

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ÁCIDO CÍTRICO EM RAÇÕES PARA JUVENIS DE PACU
(Piaractus mesopotamicus)

Acadêmico: Marcelo dos Santos Nascimento

Aquidauana – MS
Maio / 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ÁCIDO CÍTRICO EM RAÇÕES PARA JUVENIS DE PACU
(Piaractus mesopotamicus)

Acadêmico: Marcelo dos Santos Nascimento
Orientador: Dr. Hamilton Hisano

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado – Pantanal, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia”.

Aquidauana – MS
Maio / 2015

N196a Nascimento, Marcelo dos Santos
Ácido cítrico em rações para juvenis de pacu/ Marcelo dos Santos Nascimento. Aquidauana, MS: UEMS, 2014.
51f.

Dissertação (Mestrado) – Zootecnia – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Hisano

1. *Piaractus mesopotamicus* 2. Ácidos orgânicos 3. Nutrição 4. Desempenho I. Título

CDD 23.ed. - 639.3



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
PRODUÇÃO ANIMAL NO CERRADO-PANTANAL



MARCELO DOS SANTOS NASCIMENTO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 06/05/2015.

Dr. Hamilton Hisano (EMBRAPA)
Orientador.

Dr. Ricardo Borghesi (EMBRAPA)

Dra. Cristiane Fátima Meldau de Campos Amaral (UEMS)

Dedico aos meus pais Francisco Carlos e Raimunda Nonata pelo amor, educação, fé em Deus, princípios e valores. Tudo que sou, devo a vocês. Aos meus irmãos Kátia Cilene Nascimento, Roberto Nascimento, Sergio Nascimento e Francisco Nascimento (in memorian) e ao meu anjo da guarda Lucinalva Cardoso (in memorian).

Dedico e Ofereço!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por ter me concedido essa dádiva de chegar até aqui, me fornecer forças nos momentos difíceis, não me deixar desistir e me proteger sempre.

Aos meus pais e irmãos que sempre me incentivaram e me apoiaram em todos os sentidos. E a toda minha família que sempre me apoiou.

Ao meu orientador Dr. Hamilton Hisano, pela orientação, paciência, compreensão, confiança depositada e por todo aprendizado. Meu muito obrigado!

À Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul – UEMS e ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso e a Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – SP pelo apoio na realização do experimento.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UEMS, pelos ensinamentos, em especial as professoras Liliam Hayd, Cristiane Meldau e aos pesquisadores, técnicos da Embrapa Meio Ambiente, Júlio Queiroz, Rodrigo, Marcos Losekann, Viviane, Ana Lúcia, Marisa e Gino pelo auxílio.

A secretaria do programa de Pós-graduação em Zootecnia da UEMS, Marlucia Oliveira, pelo apoio, paciência, comprometimento e pelo seu profissionalismo. Meu muito obrigado!

Aos membros da banca de qualificação Liliam Hayd e Cleujosí Nunes e da defesa Ricardo Borghesi e Cristiane Meldau pela colaboração neste trabalho.

Aos meus colegas de estágio da Embrapa Meio Ambiente, Nayara Cyrino, Fabíola Santana, Maria Lidia, Genoefa Dal’Bó, Jessica Parisi, Glenda Mariana, Israel Cardoso, em especial, a Vitoria Gonçalves pela amizade, parceria, ajuda e apoio na pesquisa.

Aos meus colegas e amigos do Pensionato Babosa em Aquidauana – MS, Dona Lurdes, Rosana Moreira, Sr. Antonio, Felipe Neves, Enrique Gabriel, Luana Pimentele, Hugo Alampe, Vanessa Pontes e aos da republica Tchecas em Jaguariúna - SP, Luana Pierman, Iago Aruan, Matheus Girdali os quais tive o prazer de dividir bons momentos.

A amiga Marlene Vaz e a parceira e amiga de mestrado Milena Sanchez pela amizade, dedicação, contribuição e por compartilhar parte de seus conhecimentos e experiências profissionais e de vida.

Aos meus amigos que tive o prazer de conhecer e de cultivar a amizade nesses dois anos de mestrado Eduardo Freitas, Thalles Carvalho, Vanessa Pontes, Nicarcia Monteiro, Luana Pimentel André Fialho e Hanner Karim pela dedicação, amizade e profissionalismo, vocês foram muito importantes nessa caminhada.

Em especial a Professora Margarida Vasconcelos (UFPI), Dra Fabíola Fogaço e Dr Laurindo Rodrigues (Embrapa Meio Norte) pelo incentivo e apoio para seguir no mestrado. Meu muito obrigado!

Finalmente, gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	01
1. Introdução.....	01
2. Objetivo Geral.....	02
2.1. Objetivos Específicos.....	02
3. Revisão de literatura.....	04
4. Produção de pescado mundial e nacional.....	04
5. Espécie estudada.....	05
6. Ácidos orgânicos.....	05
6.1. Ácido cítrico.....	06
6.2. Modo de ação dos ácidos orgânicos no metabolismo.....	08
6.3. Ácidos orgânicos em rações para peixes.....	09
7. Referências.....	10
CAPÍTULOS II (Artigo).....	18
CITRIC ACID AS FEED ADDITIVE IN PACU <i>Piaractus mesopotamicus</i> DIETS.....	19
Abstract.....	20
INTRODUCTION.....	21
MATERIAL AND METHODS.....	22
RESULTS	26
DISCUSSION.....	26
RESUMO	31
REFERENCES.....	32
CAPITULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPITULO II (Artigo).....	18
Tabela 1. Formulation and chemical composition of experimental diets.....	36
Tabela 2. Growth performance of pacu fed diets with increased levels of citric acid after 30, 60 and 90 days of experiment. Mean \pm SD.....	37
Tabela 3. Hydrogenionic potential (pH) of diet, stomach and gut of pacu fed diets with increased levels of citric. Mean \pm SD.....	38
Tabela 4. Haematocrit (Htc), haemoglobin (Hb), mean corpuscular volume (MCHC), hepatosomatic index (HSI) and viscerosomatic index (VSI) of pacu fed diets with increased levels of citric. Mean \pm SD.....	38
Tabela 5. Chemical composition of pacu fed of pacu fed diets with increased levels of citric. Mean \pm SD.....	39
Tabela 6 - Apparent digestibility coefficients (ADC %) of nutrients, energy Ca and P of diets supplemented with citric acid for pacu. Mean \pm SD.....	39

RESUMO

Os ácidos orgânicos são aditivos que podem melhorar a disponibilidade de nutrientes e absorção de minerais das rações, e conseqüentemente, o desempenho de peixes. Desta forma, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar diferentes níveis de ácido cítrico em rações para juvenis de pacu. Para o ensaio de desempenho foram formuladas quatro rações isoproteicas (23% de proteína digestível) e isoenergéticas (3.200 kcal de energia digestível/kg), com quatro níveis de ácido cítrico (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0%). Foram utilizados 160 animais com peso médio de $12,73 \pm 1,10$ g, distribuídos em 16 aquários (300 L) em sistema de recirculação de água, em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições. O período experimental teve duração de 90 dias. Para o ensaio de digestibilidade, as rações foram acrescidas com 0,1% do óxido crômico III (Cr_2O_3). Foram utilizados 96 animais com peso de $80,35 \pm 5,12$ g, distribuídos em oito gaiolas com volume de 80 L alojadas em dois tanques (2.000 L). A alimentação foi fornecida a vontade das 8h00 às 16h30. As fezes foram coletadas em aquários de fundo cônico (200 L). Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) para os parâmetros de desempenho, hematológicos, pH estomacal e intestinal, índices somáticos, composição corporal e na digestibilidade aparente dos nutrientes e minerais das rações. Por outro lado, animais alimentados com 3% de ácido cítrico apresentaram respostas superiores para ganho de peso (7,41%), taxa de crescimento específico (7,35%), taxa de eficiência protéica (4,06%), digestibilidade da matéria seca (4,37%) e disponibilidade do fósforo (10,90%) e cálcio (4,54%), quando comparado ao controle (sem suplementação de ácido cítrico).

Palavras-chaves: *Piaractus mesopotamicus*, ácidos orgânicos, nutrição, desempenho.

ABSTRACT

Organic acids are additives that can improve the availability of nutrients and mineral absorption, increasing fish growth. The aim of this study was to evaluate the effects of diets containing different levels of citric acid in pacu diets. Isoprotein (23% digestible protein) and isoenergetic (3.200 kcal digestible energy/kg) diets with four levels of inclusion of citric acid (0.0, 1.0, 2.0 and 3.0 %) were used for growth performance trial. 160 pacu juveniles (12.73 ± 1.10 g) were distributed in 16 aquaria (300 L) in a experimental design completely randomized totalizing four treatments with four repetitions, during 90 days. Experimental diets were marked with 0.1% chromic oxide to determine the apparent digestibility coefficients. 96 juveniles pacu ($80, 35 \pm 5, 12$ g) were used in this trial and were fed between 8h00 and 16h30. The collection of feces was held in conical bottom aquaria (200 L). No significant differences were observed ($P > 0.05$) for the growth parameters, haematological parameters, pH of the stomach and gut, somatic indices, body composition and digestibility of nutrients and minerals. However, pacu fed diets with 3% citric acid had superior responses for weight gain (7.41%), specific growth ratio (7.35%), protein efficiency ratio (4.06%) and digestibility of dry matter (4.37%) and availability of phosphorus (10.90%) and calcium (4.54%), when compared to control (with no citric acid).

Key words: *Piaractus mesopotamicus*, organic acid, nutrition, performance.

1. CAPITULO I - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma das atividades que mais se desenvolve no Brasil, em função das condições climáticas favoráveis e abundância de recursos hídricos, sendo o ramo da produção animal que mais cresce no cenário mundial (CREPALDI, 2007). Atualmente, representa quase metade de todo o pescado consumido no mundo (FAO, 2014).

O pacu é uma das principais espécies nativas, que se destaca por possuir características zootécnicas importantes para o cultivo, como: hábito alimentar onívoro, carne de excelente qualidade, rusticidade ao manejo, além de se adaptar facilmente a ração e possuir boa aceitação pelo mercado consumidor (ABIMORAD et al., 2009).

A produção de organismos aquáticos, principalmente em sistemas intensivos, exige o uso de rações de alta qualidade, pois a elevada densidade de estocagem e as deficiências ou desbalanceamento dos nutrientes das rações podem acarretar em diminuição da produtividade e do retorno econômico da produção (FURUYA et al., 2001).

O excesso de alimento ou uso de rações desbalanceadas reduzem a absorção de nutrientes pelos peixes, resultando no excesso de matéria orgânica e nutriente nos sistemas de produção, contribuindo com o aumento da concentração de amônia e comprometendo a saúde dos animais (CYRINO et al., 2010).

Uma das alternativas para melhorar a eficiência alimentar e o desempenho desses animais é o uso de aditivos zootécnicos que tenham efeito positivo sobre a produção (SILVA et al., 2008). Os aditivos zootécnicos são substâncias, microorganismos ou produtos formulados, com ou sem valor nutricional, que possuem apenas propriedades de melhorar as características nutricionais dos alimentos destinados a alimentação animal e de melhorar o desempenho dos animais (BRASIL, 2004).

Dentre alguns aditivos zootécnicos destacam-se os ácidos orgânicos, que vêm sendo utilizados como substitutos de quimioterápicos promotores de

crescimento na produção animal. Os ácidos orgânicos são constituintes naturais das plantas e animais, podem ser formados por fermentação microbológica no intestino ou em rotas metabólicas intermediárias (LEHNINGER et al., 1990, SOLOMONS e FRYHLE, 2002). Quando inclusos nas rações proporcionam melhora no crescimento, consumo e sobrevivência dos animais (FLEMMING, 2005; HOSSAIN et al., 2007; LUCKSTADT, 2008), além de exercer efeitos positivos no trato gastrointestinal e no metabolismo animal (FREITAG, 2007).

Entretanto, sua suplementação nas rações induz a redução do pH no estômago, resultando também em menor tempo para se atingir valor ótimo entre 3 e 4 (WALSH et al., 2004). Com a diminuição do pH as moléculas de proteínas podem ser mais hidrolisadas, proporcionando efeito benéfico na digestão dos nutrientes (SCHÖNER, 2001). Outro fator importante é a melhora na digestibilidade dos nutrientes e minerais e conseqüentemente menor excreção de fósforo e nitrogênio para o meio ambiente (BARUAH et al., 2005; BARUAH et al., 2007).

Dentre os ácidos orgânicos utilizados na dieta animal, destaca-se o ácido cítrico, por apresentar resultados bastante satisfatórios na digestibilidade e retenção de nutrientes nas dietas de aves, suínos e peixes (BOILING et al., 2000; SUGIURA et al., 1998; LUCKSTADT, 2008), além de apresentar menor custo em relação a outros ácidos orgânicos (FAGBENRO e FASAKIN, 1996).

Apesar das características positivas apresentadas anteriormente para o ácido cítrico, estudos com espécies tropicais, especialmente as nativas, ainda são escassos. Nesse sentido, a presente pesquisa visa contribuir com informações relevantes sobre o uso do ácido cítrico em rações para pacu.

2. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo, avaliar os efeitos da inclusão do ácido cítrico em rações para juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

2.1. Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da inclusão do ácido cítrico sobre o desempenho zootécnico de juvenis de pacu;

Analisar os efeitos nos parâmetros hematológicos e composição físico-química dos peixes;

Verificar os efeitos do ácido cítrico no pH do estômago e intestino e nos índices hepatossomático (IHS) e víscerosomático (IVS);

Avaliar os efeitos da inclusão do ácido cítrico na digestibilidade aparente dos nutrientes e minerais das rações para juvenis de pacu.

3. REVISÃO DE LITERATURA

4. PRODUÇÃO DE PESCADO MUNDIAL E NACIONAL

De acordo com a FAO (2014), a produção de pescado pela pesca e aquicultura atingiu cerca de 158 milhões de toneladas em 2012, o que representa dez milhões de toneladas a mais que em 2010 (com um valor total de 10 bilhões dólares).

A aquicultura vem crescendo mais que todos os outros setores de produção animal do mundo, atingindo um crescimento anual de 6,2% entre os anos de 2000 a 2012, pulando de 32,4 milhões para 66,6 milhões de toneladas, superando as taxas de crescimento da bovinocultura, avicultura e suinocultura (FAO, 2012; FAO, 2014). Esse desenvolvimento tem sido impulsionado por uma combinação do crescimento populacional, aumento da renda, urbanização e pela facilidade da expansão da produção pelos diversos canais de distribuição (FAO, 2014).

Em 2011, os maiores produtores de pescado foram a China com aproximadamente 63,5 milhões de toneladas, a Indonésia com 11,7 milhões de toneladas, Índia com 9,3 milhões de toneladas e seguindo pelo Japão com cerca de 5,2 milhões de toneladas (MPA, 2013).

No Brasil, a produção da aquicultura continental atingiu cerca de 392,5 mil t em 2013, sendo que a região Centro-Oeste foi à principal produtora, com 105 mil toneladas, seguida pela Região Sul 88 mil t, Nordeste 76,4 mil t, Norte 72,9 mil t e a região Sudeste 50 mil t (IBGE, 2014).

As principais espécies cultivadas foram a tilápia, respondendo por 43,1%, seguida pelo tambaqui 22,6% e pelo grupo tambacu e tambatinga 15,4% (IBGE, 2014). O pacu também está presente entre as principais espécies nativas cultivadas. Segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura, o pacu foi a quinta espécie de peixe mais produzida no Brasil atingindo em 2011 a produção anual de 21.7 toneladas (MPA, 2013).

5. ESPÉCIE ESTUDADA

O Pacu *Piaractus mesopotamicus* é um peixe reofílico, pertence à ordem Characiformes e representante da super ordem Ostariophys (NAKATANI et al., 2001). Possui corpo ovalado e robusto, dorso cinza escuro com escamas pequenas, ventre amarelado e dentes molariformes (URBINATI e GONÇALVES, 2005; BRITSKI et al., 2007;).

O pacu é uma espécie nativa da Bacia da Prata, com maior distribuição nas planícies alagadas da região Centro-Oeste, no Pantanal do Mato Grosso (PETRERE, 1989). De acordo com NAKATANI et al. (2001) os alimentos mais constantes em sua dieta são os frutos e sementes. Além destes, o pacu se alimentam de folhas, caules e flores, quando necessário (SOUZA et al., 2002).

A produção comercial desta espécie se destaca devido ao seu baixo custo, resistência à patógenos, e pela alta adaptabilidade aos mais variados sistemas de cultivo e rações extrusadas e peletizadas (ABIMORAD e CARNEIRO, 2004; JOMORI et al., 2005). Além disso, apresenta ótimo rendimento no processamento com 46,73% de filé sem pele, 16, 57% de cabeça e 88, 98% de rendimento de carcaça (FARIA et al. 2003).

Por ser uma espécie de hábito alimentar onívoro é possível a inclusão de fontes protéicas de origem vegetal, como alternativa para reduzir os custos com a alimentação, principalmente, com alimentos alternativos e convencionais de origem vegetal em substituição à farinha de peixe (BICUDO et al., 2009; FERNANDES et al., 2000).

6. ÁCIDOS ORGÂNICOS

Ácidos orgânicos são substâncias que contém uma ou mais carboxilas em sua molécula, incluindo ácidos graxos e aminoácidos, e são constituintes de células vegetais e animais (MROZ et al., 2000). Alguns são formados pelo processo de fermentação microbiana no trato gastrointestinal, a qual constitui parte importante do suprimento energético dos animais hospedeiros (LANGHOUT, 2005).

Os ácidos orgânicos podem ser encontrados de duas formas: sólida ou líquida, sendo sua forma sólida mais fácil de manusear pela menor volatilização

e corrosão (MROZ, 2005).

Os ácidos orgânicos correspondem à maioria dos acidificantes avaliados por serem considerados ácidos mais fracos, menos corrosivos e potencialmente menos tóxicos que os inorgânicos (HERMES, 2011). Como o ácido acético, ácido benzóico, fórmico, fumárico e cítrico que são rapidamente absorvidos pela mucosa intestinal dos animais (DIBNER e BUTTIN, 2002).

A legislação brasileira (Instrução Normativa nº 13 de 30 de novembro de 2004) define os aditivos destinados à alimentação animal como substância, microrganismo, ou produto formulado, adicionado intencionalmente, que não é utilizada como ingrediente que tenha ou não valor nutritivo, e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal

, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda as necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano (BRASIL, 2004).

Existem varias hipóteses sobre os mecanismos de ação dos ácidos orgânicos, dentre os mais conhecidos são: redução do pH estomacal e da capacidade tamponante da dieta; alteração na microbiota intestinal por meio de controle bactericida ou bacteriostático; redução da taxa de esvaziamento estomacal; aumento da atividade enzimática, maior proteólise e digestibilidade de nutrientes; estimulação das secreções pancreáticas; e menores mudanças morfológicas intestinais (PARTENEN e MROZ, 1999; MROZ, 2005; BRUMANO e GATTÁS, 2009).

6.1. ÁCIDO CÍTRICO

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxiopropano-1, 2,3-tricarboxílico) $C_6H_8O_7$ é um intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e apresenta-se na forma de pequenos cristais brancos (MATTEY, 1992).

A produção mundial em 2007 foi de aproximadamente 1,6 milhões de toneladas, apresentando uma estimativa de crescimento anual de 3,5% a 4% (RYMOWICZ et al.,2008). Comercialmente é produzido pelo processo fermentativo com *Aspergillus niger* e amplamente utilizado na indústria de alimentos e bebidas, química, farmacêutica, entre outras (WANG e LIU, 1996).

Esse ácido pode ser encontrado principalmente nas frutas cítricas, sendo de sabor azedo agradável e muito solúvel em água e é facilmente

assimilável pelo organismo e apresenta pequena toxicidade (PARTANEN e MROZ, 1999; MATTEY, 1992).

Devido a estas características, é amplamente utilizado como conservantes em alimentos, antioxidante para evitar oxidação de óleos e gorduras e possui importante papel no Ciclo de Krebs (DEMAIN, 2000). Sua ação antioxidante, teoricamente acontece ligando-se competitivamente ao oxigênio, interrompendo a etapa de propagação pela destruição ou pela ligação dos radicais livres, inibindo os catalisadores ou estabilizando os hidroperóxidos (OETTERER, 1999).

Como aditivo zootécnico tem apresentado respostas bastante positivas sobre o desempenho dos animais (SUGIURA et al., 1998). De acordo com Partanen e Mroz (1999), dentre os ácidos orgânicos mais usuais, o ácido cítrico é o que possui a segunda melhor resposta sobre a redução do pH das dietas.

6.2. MODO DE AÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS NO METABOLISMO

Os ácidos orgânicos são doadores de prótons (H^+), enquanto que as bases são receptoras (LEHNINGER et al., 1990). Cada ácido possui característica de perder seus prótons, quando em solução aquosa, sendo esta uma das particularidades que diferencia um ácido do outro (LEHNINGER et al., 1990).

Quanto mais forte for um ácido maior será sua tendência de perder prótons H^+ e sua constante química de equilíbrio para as reações de ionização e separação da fração H^+ e OH^- do ácido, na qual é conhecida como constante de ionização ou dissociação e é designada pelo termo pK (LEHNINGER et al., 1990).

O modo de ação dos ácidos orgânicos no trato gastrointestinal envolve dois mecanismos diferentes: reduzem o pH do estômago, através do fornecimento de íons H^+ , e por outro lado inibem o crescimento de bactérias Gram-negativas através da dissociação dos ácidos e a produção de íons para dentro de células bacterianas (LUCKSTADT, 2008).

Os ácidos orgânicos ou seus sais possuem papel multifuncional, podendo aumentar a digestão, absorção e retenção de nutrientes, a redução do pH gástrico é uma das explicações para essa melhora na digestão, o que

resulta em aumento de retenção gástrica e aumento da atividade de enzimas proteolíticas, desta forma, aumentando a digestibilidade proteica e a disponibilidade de minerais das rações (MROZ et al., 2000).

A adição de ácidos orgânicos nas rações proporciona redução do pH no estômago, resultando em menor tempo para atingir valor ótimo de pH (3 a 4), faixa que favorece o desenvolvimento ótimo de microrganismos benéficos (WALSH et al., 2004). Com a redução do pH e o esvaziamento estomacal, a hidrólise de proteínas aumenta a atividade das enzimas proteolíticas e o tempo de retenção gástrica (BRUMANO e GATTÁS, 2009), ou seja, a redução do efeito tamponante. Conforme Mroz et al. (2000) a capacidade tamponante altera o efeito do ácido orgânico no trato gastrintestinal.

Para Partanen e Morz (1999), o aumento da secreção enzimática pelo pâncreas em resposta à acidificação do trato gastrointestinal pode resultar no aumento da digestibilidade das dietas, assim como da digestibilidade dos aminoácidos.

O baixo pH gástrico é essencial para aumentar a digestão de proteínas, pois os produtos finais da digestão pela pepsina estão envolvidos na estimulação da secreção de enzimas pancreáticas e bicarbonato (REECE, 2008). De acordo com o mesmo autor, em respostas a soluções ácidas, ocorre liberação da secretina que além de inibir a secreção gástrica, estimula a secreção de pepsinogênio, favorecendo a digestão protéica.

A redução do pH intestinal aumenta a solubilidade de P e de fitato em alimentos vegetais e aumenta a absorção de P no intestino. E também podem ligar-se ao longo de vários cátions no intestino, podendo atuar como agente quelante (KHAJEPOUR e HOSSEIN, 2012).

6.3. ÁCIDOS ORGÂNICOS EM RAÇÕES PARA PEIXES

As rações para peixes são basicamente confeccionadas por grãos e subprodutos de cereais, tais como: soja, milho, algodão, trigo e girassol, sendo que a maior parte (50-80%) do fósforo contido nestes ingredientes encontra-se na forma de fitato, não sendo aproveitado pelos animais monogástricos (LÖNNERDAL et al., 1989). A quantidade de fósforo excretado pelos animais é alta devido ao fósforo orgânico se apresentar na forma de ácido fítico ou

hexafosfato de inositol nesses cereais (LEYTEM et al., 2004).

O ácido fítico possui elevado poder de quelatação, com alta afinidade pelos cátions polivalentes como cálcio, ferro, zinco, cobre e manganês, interferindo na biodisponibilidade desses minerais (SELLE et al., 2000). Assim, o ácido fítico pode reduzir a eficiência de utilização dos nutrientes e causar aumento da poluição ambiental, devido à excreção excessiva de nutrientes não absorvidos, especialmente N e P (LENIS e JONGBLOED, 1999).

Os minerais, dentre eles o cálcio, possuem solubilidade comprometida nas condições de pH alcalino (BRONNER, 1998). Portanto, sua absorção pode ser estimulada quando se adiciona ácidos orgânicos às dietas, pois estes reduzem o pH do estômago. Outro benefício da redução do pH é o aumento da atividade da fitase microbiana, pois esta enzima possui duas faixas de pH ótimos, 2,5 e 4,5 a 5,7, sendo que o ácido fítico é muito mais solúvel em pH baixo, e, seus efeitos podem combinar-se para aumentar a digestibilidade e retenção de minerais, principalmente do Ca e P (Mroz e Jongbloed, 2000).

De acordo com Vielma et al. (1999), a suplementação de ácido cítrico na ração para a truta arco-íris aumentou a solubilidade e disponibilidade do Ca e P, melhorando assim, a utilização desses minerais. Sugiura et al. (1998) também observaram aumento na disponibilidade aparente de Ca, P, Mg, Mn e Fe para truta arco-íris alimentadas com rações a base de farinha de peixe suplementadas com ácido cítrico. Contudo, segundo Partanen e Mroz (1999), o efeito dos ácidos orgânicos sobre a digestibilidade dos nutrientes depende do tipo e quantidade de ácido utilizado.

Segundo Baruah et al., 2005, estudando a interação do nível de proteína, fitase e inclusão de ácido cítrico sobre a mineralização óssea de juvenis *Labeo rohita*, observou que a adição de 3% do ácido cítrico na ração com 25 e 35% de proteína bruta resultou numa diminuição significativa do pH do alimento para os animais e conseqüentemente o pH estomacal. Além disso, o teor de cinzas ósseas significativamente aumentou, sugerindo melhor biodisponibilidade de minerais.

Baruah et al. (2007) obtiveram aumento significativo na digestibilidade do fósforo para *Labeo rohita* em rações suplementadas com ácido cítrico. Apesar da melhora observada na disponibilidade de nutrientes das rações suplementadas com ácidos orgânicos, resultados contraditórios têm sido

apontados sobre os efeitos de promoção do crescimento desses ácidos quando incluso na ração de peixes, que parecem depender das espécies estudadas ou tipo de ácido orgânico testado (LUCKSTADT, 2008).

Estudos com os ácidos orgânicos também apresentam melhoras no desempenho desses animais, em decorrência do aumento da disponibilidade de nutrientes e absorção de minerais das dietas (BARUAH et al., 2007; HOSSAIN et al., 2007; SARKER et al., 2007; LUCKSTADT, 2008).

Dentre alguns estudos estão os realizados por Khajepour e Seyed (2012) no qual onde observaram aumento no ganho de peso, taxa de crescimento específico, taxa de eficiência protéica, e menor conversão alimentar para juvenis de estuário alimentados com rações suplementadas com ácido cítrico. Já Sarker et al. (2005) relatam que a suplementação de 3% de ácido cítrico aumenta significativamente o ganho de peso e taxa de crescimento específico do *Pagellus bogaraveo*. Por outro lado Pandey e Satoh (2008) observaram melhoras na conversão alimentar com a suplementação de 1% do ácido cítrico na dieta para a mesma espécie.

7. REFERÊNCIAS

ABIMORAD, E. G.; FAVERO, G. C.; CASTELLANI, D.; GARCIA, F.; CARNEIRO, D. J. Dietary supplementation of lysine and/or methionine on performance, nitrogen retention and excretion in pacu *Piaractus mesopotamicus* reared in cages. **Aquaculture**, v. 295, p. 266-270, 2009.

ABIMORAD, E.G. e D.J. CARNEIRO. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração protéica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33,n.5, p.1101-1109, 2004.

BARUAH K.; PAL AK.; SAHU NP.; JAIN KK.; MUKHERJEE SC.; DEBNATH D. Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. **Aquaculture Research**, v. 36, p. 803-812, 2005.

BARUAH K., SAHU N.P.; PAL A.K.; JAIN K.K.; DEBNATH D.; MUKHERJEE

S.C. Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. **Aquaculture Research**, v. 38, p, 109-1.20, 2007.

BICUDO A. J. A.; SADO, R.Y.; CYRINO J. E. P.; Growth and haematology of *pacu*, *Piaractus mesopotamicus*, fed diets with varying protein to energy ratio. **Aquaculture Research**, v.40, p.486-495, 2009.

BOILING, S.D., WEBEL D.M.; MAVROMICHALIS, I.; PARSONS, C.M.; BAKER, D.H.. The effects of citric acid on phytate-phosphorus utilization in young chicks and pigs. **Journal of Animal Science**, v.78, n.3, p. 682-689, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretária de Apoio Rural e Cooperativismo. Instrução Normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004. Sistema de Legislação Agrícola Federal. Brasília: MAPA, 2004. Disponível<h:ttp://sistemaweb.agricultura.gov.br/sisleis/action/detalhaato...do?=visualizarAtoPortalMapa&chave=133040692> Acessado em: 08 de Janeiro de 2014.

BRITSKI, B.H.; SILIMONK. A; LOPES, Z. S. **Peixes do Pantanal. (Manual de identificação)**. Brasília: Embrapa - SPI, Corumbá: Embrapa - CPAP, 2007. p.184.

BRONNER, F. Calcium absorption - a paradigm for mineral absorption. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.128, p. 917-920, 1998.

BRUMANO, G.; GATTÁS, G. Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento em rações de aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.6, n.2, p.856-875, 2009.

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

CREPALDI. A situação da aqüicultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.30, p.81-85, 2007.

DEMAIN, A. L. Microbial technology. **Trends in Biotechnology**. V. 18.n. 1, 26-3, 2000.

DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, p. 453 - 463, 2002.

FAGBENRO, O. A.; FASAKIN E. A Citric acid ensiled poultry viscera as protein supplement for catfish (*Clarias gariepinus*). **Bioresource Technology**. v.58, n.1, p.13-16, 1996.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*, Roma, p. 251, 2012.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014 (SOFIA)**. Disponível em <<http://www.fao.org/3/a-i3720e/index.html>> Acesso em 02 de fev. 2014.

FARIA, R. H. S. A.; SOUZA, M. L. R.; WAGNER, P. M.; POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P. Rendimento do processamento da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757 e do pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 25, n. 1, p. 21-24, 2003.

FERNANDES, J. B. K.; CARNEIRO, D. J.; SAKAMURA, N. K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 29, n.3, 246-253, 2000.

FLEMMING, J. S. Utilização de levedura, probióticos e mananoligossacarídeos (MOS) na alimento de frangos de corte. 2005. P. 109. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

FREITAG, M. Organic acids and salts promote performance and health in animal husbandry. In: Luckstadt C, editor. *Acidifiers in Animal Nutrition. A Guide for Feed Preservation and Perspectives in Agriculture*, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources Acidification to Promote Animal Performance. 1ed.: Nottingham University Press, Nottingham, UK; p.1-11, 2007.

FURUYA, W.M.; GONÇALVES, G.S.; FURUYA, V.R.B. Fitase na alimentação da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Desempenho e digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.924-929, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, RJ. v. 28, n.12, p. 1-88, 2014.

HERMES, R. G. Uso de extratos de plantas e acidificantes para suínos, o que diz a ciência e a prática atual?. 2011. Disponível em: < <http://pt.engormix.com/MA-suinocultura/nutricao/141-p0.htm> > Acessado em: 19 de abr de 2014.

HOSSAIN, M.A.; PANDEY, A.; SATOH, S. Effects of organic acids on growth and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries Science**, v. 73, n.6, p.1309- 1317, 2007.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MARTINS, M. I. E. G.; PORTELLA, M. C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, v. 243, n. 1-4, p. 175-183, 2005.

JONGBLOED, A. W.; JONGBLOED, R. The Effect of Organic Acids in Diets for Growing Pigs on Enhancement of Microbial Phytase Efficacy. ID-DLO Report no.96009. Lelystad, The Netherlands: Insitute for Animal Science and Health. 1996.

KHAJEPOUR, F.; HOSSEIN,S. A. Calcium and phosphorus status in juvenile Beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets. **Aquaculture Research**, v.43, v.3, p. 407-411, 2012.

LANGHOUT, P. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: a visão da indústria e recentes avanços. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005. Santos, Brasil. *Anais...* Santos, 2005. p. 21-33.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. - **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo, Editora Sarvier, 1990.

LENIS, N. P.; JONGBLOED, A. W. New technologies in low pollution swine diets: Diet manipulation and use of synthetic amino acids, phytase and phase feeding for reduction of nitrogen and phosphorus excretion and ammonia emission-Review. *Asian-Aust. Journal Animal Science*. v.12, p.305-327, 1999.

LEYTEM, A.B.; TURNER, B.L.; THACKER, P.A. Phosphorus composition of manure from swine fed low-phytate grains: evidence from Hydrolysis in the animal. *Journal Environmental Quality*, v. 33, n.3, p.2380-2383,nov. 2004.

LÖNNERDAL, B. et al. Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *Journal of Nutrition.*, USA, v. 119, n. 2, p. 211-214, 1989.

LÜCKSTÄDT, C. The use of acidifiers in fish nutrition. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. *Nutrition and Natural Resources*. v.44 n.3, p.1-8, 2008.

MATTEY, M. The production of organic acids. *Reviews and Biotechnology*. v.12, n.4, p.87-172, 1992.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA - MPA. *Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura*, Brasil, 2009-2010, p.101. 2013.

MROZ, Z. **Acidifiers fytases and their interections in feeding of pigs and poultry. Thecnical meeting on additives and new feed technologies. Effects of their interections and specifictions of use.** Madrid, p.1-51. 2002.

MROZ, Z. Organic acids as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs. *Advances in Pork Production*, v.16, p.169-182, 2005.

MROZ, Z.; JONGBLOED, A. W.; PARTANEN, K. H.; VREMAN, K.; KEMME, P. A.; KOGUT, J. The effects of calcium benzoate in diets with or without organic acids on dietary buffering capacity, apparent digestibility, retention of nutrients, and manure characteristics in swine. *Journal of Animal Science*, v.78,n.10, p.22-32, 2000.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.,

SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. EDUEM, Maringá, 2001, 378p.

OETTERER, M. Produtos fermentados de pescado. In: OGAWA, M; MAIA, E. L. Manual de pesca. Ciência e Tecnologia do Pescado. São Paulo: Varela. v.1, p. 353-359,1999.

PARTANEN, K. H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**, v. 12, p. 117-145, 1999.

PETRERE Jr, M. River fisheries in Brazil: a review. **Regulated Rivers: Research and management**, v.4, p.1-16, 1989.

RADCLIFFE, J. S.; ZHANG, Z.; KORNEGAY, E. T. The effects of microbial phytase, citric acid, and their interaction in a corn-soybean meal-based diet for weanling pigs. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 7, p. 1880-1886, 1998.

REECE, W. O. **Anatomia funcional e fisiologia dos animais domésticos**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2008.

RYMOWICZ, W.; RYWIŃSKA, A.; GLADKOWSKI, W. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. **Chemical Papers**, v. 62, n. 3, p. 239–246, 2008.

SARKER, M.S.A., SATOH, S., KIRON, V. Supplementation of citric acid and amino acid-chelated trace element to develop environment- friendly feed for red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture**. V. 248, p. 3-11. 2005.

SCHÖNER, F.J. Nutritional effects of organic acids. In: BRUFAU, J. (Ed). **Feed manufacturing in the Mediterranean region**. Improving safety: From feed to food. Conference of Feed. Manufacturers of the Mediterranean, 2000/03/22-24, Reus (Spain). Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, p.55-6, 2001.

SELLE, P.H.; RAVINDRAN, R.A.; CALDWELL, R.A.; BRYDEN, W.L. Phytate and phytase: consequences for protein utilization. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, n.2, p. 255-248, 2000.

SILVA, R. F.; LANNA, E. A. T, BOMFIM, M. A. D.; RIBEIRO, F. B.; JÚNIOR, F. I. A; NAVARRO, R. D. Uso de ácidos orgânicos em dietas para Tilápia do Nilo. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p. 352-355, 2008.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

SOUZA, V.L., URBINATI. E. C.; GONÇALVES. D. C.; SILVA. P. C. S.; Composição corporal e índices biométricos do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, 1887 (*Osteichthyes, Characidae*) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p.533-540, 2002.

SUGIURA, S.H.; DONG, F. M.; HARDY, R.W. Effects of dietary supplements on the availability of minerals in fish meal; preliminary observations. **Aquaculture**, v.160, p.283-303, 1998.

TURNER, B.L.; PAPHÁZY, M.J.; HAYGARTH, P.M.; MCKELVIE I.D. **Inositol phosphate in the environment**. Philosophical Transactions of the Royal Society B. The Royal Society. p. 449-469, 2002.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D. Pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Editora UFSM, Santa Maria, RS. 2005.

WALSH, M. C.; PEDDIREDI, L.; RADICLIFFE, J. S. Acidification of nursery diets sand the rofe of diet buffering capacity. Columbus: The Ohio State University, 2004. p. 25-36.

WANG, J.; LIU, P. Comparison pf citric acid production by *Aspergillus niger* immobilized in gels and cryogels of polyacrylamide. **Journal of Industrial Microbiology**, v.16, n. 6, 351-353, jun.1996.

CAPÍTULO II

Artigo elaborado de acordo com as normas da
Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências (AABC).

Projeto aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animais – CEUA
(Embrapa Meio Ambiente): Protocolo nº 003/2014

1 **Citric acid as feed additive in pacu *Piaractus mesopotamicus* diets**

2
3
4 **MARCELO dos S. NASCIMENTO¹, MILENA dos S. S. SANCHEZ¹ and**
5 **HAMILTON HISANO^{2*}**
6

7
8 ¹ Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste, Rua da Faculdade, 645,
9 Jardim Santa Maria, 85903-000, C.P. 320, Toledo, PR

10 ² Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340, Km 127,5, 13820-000, C.P. 69,
11 Jaguariúna, SP
12
13

14
15
16 Key words: digestibility, growth performance, nutrition, organic acid
17

18
19
20 Abbreviated title: Citric acid in pacu diets
21

22
23 Section: Agrarian Sciences
24

25
26
27
28
29
30
31
32
33
34 Correspondence to: Hamilton Hisano, Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340,
35 Km 127,5, 13820-000, Jaguariúna, SP, +55 (19) 3311-2700 Fax: +55 (67) 3311-2640, E-
36 mail: hamilton.hisano@embrapa.br

37

ABSTRACT

38 The objective of this study was to evaluate graded levels of citric acid (0.0, 1.0, 2.0 and
39 3.0%) in pacu diets. In the first trial, it was evaluated growth performance, hematological
40 parameters, pH of the stomach and gut, somatic indices and body composition of pacu
41 juveniles. Fish (n= 160, 12.0±1.25 g) were distributed in 16 aquaria (300 L), in an
42 experimental design completely randomized with four treatments with four repetitions.
43 After growth trial, apparent digestibility coefficients were evaluated with experimental
44 diets added with 0.1% chromium oxide III as inert marker. Fish (n=96, 80.35±5.12g) were
45 used. No significant differences were observed ($P>0.05$) for the growth parameters,
46 haematological parameters, pH of the stomach and gut, somatic indices, body composition
47 and digestibility of nutrients and minerals. However, pacu fed diets with 3% citric acid had
48 superior responses for weight gain (7.41%), specific growth ratio (7.35%), protein
49 efficiency ratio (4.06%) and digestibility of dry matter (4.37%) and availability of
50 phosphorus (10.90%) and calcium (4.54%), when compared to control (with no citric acid).

51 **Key words:** digestibility, growth performance, nutrition, organic acid

52

53

54

INTRODUCTION

55

56

57

58

Excessive use of antibiotics as growth promoters in aquaculture can result in resistance of some bacterial pathogens, besides increasing the risk of disease outbreaks and cross-resistance of bacteria to animals and humans, which has led a number of countries to ban the use of these compounds in fish diets (Hernandez-Serrano 2005, Ng et al. 2009).

59

60

61

62

63

Organic acids can be considered as alternative for replacing antibiotics which may improve growth, feed conversion, nutrient digestibility and disease resistance of fish (Hossain et al. 2007, Sarker et al. 2007). In addition, they have positive effects on the gastrointestinal tract and metabolism of the animal and may reduce pathogenic bacteria and increase the activity of pepsin (Freitag 2007).

64

65

66

67

Recent studies have shown that organic acids supplementation in diets for marine and freshwater fish can increase the bioavailability of phosphorus in plant-protein based diets, making it possible to reduce the use of fish meal and additional phosphates (Sarker et al. 2007, Pandey and Satoh 2008, Khajepour and Seyed 2012).

68

69

70

71

Among organic acids, citric acid stands out as feed additive because has nice flavor and easily assimilated by the animal organism and it is widely used in poultry and pig diets showing good results on performance and intestinal health (Mattey 1992, Sugiura et al. 1998, Partanen and Mroz 1999, Boiling et al. 2000).

72

73

74

75

However, few researches were conducted evaluating the beneficial effects of citric acid in fish and shrimp diets (Zhu et al. 2014). Among some studies, those performed by Khajepour and Seyed (2012) found improved growth and nutrient utilization in beluga sturgeon, *Huso huso*, fed plant-protein based diet supplemented with citric acid.

76

77

78

Furthermore, Sugiura et al. (1998) observed improvements in the apparent availability of Ca, P, Mg, Mn, Fe for rainbow trout fed fish meal-based diets supplemented with citric acid and Baruah et al. (2007) detected a significant increase in phosphorus

79 digestibility in Indian major carp *Labeo rohita*.

80 Considering the beneficial effects of the inclusion of some organic acids in fish
81 diets, this study aimed to evaluate the effects of graded levels of dietary citric acid on
82 growth performance, haematology and apparent digestibility coefficients of diets for
83 juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus*

84

85 MATERIAL AND METHODS

86 The experiment was conducted at Laboratório de Ecossistemas Aquáticos -
87 Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP and was in accordance with the Ethical Principles
88 in Animal Research and approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation
89 at the Embrapa Meio Ambiente (Protocol number: 003/2014).

90 The experimental diets were formulated to be isonitrogenous and isocaloric with
91 23% of digestible protein (DP) and 3,200 kcal of digestible energy (DE) kg⁻¹ (Table 1).
92 Dietary ingredients were ground in a laboratory mill to achieve 0.5 mm and after were
93 mixed, moistened (20% of water) and processed in a meat grinder (2.5 mm). Anhydrous
94 citric acid (Synth) was included at 0.0; 1.0; 2.0 and 3.0%, totalizing four treatments and
95 four repetitions. Diets were dried in an air forced ventilation oven at 55°C for 24 hours and
96 then stored at -18°C.

97 To growth performance assay, 160 juvenile pacu with average weight of 12.73 ±
98 1.10g were randomly distributed in 16 aquaria with 300 L capacity, in recirculation water
99 system with physical and biological filter with controlled temperature and supplementary
100 aeration. Fish were fed *ad libitum* at 08:00, 11:00, 13h and 16:30, during 90 days.

101 Growth and nutrient retention parameters were calculated as follows: weight gain
102 (WG) = (final body weight(g) - initial body weight(g)); feed conversion ratio (FCR) = feed
103 intake(g)/weight gain(g); specific growth rate (SGR, % day⁻¹) = 100 × (ln final weight(g) -

104 In initial weight(g)/days of the trial); protein efficiency ratio (PER) = weight
105 gain(g)/protein intake(g); nitrogen retention (NR) = [(final N of fillet - initial N of
106 fillet)/total N intake) x100].

107 Dissolved oxygen (6.40 ± 0.78 mg L⁻¹), temperature (25.26 ± 0.47 °C) and pH
108 (7.34 ± 0.30) were measured daily using a multiparameter (U 50, Horiba). Total ammonia
109 (0.02 ± 0.01 mg L⁻¹) was measured weekly by commercial kit (Hach). Cleaning
110 management was periodically realized by siphoning and renewing 20% of the total volume
111 of the system. The values of water quality parameters found in this study were considered
112 adequate for the species (Urbinati and Gonçalves 2005).

113 At the end of the growth trial, after 24 hours fasting, fish were anesthetized with
114 benzocaine (100 mg L⁻¹) to weighing and blood collection. The blood samples were
115 collected by caudal puncture using a syringe containing EDTA (3%) of 8 fish treatment⁻¹.
116 The percentage of haematocrit was determined by the microhaematocrit and samples were
117 processed in a microhaematocrit-centrifugal (NI 1807, Nova Instruments) for 5 min and
118 10,000 rpm. Haemoglobin was determined using the cyanomethaemoglobin kit (Labtest
119 Diagnostica). Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration (MCMC) was also
120 calculated.

121 After blood collection, muscle, liver, intestine and viscera of 8 fish treatment⁻¹ were
122 separated. Liver and viscera were weighed to determine the hepatosomatic index (HSI) and
123 viscerosomatic index (VSI), respectively. For pH analysis of the stomach and intestine, 0.5
124 g of each organ were homogenized with 4.5 mL distilled water in disperser homogenizer (
125 T10, Ika) for 5 minutes and after 30 minutes the pH was measured using digital pH meter
126 (Delta 320, Mettler-Toledo) according to methodology proposed by Chang et al. (2006).

127 Analysis of dry matter, crude protein, ether extract, ash, calcium and phosphorus of
128 diets and dry matter, crude protein, ether extract and ash of muscle (initial and final) were

129 performed according to Official Methods of Analysis (AOAC, 2000). To determination of
130 pH of the diets 10 g of each experimental diet were mixed with 30 mL of distilled water
131 and homogenized for 5 minutes. After 30 minutes, pH was measured with digital pH meter
132 (Delta 320, Mettler-Toledo).

133 After growth trial, remained fish were used to evaluation of the digestibility of
134 experimental diets. Prior to feces collection, fish were acclimated at experimental
135 conditions and diets with four levels of acid citric (0.0, 1.0, 2.0 and 3.0%) plus 0.1% of
136 chromium oxide III (Cr_2O_3), during 5 days. The same process of manufacture of
137 experimental diets of growth trial was adopted. Animals ($n=96$) with 80.35 ± 5.12 g were
138 distributed in 8 cages with 80 L and placed in two 2,000 L-fiberglass tanks (4 cages tank⁻¹)
139 with recirculation system and controlled temperature. The apparent digestibility
140 coefficients (ADC) of dry matter (DM), crude protein (CP), ether extract (EE), calcium
141 (Ca) and phosphorus (P) were determinated.

142 Feces collections were performed in conical bottom tanks with 200 L by
143 sedimentation. Fish were divided into two group of collection allocated in 4 cages, where
144 the feces of each group were collected on alternate days. Animals were kept during the day
145 in cages placed in 2,000 L-fiberglass tanks with controlled temperature and supplementary
146 aeration and fed experimental diets *ad libitum* from 8h to 16:30.

147 After last feeding fish were transferred conical bottom tanks, where they remained
148 until the next morning. Collected feces were centrifuged and dried in an air forced
149 circulation oven at 55°C for 24 hours. Dry matter, crude protein, ether extract, ash, calcium
150 and phosphorus and chromium oxide was analyzed according to the methodology
151 described by Silva (2005) and Official Methods of Analysis (AOAC, 2000).

152 The apparent digestibility coefficients of the experimental diets were calculated
153 according to equation proposed by Cho et al. (1985).

154

$$155 \quad \text{ADC} \quad (\%) = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\% \text{ Id}}{\% \text{ If}} \times \frac{\% \text{ Nf}}{\% \text{ Nd}} \right) \right]$$

156 ADC = apparent digestibility coefficient;

157 Id = indicator of diet;

158 If = indicator of feces;

159 Nd = nutrient of diet;

160 Nf = nutrient of feces.

161

162 Data were analyzed as a completely randomized design and submitted to one-way
 163 analysis of variance (ANOVA) to determine if differences occurred among treatments.
 164 When significant effect was observed polynomial regression or Tukey's test were applied.
 165 All statistical analyses were performed by the software SAS (SAS, 2001).

166

167

RESULTS

168 Growth performance parameters of pacu juveniles, after 30, 60 and 90 days (Table
 169 2) were not significantly different. However, a trend to improvement weight gain, specific
 170 growth rate and protein efficiency ratio was observed for the animals fed diets
 171 supplemented with 3.0% of citric acid, compared to control at 90 days.

172 The mean pH values of the stomach and intestine of fish fed diets supplemented
 173 with citric acid showed no significant differences. However, differences ($P < 0.05$) were
 174 observed for the pH of the experimental diets (Table 3). Increased levels of citric acid
 175 decreased pH values of diets.

176 Hepatosomatic and viscerosomatic indexes and values of hematocrit, hemoglobin,
 177 mean corpuscular hemoglobin concentration (Table 4) and body composition (Table 5) of
 178 pacu juveniles showed no significant differences.

179 Apparent digestibility coefficients of diets supplemented with different levels of
 180 citric acid, 0.0, 1.0, 2.0 and 3.0% (Table 6) were not significantly different. However, diets

181 supplemented with 3.0% citric acid showed improvement in the digestibility of phosphorus
182 calcium and dry matter, compared to the control diet.

183

184

DISCUSSION

185 Even growth performance parameters showed no differences ($P>0.05$), animals fed
186 diets containing 3.0% of citric acid showed improvements, when compared to control diet
187 of 7.41% for weight gain, 7.35% for specific growth rate and 4.06% for protein efficiency
188 ratio, after 90 days,

189 These results corroborate those observed by Ng et al. (2009), who detected no
190 difference ($P>0.05$) for growth performance parameters for red hybrid tilapia fed diets with
191 potassium diformate and a mixture of organic acids, however they registered 11.0% and
192 11.3% of improvement for weight gain in animals fed diets with the inclusion of 1.0 and
193 2.0% potassium diformate and a mixture of organic acids in the diets, respectively.

194 Gislason et al. (1994) did not observe significant enhancements for growth
195 performance in Atlantic salmon *Salmo salar* fed diets supplemented with 1.0% sodium
196 lactate. Similar results were reported by Vielma et al. (1999) for rainbow trout
197 *Oncorhynchus mykiss* fed diets containing 0.0, 4.0, 8.0 and 16.0 % of citric acid and by
198 Zhu et al. (2014) evaluating the performance of the yellow catfish *Pelteobagrus fuluidraco*
199 supplied with diets with a combination of phytase and organic acids.

200 Nevertheless, Sarker et al. (2007) evaluated the inclusion of citric acid on growth
201 parameters and retention of nutrients for red seabream *Pagrus major*, and detected
202 significant improvements on the growth of animals fed plant protein-based diets
203 supplemented with 1.0% citric acid. Khajepour and Seyed (2012) examined the
204 supplementation of citric acid in beluga sturgeon juveniles and observed an increase in
205 weight gain, specific growth rate, protein efficiency ratio, besides a lower feed conversion.

206 Sarker et al. (2005) observed that supplementation of 3.0% citric acid significantly
207 increased weight gain and specific growth rate in red sea bream. Similar results were
208 presented by Pandey and Satoh (2008) for rainbow trout fed diets supplemented with 1.0%
209 citric acid.

210 Stomach and intestine pH of fish fed diets with citric acid did not differ ($P>0,05$),
211 however animals fed diets with 2.0% of acid citric showed a decrease of 0.44 in pH of the
212 stomach and a maximal reduction of 0.34 in pH unit of the intestine compared with the
213 control diet (Table 3).

214 The results of present study confirm those found by Ng et al. (2009), who observed
215 reduction of pH of the acidified diets; however, no significant differences were related for
216 the growth performance parameter of red hybrid tilapia fed diets supplemented with
217 potassium diformate and a mixture of organic acids.

218 According to Walsh et al. (2004), the addition of organic acids in the diets implies
219 less time for the stomach to achieve an optimal value of pH (3-4), a range that promotes
220 optimal development of beneficial microorganisms that assist the digestion of feed and
221 increased enzyme secretion in response to acidification of the gastrointestinal tract,
222 resulting in increased availability of nutrients of the diets and can explain the improvement
223 of growth performance parameters of fish fed acidified diets in this study.

224 According to Svobodová et al. (1999) and Hassaan et al. (2014) hematology is
225 important technique that can help assess the effects of diet and physical conditions of the
226 animals and the effects of some additives used in animal feed, as well as in the diagnosis of
227 diseases.

228 The results obtained in the present study for hematocrit, hemoglobin, mean
229 corpuscular volume were similar to those reported for pacu (Tavares-Dias et al. 1999,
230 Tavares-Dias and Mataqueiro, 2003). All results showed that blood parameters evaluated

231 are within the normal range for the juvenile pacu and were similar with data reported by
232 Ng et al. (2009) to hematocrit for red hybrid tilapia fed diets containing potassium
233 diformate and a mixture of organic acids.

234 On the other hand, Khajepour et al. (2011) verified that supplementation of 3.0%
235 citric acid in the feed for beluga juveniles significantly increased ($P < 0.05$) the values of
236 hemoglobin and hematocrit. The authors associated this effect with the availability of Ca,
237 P, Fe and Cu from the phytic acid complex due to the inclusion of citric acid in the feed.

238 According to Jobling (2001), changes of energy reserves in fish can be determined
239 through hepatosomatic (HSI) and viscerosomatic (VSI) indices, which may indicate the
240 energy balance in fish, because the energy reserves in fish are stored in liver and muscles,
241 especially around the viscera in the form of glycogen and fat (Jobling 2001). In the present
242 study, these indices showed no difference ($P > 0.05$), possibly because diets are
243 isonitrogenous and isocaloric. Also, Ng et al. (2009) observed similar results to the present
244 study for somatic indices for red hybrid tilapia fed diets with organic acids.

245 The results observed for body composition of pacu juveniles (Table 5) showed no
246 significant differences. These results corroborate those obtained by Khajepour and Seyed
247 (2012), who found no differences ($P > 0.05$) in body composition of beluga sturgeon for
248 moisture and protein. Moreover, Zhu et al. (2014) reported that the inclusion of up to 4.0 %
249 organic acid in the diet of yellow catfish does not affect ($P < 0.05$) body composition of the
250 animals.

251 The mean values of apparent digestibility coefficient (ADC %) of diets
252 supplemented with different levels of citric acid (Table 6) were not significantly different.
253 However, juveniles fed diet with 3.0% of citric acid showed improvement of phosphorus
254 (10.9%) calcium (4.54%) and dry matter (4.37%) digestibility, when compared to the
255 control diet.

256 These results confirm those obtained by Zhu et al. (2014) who did not observe
257 difference for ADC for yellow catfish, but registered improvements in the ADC of
258 phosphorus at 20.32% with inclusion of 2.0 % organic acid in the diet.

259 In addition, Baruah et al. (2007) reported a significant increase in phosphorus
260 digestibility at 14.5% due to the inclusion of 3.0 % citric acid in the diet for Indian major
261 carp. Sugiura et al. (1998) also observed an increased apparent availability of Ca, P, Mg,
262 Fe and Mn in fish meal-based diets fed to rainbow trout supplemented with citric acid.

263 According to Mroz et al. (2000) solubility of minerals due to the acidification of
264 diets favors the bioavailability. Sugiura et al. (1998) and Sarker et al. (2005) argued that
265 organic acids can solubilize mineral salts present in fish meal and reduce the antagonistic
266 interaction between Ca and P in the intestinal brush border. Vielma and Lall (1997) also
267 observed that supplementation with formic acid enhances the apparent absorption of
268 phosphorus in a fish meal-based diet for rainbow trout.

269 The trend in increasing ADC of P and Ca of experimental diets with 3.0% inclusion
270 of citric acid in this study can be explained by affirmations above. Also, reduction of the
271 pH of the diet and consequently to a decrease in stomach pH (Table 3) and based that
272 acidification can improve solubility of some minerals.

273 On the other hand, Hassaan et al. (2014) investigated the digestibility of diets
274 supplemented with calcium lactate and calcium propionate for Nile tilapia, and also
275 detected no significant difference in ADC of dry matter, reporting significant differences
276 only for ADC of crude protein for the inclusion of 0.5% of calcium propionate, 1.0 and
277 1.5% of calcium lactate, while the inclusion of 1.0% showed the highest ADC for EE,
278 energy and minerals Ca, P, K and Na.

279 Although citric acid supplementation in pacu juveniles diets did not differ
280 statistically for majority of parameters evaluated, the results of the present study showed

281 improvements on growth performance and apparent digestibility of dry matter and
282 availability of Ca e P of animals fed acidified diets, particularly with 3% of citric acid,
283 compared to the control (with no inclusion of citric acid). The use of citric acid as feed
284 additive can enhance growth performance and reduce the phosphorus excretion contribute
285 to promoting balanced environmentally friendly aquafeeds for pacu juveniles.

286

287

RESUMO

288 O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da inclusão do ácido cítrico (0,0; 1,0; 2,0 e
289 3,0%) em rações para juvenis de pacu. No primeiro ensaio foram avaliados o desempenho
290 produtivo, parâmetros sanguíneos, pH estomacal e intestinal e índices somáticos. Foram
291 utilizados 160 animais ($12,00 \pm 1,25$ g), distribuídos em 16 aquários (300 L) em
292 delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro
293 repetições. Para o ensaio de digestibilidade, as rações experimentais foram acrescidas com
294 0,1% de óxido de cromo, sendo utilizados 96 animais ($80,35 \pm 5,12$ g). Não foram
295 observadas diferenças ($P > 0,05$) para os parâmetros de desempenho, hematológicos, pH
296 estomacal e intestinal, índices somáticos, composição corporal e na digestibilidade
297 aparente dos nutrientes e minerais das rações. Por outro lado, animais alimentados com 3%
298 de ácido cítrico apresentaram respostas superiores para ganho de peso (7,41%), taxa de
299 crescimento específico (7,35%), taxa de eficiência protéica (4,06%), digestibilidade da
300 matéria seca (4,37%) e disponibilidade do fósforo (10,90%) e cálcio (4,54%), quando
301 comparado ao controle (sem suplementação de ácido cítrico).

302 **Palavras chaves:** ácidos orgânicos, nutrição, digestibilidade, desempenho.

303

304

305

306

ACKNOWLEDGMENTS

307

To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil)

308

for scholarship to Marcelo S. Nascimento e Milena S. S. Sanchez.

309

310

311

312

REFERENCES

- 313
- 314 AOAC.2000. Official methods of analysis, 17 ed., Washington, DC: Association of
315 Official Analytical Chemists 937 p.
- 316 BARUAH K, SAHU NP, PAL AK, JAIN KK, DEBNATH D, SONA Y AND
317 MUKHERJEE SC. 2007. Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude
318 protein level on mineral utilization by rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), Juveniles. J World
319 Aquac Soc 38: 238–249.
- 320 BOILING SD, WEBEL I, MAVROMICHALIS CM AND PARSONS D.H. 2000. The
321 effects of citric acid on phytate-phosphorus utilization in young chicks and pigs. J Anim
322 Sci 78: 682-689.
- 323 CHANG MJ, SOEL SM, BANG MH, PARK JHM, KANG NE AND KIM WK. 2006.
324 Interactions of high amylose starch and deoxycholic acid on gut functions in rats.
325 Nutrition. 22: 152-159.
- 326 CHO CY, COWEY C. B AND WATANABE T. 1985. Finfish nutrition in Asia:
327 methodological approaches to research and development. Ottawa: IDRC, 154 p.
- 328 FREITAG M. 2007. Organic acids and salts promote performance and health in animal
329 husbandry. In: Luckstadt C, editor. Acidifiers in Animal Nutrition - A Guide for Feed
330 Preservation and Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural
331 Resources Acidification to Promote Animal Performance. 1st ed: Nottingham University
332 Press, Nottingham, UK; p.1–11.
- 333 GISLASON G, OLSEN RE AND RINGO E. 1994. Lack of growth stimulating effect of
334 lactate on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquacult Fish Manage 25: 861-862.
- 335 HASSAAN MS, WAFA M A, SOLTAN MA, GODA AS AND MOGHETH MA. 2014.
336 Effect of Dietary Organic Salts on Growth, Nutrient Digestibility, Mineral Absorption and
337 Some Biochemical Indices of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Fingerlings. World

- 338 Appl Sci J 29(1): 47-55.
- 339 HERNANDEZ-SERRANO P. 2005 Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO
340 Fisheries Technical Paper 469. Food and Agriculture Organization of the United Nations,
341 Rome, 97p.
- 342 HOSSAIN MA, PANDEY A AND SATOH S. 2007. Effects of organic acids on growth
343 and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. Fish Sci 73: 1309–1317.
- 344 JOBLING M. 2001. Nutrient partitioning and the influence of feed composition on body
345 composition. In: HOULIHAN, D.; BOUJARD, T.; JOBLING, M. (Ed.). Food intake in
346 fish. Oxford: Blackwell Science, p.354-375.
- 347 KHAJEPOUR F, SEYED HA AND MAHOSEINI SH. 2011. Study on some
348 hematological and biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed citric acid
349 supplemented Diet. Global Vet 7: 361-364.
- 350 KHAJEPOUR F AND SEYED HA. 2012. Citric acid improves growth performance and
351 phosphorus digestibility in Beluga (*Huso huso*) fed diets where soybean meal partly
352 replaced fish meal. Anim Feed Sci Technol 171(1) 68-73.
- 353 MATTEY M. 1992. The production of organic acids. Reviews and Biotechnology 12(4):
354 87-172.
- 355 MROZ Z, JONGBLOED AW, PARTANEN K H, VREMAN K, KEMME P A AND
356 KOGUT J. 2000. The effects of calcium benzoate in diets with or without organic acids on
357 dietary buffering capacity, apparent digestibility, retention of nutrients, and manure
358 characteristics in swine. J Anim Sci 78: 2622-2632.
- 359 NG WK, KOH CB, KUMAR S AND SITI-ZAHRAHA A. 2009. Effects of organic acids
360 on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp.,
361 and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. Aquac Res
362 40: 1451-1466.

- 363 PANDEY A AND SATOH, S. 2008. Effects of organic acids on growth and phosphorus
364 utilization in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Fisheries Sci 74: 867–874.
- 365 PARTANEN HK, MROZ Z. 1999. Organic acids for performance enhancement in pig
366 diets. Nutr Res Rev 12(1): 117-145.
- 367 SARKER MSA, SATOH S AND KIRON V. 2005. Supplementation of citric acid and
368 amino acid-chelated trace element to develop environment friendly feed for red sea bream,
369 *Pagrus major*. Aquaculture 248: 3-11.
- 370 SARKER MSA, SATOH S AND KIRON V. 2007. Inclusion of citric acid and/or acid-
371 chelated trace elements in alternate plant protein source diets affects growth and excretion
372 of nitrogen and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. Aquaculture 262: 436- 443.
- 373 SUGIURA SH, DONG FM AND HARDY RW. 1998. Effects of dietary supplements on
374 the availability of minerals in fish meal; preliminary observations. Aquaculture 160: 283-
375 303.
- 376 SVOBODOVA Z, DUSEK L, HEJTMANEK M, VYKUSOVA B AND SMÍD R. 1999.
377 Bioaccumulation of mercury in various fish species from Orlik and Kamyk water
378 reservoirs in the Czech Republic. Ecotox Environ Safe 43: 231–240.
- 379 TAVARES-DIAS M, TENANI RA, GIOLO LD, FAUSTINO, CD. 1999. Características
380 hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos de *Piaractus*
381 *mesopotamicus* Holmberg (*Osteichthyes, Characidae*) em policultivo intensivo. Rev Bras
382 Zool 16(2): 431-431.
- 383 TAVARES-DIAS M AND MATAQUEIRO M.I. 2003. Características hematológicas,
384 bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (*Osteichthyes:*
385 *Characidae*) oriundos de cultivo intensivo. Acta Sci Anim Sci 26: 157-162.
- 386 URBINATI EC AND GONÇALVES FD. 2005. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In:
387 BALDISSEROTO B AND GOMES LC. (Orgs) Espécies nativas para a piscicultura no

- 388 Brasil. Santa Maria: UFSM, p.225-255.
- 389 VIELMA J, RUOHONEN K AND LALL SP. 1999. Supplemental citric acid and particle
390 size of fish bone-meal influence the availability of minerals in rainbow trout *Oncorhynchus*
391 *mykiss* (Walbaum). *Aquacult Nutr* (5): 65–71.
- 392 VIELMA J AND LALL SP. 1997. Dietary formic acid enhances apparent digestibility of
393 minerals in rainbowtrout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult Nutr* 3: 265-268.
- 394 WALSH MC, PEDDIREDI L AND RADICLIFFE JS. 2004. Acidification of nursery diets
395 sand the rofe of diet buffering capacity. Columbus: The Ohio State University. p. 25-36.
- 396 ZHU Y, QIU X, DING Q, DUAN M AND WANG C. 2014. Combined effects of dietary
397 phytase and organic acid on growth and phosphorus utilization of juvenile yellow catfish
398 *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*.430: 1–8.20.
- 399

400 Table 1. Formulation and chemical composition of experimental diets.

Ingredient	Citric acid (%)			
	0.0	1.0	2.0	3.0
Soybean meal	44.70	45.30	45.60	45.90
Corn	31.72	30.66	28.60	26.45
Wheat middlings	17.35	16.18	16.28	16.45
Soybean oil	1.60	2.23	2.90	3.58
Dicalcium phosphate	3.37	3.38	3.37	3.38
L-Lysine (78%)	0.36	0.36	0.36	0.36
DL-Methionine (99%)	0.07	0.07	0.07	0.07
Sodium chloride	0.10	0.10	0.10	0.10
Citric acid	-	1.00	2.00	3.00
Vitamin and mineral premix ¹	0.50	0.50	0.50	0.50
Butyl hydroxy toluene	0.02	0.02	0.02	0.02
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
	Calculated and determined composition			
Digestible protein (%) ³	23.00	23.00	23.00	23.00
Crude protein ³	27.24	27.34	27.17	27.71
Digestible energy (kcal/kg)	3200.00	3200.00	3200.00	3200.00
Ether extract (%)	5.25	6.40	6.80	7.28
Crude fiber (%) ²	6.15	6.78	6.86	6.67
Lysine (%) ²	1.64	1.64	1.64	1.64
Methionine (%) ²	0.38	0.38	0.38	0.38
Calcium (%)	1.05	1.05	1.05	1.05
Available phosphorus (%) ²	0.70	0.70	0.70	0.70

401 ¹ Composition of the vitamin-mineral premix kg diet⁻¹: vitamin A: 500,000 UI, vitamin D3, 250,000 UI,
402 vitamin E 5,000 mg, vitamin K3, 500 mg, vitamin B1 1.000 mg, vitamin B2: 1.000 mg, vitamin B6:
403 1,000mg, vitamin B12: 2,000 mg, niacin: 2.500, folic acid: 500 mg, biotin: 10 mg, vitamin C 10,000 mg,
404 choline: 100,000mg, Inositol: 1,000 mg, selenium: 30 mg, iron: 5,000 mg, copper: 1,000 mg, manganese:
405 5,000 mg, zinc: 9,000 mg, cobalt: 50 mg, iodine: 200mg.² Digestible values were estimated based on values
406 determined ³ Values determined.

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416 Table 2. Growth performance of pacu fed diets with increased levels of citric acid after 30,
 417 60 and 90 days of experiment. Mean \pm SD.

Parameters	Citric acid (%)			
	0.0	1.0	2.0	3.0
	30 days			
Weight gain (g)	8.22 \pm 2.85	9.77 \pm 1.80	11.21 \pm 3.80	8.77 \pm 2.39
Feed conversion ratio	1.47 \pm 0.39	1.17 \pm 0.24	1.08 \pm 0.28	1.40 \pm 0.50
Specific growth rate	0.15 \pm 0.04	0.17 \pm 0.03	0.19 \pm 0.06	0.16 \pm 0.04
Protein efficiency ratio	0.29 \pm 0.11	0.34 \pm 0.06	0.43 \pm 0.17	0.31 \pm 0.40
	60 days			
Weight gain (g)	29.43 \pm 6.59	30.92 \pm 5.55	30.29 \pm 7.29	30.61 \pm 3.97
Feed conversion ratio	1.30 \pm 0.30	1.05 \pm 0.21	1.20 \pm 0.03	1.12 \pm 0.62
Specific growth rate	0.72 \pm 0.06	0.75 \pm 0.09	0.72 \pm 0.09	0.74 \pm 0.08
Protein efficiency ratio	0.95 \pm 0.33	1.14 \pm 0.20	1.11 \pm 0.26	1.12 \pm 0.15
	90 days			
Weight gain (g)	37.08 \pm 7.03	38.64 \pm 7.52	39.26 \pm 9.47	39.83 \pm 5.23
Feed conversion ratio	1.40 \pm 0.25	1.32 \pm 0.39	1.68 \pm 0.29	1.52 \pm 0.62
Specific growth rate	1.23 \pm 0.14	1.25 \pm 0.21	1.24 \pm 0.22	1.28 \pm 0.13
Protein efficiency ratio	1.36 \pm 0.26	1.42 \pm 0.39	1.44 \pm 0.44	1.46 \pm 0.19
Nitrogen retention	24.21 \pm 4.51	26.57 \pm 4.79	26.19 \pm 3.86	26.37 \pm 3.26

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433 Table 3. Hydrogenionic potential (pH) of diet, stomach and gut of pacu fed diets with
434 increased levels of citric. Mean \pm SD.

pH	Citric acid (%)			
	0.0	1.0	2.0	3.0
Diet	5.96 \pm 0.06 b	5.22 \pm 0.03 c	4.65 \pm 0.01 d	4.30 \pm 0.01 a
Stomach	5.04 \pm 0.19	4.71 \pm 0.24	4.60 \pm 0.43	4.68 \pm 0.28
Gut	6.29 \pm 0.17	6.26 \pm 0.18	5.95 \pm 0.30	5.97 \pm 0.38

435 Means followed by different letters are significantly different by Tukey's test (5 %).

436

437

438

439

440

441 Table 4. Haematocrit (Htc), haemoglobin (Hb), mean corpuscular volume (MCHC),
442 hepatosomatic index (HSI) and viscerosomatic index (VSI) of pacu fed diets with
443 increased levels of citric. Mean \pm SD.

Parameters	Citric acid (%)			
	0.0	1.0	2.0	3.0
Htc (%)	34.04 \pm 1.95	33.46 \pm 1.03	33.50 \pm 1.11	33.54 \pm 1.61
Hb (g/dl)	6.86 \pm 0.66	6.05 \pm 0.65	5.95 \pm 0.45	5.94 \pm 0.33
MCHC (g/dL)	19.07 \pm 1.61	18.02 \pm 1.18	18.08 \pm 2.21	17.96 \pm 1.09
HSI (%)	0.90 \pm 0.37	1.02 \pm 0.46	0.98 \pm 0.31	0.93 \pm 0.79
VSI (%)	5.40 \pm 1.10	4.80 \pm 0.46	4.61 \pm 1.15	5.45 \pm 0.79

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455 Table 5. Chemical composition of pacu fed of pacu fed diets with increased levels of citric.
 456 Mean \pm SD.

Parameters	Citric acid (%)			
	0.0	1.0	2.0	3.0
Moisture (%)	79.29 \pm 0.46	79.85 \pm 0.21	80.86 \pm 0.41	80.44 \pm 0.32
Crude protein (%)	17.36 \pm 0.76	17.37 \pm 0.91	17.59 \pm 0.99	18.33 \pm 0.29
Ether extract (%)	12.30 \pm 2.25	11.40 \pm 3.50	11.80 \pm 1.96	12.35 \pm 2.76
Ash (%)	1.32 \pm 0.11	1.35 \pm 0.18	1.37 \pm 0.16	1.42 \pm 0.15

457 The mean were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test (P <0.05) significance.

458

459

460

461

462 Table 6. Apparent digestibility coefficients (ADC %) of nutrients, energy Ca and P of diets
 463 supplemented with citric acid for pacu. Mean \pm SD.

ADC (%)	Citric acid (%)			
	0.0	1.0	2.0	3.0
Dry matter	72.96	72.96	75.32	76.15
Crude protein	89.48	88.05	86.19	86.12
Crude energy	80.01	78.54	80.00	80.01
Ether extract	94.12	92.50	92.63	95.01
Calcium	52.63	51.96	52.39	55.02
Phosphorus	61.13	66.67	66.55	67.85

464

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475 CAPITULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

476

477 Pesquisas vêm sendo realizadas com o uso dos ácidos orgânicos na dieta
478 animal com a finalidade de substituir os antibióticos promotores de crescimento.
479 Dentre alguns ácidos com esse potencial, destaca-se o cítrico, que quando
480 adicionado na alimentação animal proporciona melhora no crescimento, no
481 consumo alimentar, na resistência dos peixes a doenças, e na digestibilidade dos
482 nutrientes e minerais das rações.

483 Apesar de alguns estudos avaliarem a digestibilidade de nutrientes,
484 disponibilidade de minerais, e o desempenho produtivo de algumas espécies de
485 peixes, até o momento, ainda não existiam estudos e informações sobre os
486 efeitos da inclusão do ácido cítrico como aditivo zootécnico na produção de
487 espécies nativas brasileiras.

488 Embora, o estudo não tenha apresentado diferenças significativas nas
489 variáveis de desempenho e na digestibilidade dos nutrientes e disponibilidade dos
490 minerais foi observada tendência na melhora, quando os animais receberam as
491 rações acidificadas. Dessa forma, novas pesquisas avaliando a inclusão de
492 maiores níveis do ácido cítrico e uso de outros ácidos orgânicos combinados ou
493 não em dietas para pacu e demais espécies nativas de interesse comercial devem
494 ser incentivadas.

495