do coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), energia bruta (EB) e matéria mineral (MM). O objetivo do estudo foi comparar marcadores internos como a fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose (CEL) e matéria orgânica resistente a hidrólise (MORH), como alternativa ao marcador externo óxido de crômio-III (Cr_2O_3) em dietas para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para tal, foram formuladas duas dietas, uma purificada com base em proteína da albumina e gelatina e outra prática, com base em proteína do farelo de soja. Óxido de crômio-III (0,1%) foi adicionado em ambas às dietas. Oitenta peixes (100,0±4,3 g) foram alojados em tanques-rede para o manejo de alimentação e coleta de fezes. O coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes foi calculado com base no teor de Cr_2O_3 das dietas e das fezes e comparado aos demais marcadores internos pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Na dieta purificada, a utilização das frações FDN, FDA, CEL e MORH como indicadores de CDA mostraram-se ineficientes em todas as variáveis analisadas. Para a dieta prática, tanto a FDA como a CEL mostraram-se semelhantes ao Cr_2O_3 para a determinação do CDA da MS, PB, EB e MM.

Palavras-chave: marcadores internos, nutrição de peixes, *Oreochromis niloticus*

INTERNAL MARKERS AS ALTERNATIVE TO CHROMIUM-III OXIDE TO DETERMINE APPARENT DIGESTIBILITY IN NILE TILAPIA

ABSTRACT

It were evaluated five different technical procedures to determine apparent digestibility coefficient (ADC) of dry matter (DM), crude protein (CP), gross energy (GE) and ash. The aim of this study was to compare internal markers such as neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), cellulose (CEL) and hydrolysis resistant organic matter (HROM), as an alternative the external marker chromium oxide-III (Cr_2O_3), in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Thus, it were formulated two different diets, a purified diet based in protein of albumin and gelatin and a practical diet with soybean meal as protein source.

¹ Mestrando do Programa de Pós-graduação em Zootecnia; Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal (DMNA), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP). Fazenda Experimental Lageado, Botucatu-SP, CEP 18618-970. Fone (14) 3811-7237. naner_mattos@hotmail.com (autor para correspondência).

² Aluno do Programa de Pós-graduação em Aqüicultura, CAUNESP, UNESP, Jaboticabal-SP.

³ Aluno(a) do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, FMVZ, UNESP, Botucatu-SP.

⁴ Aluna do Curso de Zootecnia, FMVZ, UNESP, Botucatu-SP.

⁵ Prof. Assistente Doutor, Departamento de Produção Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu-SP.

⁶ Prof. Adjunto, Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu-SP.

Chromium oxide-III (0.1%) was added in both diets. Eighty fish (100.0±4.3 g) were placed in net tanks to feed handling and feces collecting. The ADC of nutrients was calculate based in the level of Cr₂O₃ content in diets and feces, and compared to other internal markers using the Tukey test (P<0.05). The utilization of NDF, ADF, CEL and HROM fraction as indicators of ADC were inefficient in every analyzed variable in purified diet. However, in control diet the fractions ADF and CEL were similar to Cr₂O₃ to determine ADC of DM, CP, CE and Ash.

Keywords: internal markers, fish nutrition, *Oreochromis niloticus*

MARCADORES INTERNOS COMO ALTERNATIVA AL ÓXIDO DE CROMO-III EN LA DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD APARENTE EN TILAPIA DEL NILO

RESUMEN

Se evaluaron cinco técnicas para la determinación de los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de materia seca, proteína cruda (PC), energía bruta (EB) y materia mineral (MM). El objetivo del estudio fue comparar los marcadores internos como la fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA), celulosa (CEL) y la materia orgánica resistente a la hidrólisis (MORH) como alternativa al marcador óxido de cromo-III (Cr₂O₃) en dietas para tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). Con este fin, dos dietas fueron formuladas, una de ellas purificada con base en proteína de albumina y gelatina, y otra práctica basada en proteína de harina de soya. Fue agregado óxido de cromo-III (0,1%) a ambas dietas. Ochenta peces (100,0±4,3 g) fueron alojados en tanques-red para la gestión de las dietas y colecta de las heces. La digestibilidad aparente de nutrientes se calculó con base en el contenido de Cr₂O₃ de las dietas y las heces, así como en la comparación con otros marcadores internos por medio de la prueba de Tukey (P<0,05). En la dieta purificada, el uso de las fracciones FDN, FDA, CEL e MORH como indicadores de la CDA demostró ser ineficaz en todas las variables. Para la dieta práctica, tanto la FDA como CEL fueron similares a Cr₂O₃ para la determinación de la CDA de MS, PC, EB y MM.

Palabras clave: marcadores internos, nutrición de peces, *Oreochromis niloticus*

INTRODUÇÃO

Devido à alimentação ser o item mais oneroso na produção animal, pesquisas em diferentes áreas visam otimizar o aproveitamento da dieta pelo animal. Dentre estas, encontram-se os ensaios de digestibilidade, objetivando conhecer o valor nutritivo dos alimentos, para que a indústria possa formular rações mais adequadas aos peixes tropicais quanto aos aspectos zootécnicos, econômicos e ambientais.

A análise química e os testes alimentares são os primeiros itens para se determinar o valor nutritivo de um ingrediente. Entretanto, após a ingestão, sua efetiva assimilação depende do uso que o organismo animal esteja capacitado a executar (1). Segundo Higuera (2), o resultado desse processo varia em função da espécie, condições ambientais, quantidade e qualidade do nutriente, proporção relativa entre os nutrientes e, do processamento a que o alimento tenha sido submetido.

Assim, a digestibilidade descreve a fração do nutriente ou da energia do alimento que não é excretada nas fezes (3). A variação do aproveitamento de nutrientes dentre as espécies pode ser quantificada pela determinação do coeficiente de digestibilidade, o qual define a habilidade com que o animal digere e absorve os nutrientes e a energia contidos na dieta (4). Segundo Sullivan e Reigh (5), independentemente do método utilizado para determinação dos

coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) de uma dieta ou alimento, os resultados dependem do meio, hábito alimentar e homeostase dos peixes, composição e processamento da dieta e, da acurácia do avaliador.

Os marcadores externos utilizados para determinar os CDA dos alimentos são adicionados à dieta ou administrados por outra via ao animal, enquanto os marcadores internos ocorrem naturalmente nos alimentos (6). Os indicadores permitem estimar a quantidade de alimento ou nutriente consumido, medir o tempo e a taxa de passagem da ingesta pelo trato digestório e estimar o coeficiente de digestibilidade total ou parcial dos alimentos.

Determinar os CDAs das rações produzidas pela indústria utilizando marcadores do próprio alimento é alternativa interessante, uma vez que é impraticável produzir tais dietas contendo os marcadores externos convencionais. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os marcadores internos do alimento como alternativa ao marcador externo óxido de cromo-III, na determinação do coeficiente de digestibilidade aparente da dieta pela tilápia do Nilo.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida na Univ. Estadual Paulista (UNESP), no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (*AquaNutri*), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu-SP, durante o período de 10 de janeiro a 10 de março de 2011.

Para determinação dos CDA, duas dietas foram formuladas de forma a atender as exigências nutricionais da tilápia do Nilo (3). Dessas, uma é denominada purificada, segundo o Instituto de Nutrição Americano (7), e foi formulada com base em proteína da albumina e gelatina (Tabela 1) e outra, denominada prática, formulada com base em proteína do farelo de soja (Tabela 2). Óxido de cromo-III foi incorporado como marcador externo na concentração de 0,1% em ambas as dietas. A composição química-bromatológica das dietas purificada e prática encontram-se na Tabela 3.

Para a confecção das rações, os ingredientes foram moídos de forma a se apresentarem com diâmetro inferior a 0,42 mm. As rações foram manualmente homogeneizadas e água a 55,0°C foi adicionada (25% do peso natural) à mistura em misturador automático. As misturas foram então peletizadas e, após resfriamento, secas em estufa com recirculação forçada de ar a 55,0°C/24 horas. Após, os péletes foram desintegrados em equipamento próprio para fracionamento, para a obtenção de grânulos homogêneos com diâmetro médio de 4,0 mm. Por fim, as dietas foram armazenadas em freezer a -20,0°C até posterior utilização.

Para alimentação, os peixes foram alojados em oito aquários circulares com capacidade de 250 litros. Para a coleta de fezes foram utilizados quatro aquários com capacidade de 300 litros, com fundo cônico para favorecer a decantação das fezes, que se depositavam em um recipiente com capacidade para 300 ml. Os aquários utilizados para alimentação eram ligados a sistema de recirculação contínua de água, com filtro físico e biológico, com aeração constante e temperatura da água mantida por meio de termostato eletrônico digital. Os aquários utilizados para a coleta de fezes eram providos de sistema individual de recirculação de água e, para o aquecimento e aeração da água, foram utilizados aquecedores individuais e pedra porosa acopladas a soprador externo.

Tabela 1. Composição percentual da dieta purificada.

Ingredientes	(%)
Albumina	32,00
Gelatina	7,70
Amido	43,83
Óleo de soja	6,00
CMC ¹	6,00
Fosfato bicálcico	3,00
Suplemento mineral e vitamínico ²	0,80
Vitamina C ³	0,05
BHT ⁴	0,02
Sal comum	0,50
Óxido de crômio-III ⁵	0,10
Total	100,00

¹CMC, Carboximetilcelulose; ²Suplemento vitamínico e mineral. Composição por quilo de produto: Vit. A, 1.200.000 UI; vit. D3, 200.000 UI; vit. E, 12.000mg; vit. B1, 4.800 mg; vit. B2, 4.800 mg; vit. B6, 4.000 mg; vit. B12, 4.800 mg; ác. fólico, 1.200 mg; pantotenato de cálcio, 12.000 mg; vit. C, 48.000 mg; biotina, 48 mg; colina, 65.000 mg; ác. nicotínico, 24.000 mg; Fe, 10.000 mg; Cu, 600 mg; Mn, 4.000 mg; Zn, 6.000 mg; I, 20 mg; Co, 2 mg e Se, 20 mg; ³Vitamina C: sal cálcica 2-monofosfato de ácido ascórbico, 42% de princípio ativo; ⁴Butil-Hidróxi-tolueno (Antioxidante); ⁵Marcador externo.

Tabela 2. Composição percentual da dieta prática.

Ingredientes	(%)
Farelo de soja	60,34
Milho	33,63
Óleo de soja	2,44
DL-Metionina	0,20
Treonina	0,21
Fosfato bicálcico	2,11
Sal comum	0,10
Suplemento Vit. e mineral ¹	0,80
Vitamina C ²	0,05
BHT ³	0,02
Óxido de crômio-III ⁴	0,10
Total	100,00

¹Suplemento vitamínico e mineral, Composição por quilo de produto: Vit. A, 1.200.000 UI; vit. D3, 200.000 UI; vit. E, 12.000mg; vit. B1, 4.800 mg; vit. B2, 4.800 mg; vit. B6, 4.000 mg; vit. B12, 4.800 mg; ác. fólico, 1.200 mg; pantotenato de cálcio, 12.000 mg; vit. C, 48.000 mg; biotina, 48 mg; colina, 65.000 mg; ác. nicotínico, 24.000 mg; Fe, 10.000 mg; Cu, 600 mg; Mn, 4.000 mg; Zn, 6.000 mg; I, 20 mg; Co, 2 mg e Se, 20 mg; ²Vitamina C: sal cálcica 2-monofosfato de ácido ascórbico, 42% de princípio ativo; ³Butil-Hidróxi-tolueno (Antioxidante); ⁴Marcador externo.

Tabela 3. Composição química-bromatológica das dietas (% da matéria natural)

Nutriente ¹	Dieta purificada	Dieta prática
MS	88,83	93,70
EB (kcal/kg)	4184	4216
PB	33,67	29,13
MM	5,20	6,94
FB	4,35	4,75
EE	6,70	4,48

¹MS, matéria seca; EB, energia bruta; PB, proteína bruta; MM, matéria mineral; FB, fibra bruta; EE = extrato etéreo.

Os peixes, oitenta juvenis (100,0±4,3 g), foram alojados na densidade de dez peixes por unidade, em tanques-rede de formato circular (80,0 cm de diâmetro e 60,0 cm de comprimento), confeccionados em tela plástica (malha de 1,5 cm). Esses tanques-rede foram utilizados para abrigar os peixes e facilitar o manejo entre os sistemas de alimentação e coleta de fezes, proporcionando menor estresse aos peixes. Empregou-se a metodologia proposta por Pezzato et al. (8), onde os peixes foram alimentados em um sistema independente do sistema coletor de fezes, evitando a contaminação do material colhido.

Durante o período matutino, os peixes foram alimentados a cada duas horas e no período vespertino a alimentação foi intensificada a cada hora. Esta frequência alimentar foi aplicada a um dos grupos (quatro das gaiolas) em dias subsequentes, do qual eram obtidas as amostras de fezes. Ao segundo grupo, era adotado apenas o manejo de alimentação. Às 18 horas, os tanques-rede eram transferidos aos aquários de coleta de fezes, onde permaneceram até a manhã do dia seguinte, sendo, então, o tanque-rede devolvido ao respectivo aquário de alimentação e a coleta das fezes realizada. Após a coleta, as fezes de cada aquário de coleta foram centrifugadas (600 rpm/min), descartando assim a fase líquida, desidratadas em estufa com recirculação forçada (55,0°C/48 horas), moídas, homogeneizadas e armazenadas a -20,0°C. Foi coletado um volume representativo de fezes para obtenção de quatro repetições por tratamento.

As análises químico-bromatológicas das rações e fezes foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da FMVZ – UNESP – Botucatu, segundo os protocolos da AOAC (9).

Foram comparados os CDA da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), energia bruta (EB) e matéria mineral (MM), empregando-se os seguintes marcadores: fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), celulose (CEL), matéria orgânica resistente a hidrólise (MORH) e o marcador externo óxido de crômio-III (Cr₂O₃).

As análises para determinação dos valores de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido foram realizadas segundo Van Soest e Wine (10), seguindo modificações propostas por Souza et al. (11), Silva e Queiroz (12) e Kelley (13). A determinação da celulose foi realizada segundo Cochran et al. (14) e a da MORH de acordo com o Compêndio (15). As análises para determinação da concentração de crômio-III foram realizadas segundo Bremer Neto et al. (16).

O coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) foi calculado de acordo com a seguinte equação (17).

$$CDA_n = 100 - 100 \left[\left(\frac{\% \text{marcador}_d}{\% \text{marcador}_f} \right) \times \left(\frac{\% N_f}{\% N_d} \right) \right]$$

Onde:

CDA_n = coeficiente de digestibilidade aparente; %marcador_d = percentagem de marcador na dieta; %marcador_f = percentagem de marcador nas fezes; %N_f = percentagem de nutriente nas fezes; %N_d = percentagem de nutriente na dieta.

Foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 x 5), com duas rações e cinco marcadores. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando constatada significância, foi aplicado o teste de Tukey (18). Os dados analisados foram submetidos ao programa computacional SAEG (19).

Os parâmetros de oxigênio dissolvido (5,7±0,83 mg/L) e pH (7,0±0,5) foram determinados semanalmente durante o período experimental utilizando-se sonda YSI 556 MPS[®]. A temperatura da água (26,0±1,32°C) foi aferida diariamente por meio de termostato digital. A iluminação ambiente foi obtida por meio de lâmpadas fluorescentes, com fotoperíodo estabelecido das 8 às 18 horas.

RESULTADOS

Observou-se efeito significativo ($P < 0,05$), apresentando interação entre os marcadores e rações, para todas as variáveis em estudo (Tabela 4). O desdobramento da interação entre marcador e ração encontra-se na Tabela 5. Não foi verificada diferença estatística entre os CDA das rações ($P > 0,05$) para a variável PB utilizando a fração MORH e para as variáveis MS, EB e MM, utilizando Cr_2O_3 como marcador.

Tabela 4. Valores de coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), energia bruta (EB) e matéria mineral (MM) expressos na matéria seca, determinados em juvenis de tilápia do Nilo submetidos à alimentação com dieta purificada e prática utilizando-se diferentes marcadores.

Marcador	MS	PB	EB	MM
FDN ¹	-26,82	68,27	-15,54	-106,48
FDA ²	10,67	77,19	17,49	-46,64
CEL ³	51,89	87,58	56,18	19,71
MORH ⁴	31,22	82,10	36,42	-18,49
Cr_2O_3 ⁵	73,85	94,16	78,52	51,83
Dieta				
Purificada	-5,56	73,83	1,19	-68,08
Prática	61,88	89,89	68,04	28,04
CV ⁶ (%)	2,49	1,39	2,53	2,71
Valor de P				
Marcador (M)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Dieta (D)	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
M x D	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

¹FDN, Fibra em detergente neutro; ²FDA, Fibra em detergente ácido; ³CEL, Celulose; ⁴ MORH, Matéria orgânica resistente a hidrólise; ⁵Óxido de crômio-III; ⁶CV, Coeficiente de variação.

Tabela 5. Desdobramento da interação entre dieta e marcadores para os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), energia bruta (EB) e matéria mineral (MM) para juvenis de tilápia do Nilo.

MS					
Dieta	FDN	FDA	CEL	MORH	Cr_2O_3
Purificada	112,59Db	47,45Cb	29,89Bb	28,09Bb	74,24Aa
Prática	58,95Ba	68,78Aa	73,88Aa	34,34Ca	73,46Aa
PB					
Dieta	FDN	FDA	CEL	MORH	Cr_2O_3
Purificada	47,41Db	62,32Cb	82,09Bb	81,97Ba	95,36Aa
Prática	89,14Ba	92,06Aa	93,06Aa	82,31Ca	92,96Ab
EB					
Dieta	FDN	FDA	CEL	MORH	Cr_2O_3
Purificada	97,55Db	39,77Cb	34,01Bb	29,11Bb	80,15Aa
Prática	66,46Ba	74,76Aa	78,35Aa	43,73Ca	76,91Aa
MM					
Dieta	FDN	FDA	CEL	MORH	Cr_2O_3
Purificada	235,47Cb	134,94Db	10,96Bb	12,93Bb	53,91Aa
Prática	22,49Ba	41,65Aa	50,36Aa	24,04Ca	49,75Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e letra minúscula na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

DISCUSSÃO

A utilização das frações FDN, FDA, CEL e MORH como marcadores indicativos de CDA mostraram-se ineficientes para a dieta purificada em todas as variáveis analisadas quando comparados à técnica que utiliza o Cr_2O_3 como marcador do CDA. Pode-se atribuir esse resultado ao fato da utilização na dieta purificada do CMC (carboximetilcelulose) em sua composição. Esse componente apresenta, dentre suas características, ser forte ligante, espessante e estabilizante, além de ser doador de viscosidade para algumas formulações de detergentes. Forma filmes resistentes a óleos, graxas, solventes orgânicos e serve de meio de suporte para imobilização de enzimas e/ou micro-organismos (20-22). Esta última característica talvez seja o principal fator a interferir no processo de análise química, uma vez que durante as análises entram em contato com a enzima α -amilase, para que o amido seja degradado e não interfira nas reações *in vitro*, realizadas de forma seqüencial (12-14).

Para a dieta prática, o uso da fração FDN como marcador interno resultou em valores de CDA diferentes ($P < 0,05$) aos obtidos com a utilização do Cr_2O_3 , corroborando os dados de De Silva (23) que, em ensaio de digestibilidade com a tilápia do Nilo, utilizando a fibra bruta como marcador interno, encontrou resultados baixos e inconsistentes dos CDA. O autor ainda sugeriu que a fibra bruta, devido à morfologia do sistema digestivo das tilápias, pode ter sofrido degradação microbiana no intestino posterior, interferindo na recuperação deste marcador. Entretanto, resultado contrário foi descrito por Sampaio et al. (24) que, em estudo com esta mesma espécie, reportaram valores de CDA semelhantes ao Cr_2O_3 para a matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo.

Para a dieta prática, a utilização da FDA como marcador interno na ração prática resultou em valores de CDA semelhantes ($P > 0,05$) aos obtidos com o uso do Cr_2O_3 . Resultado semelhante foi descrito por Morales et al. (25), que em experimento de digestibilidade com a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, relataram resultados de CDA da matéria seca e proteína similares, quando do emprego dos marcadores óxido de cromo ou fibra bruta. Entretanto, resultado diferente foi encontrado por Vidal Jr et al. (26) que, em ensaio de digestibilidade com tambaqui *Colossoma macropomum*, observaram valores do coeficiente de digestibilidade verdadeiro para a matéria seca e proteína menores ($P < 0,05$) que os obtidos com o uso do marcador externo Cr_2O_3 . Os autores ainda sugeriram que essa diferença seja devida a baixa recuperação deste marcador, fato não observado neste estudo.

A utilização da fração CEL resultou em valores de CDA para MS, PB, EB e MM semelhantes ($P > 0,05$) aos obtidos com o uso da FDA e do Cr_2O_3 como marcadores para a dieta prática. Resultado diferente foi descrito por Sampaio et al. (24) que afirmaram que as frações MORH e lignina, além da FDN, são as mais indicadas para a determinação de CDA da proteína e do extrato etéreo, porém não para a matéria seca, quando do emprego de dieta contendo ingredientes de origem exclusivamente vegetal.

Buddington (27) em estudo comparativo entre marcadores indicativos de CDA, em truta arco-íris e três espécies de tilápia (*Oreochromis aureus*, *O. mossambica* e *O. nilotica*), concluiu que a MORH é mais eficiente e acurada que o Cr_2O_3 . Neste estudo, a fração MORH, devido a sua baixa recuperação, não apresentou eficiência como marcador indicativo de digestibilidade, corroborando os dados de De Silva e Perera (28), em estudo com o ciclídeo asiático *Etroplus suratensis*.

CONCLUSÃO

As frações FDA e CEL podem ser utilizadas como alternativa ao marcador externo Cr_2O_3 em rações práticas para a tilápia do Nilo. Entretanto, as frações FDN, FDA, CEL e MORH não se mostraram eficientes quando empregadas como marcadores internos em dieta purificada.

COMITE DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Todos os procedimentos realizados encontram-se de acordo com as normas e princípios éticos de experimentação animal, estabelecidos pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ/UNESP/Botucatu, sendo o experimento aprovado pela mesma (Protocolo nº 167/2011-CEUA) em 03 de junho de 2011.

REFERÊNCIAS

1. Maynard LA, Loosly JK. Nutrição animal. Rio de Janeiro: McGraw Hill; 1966.
2. Higuera M. Diseños y métodos experimentales de evaluación de dietas. In: Espinosa J, Labarta U. Nutricion en acuicultura II. Madrid: Industrias Gráficas España; 1987. p.291-316.
3. National Research Council. Nutrient requirements of warmwater, fishes and shellfishes: nutrient requirements of domestics animals. Washington DC: National Academic Press; 1993.
4. Andrigueto JM, Perly L, Minardi I, Gemael A, Fleming JS, Souza GA, et al. Nutrição animal. Paraná: Nobel; 1982.
5. Sullivan JA, Reigh RC. Apparent digestibility of selected feedstuffs in diets for hybrid striped bass (*Morene saxatilis* x *Morene chrysops*). *Aquaculture*. 1995;138:313-22.
6. Kotb AR, Luckey TD. Markers in nutrition. *Nutr Abstr Rev*. 1972;42:814-45.
7. American Institute of Nutrition. Report of the american institute of nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr*. 1977;107:1340-8.
8. Pezzato LE, Miranda EC, Barros MM, Furuya WM, Pinto LGQ. Digestibilidade aparente da matéria seca e da proteína bruta e a energia digestível de alguns alimentos alternativos pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Sci*. 2004;26:329-38.
9. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analisis. Arlington: Association of Analytical Communities; 1995.
10. Van Soest PJ, Wine RH. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. Determination of plant-cell constituents. *J Assoc Off Anal Chem*. 1967;50:50-5.
11. Souza GB, Nogueira ARA, Sumi LM, Batista LAR. Método alternativo para a determinação de fibra em detergente neutro e detergente acido. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste; 1999.
12. Silva DJ, Queiroz AC. Análise de alimentos - métodos químicos e biológicos. 3ª ed. Viçosa - MG: Imprensa Universitária; 2002.
13. Kelley CL. Operator's manual. New York: Ankom Technology; 1998.
14. Cochran RC, Adams DC, Wallace JD, Galyean ML. Predicting digestibility of different diets with internal makers: evaluation of four potential markers. *J Anim Sci*. 1986;63:1476-83.

15. Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal. Guia de métodos analíticos, métodos físicos-químicos. São Paulo: Sindirações/MAPA; 2005.
16. Bremer Neto H, Graner CAF, Pezzato LE, Padovani LR. Determinação de rotina do cromo em fezes, como marcador biológico, pelo método espectrofotométrico ajustado da 1,5 difenilcarbazida. Cienc Rural. 2005;35:691-7.
17. Nose T. On the digestion of food protein by gold-fish (*Carassius auratus*) L. and rainbow trout (*Salmo irideus*). Bull Freshw Fish Res Lab. 1960;10:11-22.
18. Steel RGD, Torrie SH. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 2nd ed. Auckland: McGraw-Hill International; 1984.
19. Universidade Federal de Viçosa. SAEG: sistema de análises estatísticas e genéticas - manual do usuário. versão 9.1. Viçosa - MG: UFV; 2007.
20. Fujimoto J, Reis EAO, Petri DFS. Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína. Quim Nova. 2002;25:757-61.
21. Will R, Sasano T. Chemical economics handbook - marketing research report abstracts cellulose ethers. USA: CEH; 2001.
22. Sieger CNH, Kroon AGM, Batelaan JG, van Ginkel CG. Biodegradation of caboxymethyl celluloses by agrobacterium CM-1. Carbohydr Polym. 1995;27:137-43.
23. De Silva SS. Evaluation of the use of internal and external markers in digestibility studies. In: Cho CY. Finfish nutrition in Asia, methodological approaches to research and development. Ottawa: International Development Research Center; 1985. p.96-102.
24. Sampaio FG, Pezzato LE, Barros MM, Kleemann GK, Falcon DR, Hisano H, et al. Internal and external dietary markers to determine the apparent digestibility coefficient for Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Book of abstracts. Salvador. World Aquaculture; 2003. p.673.
25. Morales AE, Cardenete G, Sanz A, Higuera M. Re-evaluation of crude fibre and acid-insoluble ash as inert markers, alternative to chromic oxide, in digestibility studies with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 1999;179:71-9.
26. Vidal Jr MV, Donzele JL, Andrade DR, Santos LC. Determinação da digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta do fubá de milho e do farelo de soja para tambaqui (*Colossoma macropomum*), utilizando-se técnicas com uso de indicadores internos e externos. Rev Bras Zootec. 2004;33:2193-200.
27. Buddington RK. Hydrolysis-resistant organic matter as a reference for measurement of fish digestive efficiency. Trans Am Fish Soc. 1980;109:653-6.
28. De Silva SS, Perera MK. Digestibility of an aquatic macrophyte by the cichlid *Etilapia suratensis* (Bloch) with observations on the relative merits of three indigenous components as markers and daily changes in protein digestibility. J Fish Biol. 1983;23:675-84.

Recebido em: 31/01/12

Aceito em: 20/08/12