



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SISTEMAS DE
CULTIVO SOBRE O CRESCIMENTO E AS PROTEÍNAS DO
SISTEMA DIGESTÓRIO DE *Oreochromis niloticus*, L.**

KAROLLINA LOPES DE SIQUEIRA SOARES

Recife, 2012

Soares, Karollina Lopes de Siqueira

Análise da influência de diferentes sistemas de cultivo sobre o crescimento e as proteínas do sistema digestório de *Oreochromis niloticus*, L./ Karollina Lopes de Siqueira Soares. – Recife: O Autor, 2012.

61 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ranilson de Souza Bezerra

Coorientadora: Márcia Vanusa da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas. Biotecnologia, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

1. Tilápia (peixe) 2. Proteases 3. Peixes- criação I. Bezerra, Ranilson de Souza II. Silva, Márcia Vanusa da III. Título

639.3774 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-144

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SISTEMAS DE
CULTIVO SOBRE O CRESCIMENTO E AS PROTEÍNAS DO
SISTEMA DIGESTÓRIO DE *Oreochromis niloticus*, L.**

KAROLLINA LOPES DE SIQUEIRA SOARES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para a obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa

Recife, Fevereiro de 2012

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SISTEMAS DE
CULTIVO SOBRE O CRESCIMENTO E AS PROTEÍNAS DO
SISTEMA DIGESTÓRIO DE *Oreochromis niloticus*, L.**

KAROLLINA LOPES DE SIQUEIRA SOARES

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Data da Aprovação ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra – (Presidente)
Departamento de Bioquímica – CCB – UFPE

Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral (Membro Externo – Titular)
Departamento de Bioquímica – CCB – UFPE

Prof^ª. Dr.^a. Márcia Vanusa da Silva (Membro Externo – Titular)
Departamento de Bioquímica – CCB – UFPE

Como foi a imaginação que criou o mundo, ela governa-o.

- Charles Baudelaire -

Karollina Lopes

Dedico à minha mãe Loide e à minha avó Ester, meus dois exemplos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas energias.

À minha mãe Loide Lopes, pelo apoio, por me acompanhar nos meus caminhos, pelo seu carinho e amor. À minha avó Ester Laurentino de Siqueira por estar sempre a postos, por me apoiar mesmo sem entender e por todo amor que dedica a mim desde que nasci. À minha irmã Rafaella Lopes por fazer bem o papel de irmã mais nova. Obrigada pelas três formas de amor tão necessárias na minha vida.

Agradeço também a Ranilson de Souza Bezerra pela oportunidade, orientação e preocupação. Por ser amigo além de orientador.

A Márcia Vanusa, pela orientação, idéias e oportunidade em conhecer a proteômica.

A Juliana Ferreira dos Santos por me receber em sua casa em Serra Talhada, por ter encabeçado o cultivo, o qual sem ela não teria sido possível, pelas caronas e boas conversas rumo ao sertão.

A Tulio Diego da Silva pela amizade desde a graduação, por disponibilizar seu tempo, por transmitir seus conhecimentos, pela paciência, conversas e risadas.

Agradeço aos exemplares de tilápia do Nilo que doaram o que tinham de mais valioso, a vida.

A Danny de Lima Oliveira por sentir tão diferente, por ter esse espírito tão leve que sempre procura me acalmar e me entender.

A Belany Carvalho, Hernando Neto e Pedro Marinho. A Belany por suas visões da vida sempre tão profundas. A Hernando por sua doçura. A Pedro por se parecer tanto comigo. Agradeço aos três pela amizade, por me conhecer e sempre me acompanhar. Obrigada por despertar um sentimento tão bom em mim.

Agradeço a Inaldo César de Araújo Júnior por ser um quase irmão pra mim. E a Bruna Machado pela amizade e sua visão tão diferente do mundo.

Aos amigos Adson Albuquerque, Walter Salles, Leonardo Xavier, Raphael Araújo e Elcir Vero pela constante presença.

Aos amigos do mundo virtual: Luan Menezes pelas longas conversas sempre tão ricas e cheias de conhecimento, além da companhia nas muitas horas sem sono. A Paulo Nunes por nunca concordar com o que falo fazendo com que eu exercite muito minha argumentação, além de seu humor bem peculiar que muitas vezes me diverte.

Às minhas turmas de graduação e pós-graduação, em especial a Bruno Fernandes, Carolina Malafaia, Felipe Ferreira e Tiago Ribeiro, da graduação. Ana Katarina Bezerra e José Ribamar Neto da pós-graduação.

Só tenho a agradecer aos membros do Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Anderson Henriques, Augusto Vasconcelos, Caio Rodrigo, Carolina Costa, Carolina Kropniczki, Charles Rosemberg, Cybelle Marques, Danielli Matias, Douglas Holanda, Fábio Marcel, Flávia Thuane, Gilmar Cezar, Guilherme Firmino, Helane Costa, Ian Porto, Janilson Felix, Juliett Xavier, Kaline Campos, Kelma Sirleide, Marina Marcuschi, Mirella Assunção, Paula Maia, Paula Rayane, Raquel Pereira, Renata França, Ricardo Abadie, Robson Coelho, Thiago Cahú, Vagne Melo e Werlayne Mendes pelo agradável convívio e permuta de conhecimentos.

Agradeço também à equipe de Serra Talhada: aos alunos de engenharia de pesca Camila Melo, Fernando Nascimento, Juscelino Lima, Marcela Juliana Silva, Marcelo Freire e Vanessa Gomes; e aos funcionários do IPA de Serra Talhada, Carlos Augusto Martins Guerra por disponibilizar a estrutura do IPA; a Armando, Dilson, Neguinha e Vilani, por todo apoio e disponibilidade em ajudar nos trabalhos do cultivo. Agradeço também a Timba pelo transporte e auxílio no cultivo no Açude Saco.

Agradeço a Amaro de Castro por disponibilizar a estrutura do IPA – Recife para os experimentos de proteômica. E Julia Campos por me ajudar com o espectrômetro de massas no CETENE.

Agradeço a disponibilidade da banca examinadora Prof^a Dr^a Márcia Vanusa e Prof^a Dr^a Maria Tereza Correia.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao CNPq, à FACEPE e à CAPES pelo financiamento do projeto.

Agradeço a todos presentes nessa fase!

RESUMO

Atualmente a espécie *Oreochromis niloticus* é uma das principais espécies cultivadas no país tanto por suas características biológicas, que permitem um fácil manejo e quanto por sua carne ser de grande aceite comercial. O cultivo desses animais pode ser de dois tipos: semi-intensivo – onde há a utilização de adubos para aumentar a produção, a alimentação se dá pela inserção de ração comercial e o alimento natural pode suprir uma possível falta de proteína; intensivo – caracteriza-se pela alta produção e a alimentação é completamente comercial. Sabendo da grande influência que a forma de cultivo exerce sobre os animais, o presente estudo objetivou analisar o crescimento zootécnico dos animais submetidos aos dois tipos de cultivo, analisar as atividades enzimáticas de proteases presentes no intestino desses animais e obter e comparar os perfis proteômicos do estômago e intestino desses peixes, para tentar elucidar algumas formas de adaptação desses animais aos sistemas semi-intensivo e intensivo de cultivos. Os cultivos foram realizados, durante 120 dias, com dois tipos de planos nutricionais. Foram realizadas biometrias durante todo o período dos cultivos, a partir das quais os parâmetros zootécnicos foram calculados. Após os cultivos houve a coleta dos animais, os quais tiveram seus intestinos e estômagos retirados. Um extrato bruto foi preparado para o ensaio das atividades enzimáticas: protease total com azocaseína como substrato e tripsina utilizando BApNA como substrato. Para os perfis proteômicos foram feitos géis 2D-PAGE utilizando fitas de 13 cm e pH na faixa de 3-10. Pela análise do crescimento zootécnico, apenas os parâmetros de peso médio final, conversão alimentar e sobrevivência foram estatisticamente diferentes. Quanto às atividades enzimáticas, essas não se mostraram estatisticamente diferentes e mostraram um mesmo padrão ao longo do tempo. Nos perfis proteômicos dos intestinos pode-se detectar 731 spots diferentes, na análise do estômago foi observada a presença de 543 spots diferenciais. Com isso, o presente trabalho conclui que os sistemas de cultivo influenciaram diretamente os animais. Os presentes resultados contribuem na elucidação da influência dos fatores dos sistemas sobre o crescimento e a fisiologia digestivas da tilápia do Nilo.

Palavras - chave: Tilápia; cultivo semi-intensivo; cultivo intensivo; proteômica; proteases; crescimento somático de peixe.

ABSTRACT

The Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, is one of the main species in Brazilian aquaculture for its biological characteristics and commercial meat acceptance. The culture of those animals is usually carried out in two different ways: semi-intensive – which includes the use of fertilizers to increase production, the feeding also includes the introduction of commercial ration and the natural food can supply the remaining protein requirement; intensive – it is characterized by high production and feeding is completely artificial. As we know that the farming conditions greatly affect the production of aquaculture animals, the present study aims the analysis of the zootechnic growth of the animals submitted to the two culture types, evaluation of enzymatic activities in the gut proteases and to obtain and to compare the proteomic profiles of the stomach and gut of those fish, in order to elucidate any adaptations of those animals to the semi-intensive and intensive systems. The culture was realized for 120 days with two types of nutritional plans. Biometrics were made during the whole period and used for calculations of zootechnic parameters. After this period, the guts and stomach were collected and a crude protein extract was prepared for each sample for evaluation of protein content and enzymatic assays: alkaline proteolytic activity with azocasein as substrate and trypsin using BApNA as substrate. For the proteomic profiles, 2D-PAGE were prepared using strips of 13 cm and pH ranging from 3 to 10. From the analysis of the zootechnic parameters, we found that the final medium weight, food conversion and survival were statistically different. As for the enzymatic assay, it did not differ along the time. In the proteomics profiles of the guts, 731 different spots can be detected, in the analysis of the stomach the presence of 543 different spots was observed when comparing the treatments. According to these data, it can be suggested that the culture systems influenced the animals directly. The present results contribute to elucidate the influence from factors of the systems on the growth and digestive physiology of Nile tilapia.

Keywords: Tilapia; semi-intensive; intensive; proteomics; proteases; somatic growth of fish.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descrição	Página
1	Produção (t) da pesca extrativa e da aquicultura do Brasil de 1950 a 2008 (MPA, 2011).	3
2	Produção (t) da aquicultura continental brasileira nos anos de 2007, 2008 e 2009 (MPA, 2011).	4
3	Sistemas de cultivo adotados. Em A o sistema semi-intensivo e em B o intensivo.	5
4	Esquema do trato digestório de peixes em geral. (Adaptado de GROSELL et al., 2011).	7
5	Esquema do processo de digestão no trato digestório dos peixes (GROSELL et al., 2011).	7

Artigo: Análises zootécnicas, bioquímicas e proteômicas em *Oreochromis niloticus*, L. submetidas a diferentes sistemas de cultivos.

Figura	Descrição	Página
6	Atividade proteolítica alcalina total do extrato bruto do intestino de tilápia do Nilo cultivada em sistema intensivo e semi-intensivo durante 120 dias, utilizando azocaseína como substrato	27
7	Atividade trípica do extrato bruto do intestino de tilápia do Nilo cultivada em sistema intensivo e semi-intensivo durante 120 dias, utilizando BApNA (N α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) como substrato.	27
8	Eletroforese bidimensional do intestino de indivíduos de tilápia	28

	do Nilo cultivados em sistema semi-intensivo.	
9	Eletroforese bidimensional do intestino de indivíduos de tilápia do Nilo cultivados em sistema intensivo.	29
10	Eletroforese bidimensional do estômago de indivíduos de tilápia do Nilo cultivados em sistema semi-intensivo.	29
11	Eletroforese bidimensional do estômago de indivíduos de tilápia do Nilo cultivados em sistema intensivo.	30

LISTA DE TABELAS

**Artigo: Análises zootécnicas, bioquímicas e proteômicas em *Oreochromis niloticus*,
L. submetidas a diferentes sistemas de cultivos.**

Tabela	Descrição	Página
1	Plano nutricional adotado para o cultivo de peixes em viveiros e tanques-rede	19
2	Composição centesimal das dietas utilizadas para os sistemas de cultivo, a partir da porcentagem de proteína bruta.	20
3	Parâmetros físico-químicos da água, analisados ao decorrer cultivo.	25
4	Parâmetros zootécnicos da tilápia do Nilo, submetida aos sistemas de cultivo semi-intensivo e intensivo, ao decorrer de 120 dias.	26

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descrição
2D	Eletroforese Bidimensional
°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
µg	Micrograma
BAPNA	Nα-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
cm	Centímetro
DNOCS	Departamento Nacional de Obras Contra a Seca
DTT	Dithiothreitol
FAO	Food and Agriculture Organization
Fig.	Figura
g	Gramas
HCl	ácido clorídrico
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
kDa	Kilodalton
M	Molar
m³	Metro Cúbico
mA	Miliampere
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
MALDI-ToF	Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura

PB	Proteína Bruta
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
pI	Ponto Isoelétrico
PMF	Peptide Mass Fingerprint
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SDS - PAGE	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
t	Tonelada
Tab.	Tabela
TCA	Ácido Tricloroacético
UAST	Unidade Acadêmica de Serra Talhada
xg	Força Centrífuga

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS..... III

RESUMO V

ABSTRACT VI

LISTA DE FIGURAS..... VII

LISTA DE TABELAS IX

LISTA DE ABREVIATURAS..... X

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. OBJETIVOS 2

 2.1 GERAL 2

 2.2 ESPECÍFICOS 2

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3

 3.1. PANORAMA DA AQUICULTURA..... 3

 3.2. *Oreochromis niloticus* 4

 3.3. SISTEMAS DE CULTIVO 5

 3.4. DIGESTÃO EM PEIXES 6

 3.5. PROTEÔMICA..... 7

4. BIBLIOGRAFIA 9

5. ARTIGO CIENTÍFICO..... 16

Resumo..... 16

1. Introdução..... 16

2. Material e Métodos 17

 2.1. Materiais 17

 2.2. Cultivos 17

 2.2.1. Sistemas 18

 2.2.1.1. Semi-intensivo 18

2.2.1.2. Sistema Intensivo	18
2.2.3. Monitoramento dos parâmetros físico-químicos	18
2.2.4. Biometria	19
2.2.5. Alimentação	19
2.2.6. Cálculos dos parâmetros zootécnicos.....	20
2.2.7 Análises Estatísticas	21
2.3. Obtenção dos animais e extração dos tecidos	21
2.4. Preparação do extrato bruto e quantificação protéica.....	22
2.5. Ensaio enzimáticos e análises estatísticas	22
2.5.1. Atividade proteolítica alcalina total	22
2.5.2 Atividade de tripsina	22
2.5.3. Análises estatísticas.....	23
2.6. Extração e quantificação protéica para a proteômica	23
2.7. Precipitação das proteínas.....	23
2.8. Eletroforeses bidimensionais em géis de Poliacrilamida (2D)	24
2.8.1. Primeira Dimensão – Focalização Isoelétrica.....	24
2.8.2 Segunda Dimensão – SDS-PAGE.....	24
2.9. Análise dos géis bidimensionais.....	25
3. Resultados.....	25
3.1. Parâmetros físico-químicos.....	25
3.2. Parâmetros zootécnicos.....	25
3.3. Atividades Proteolíticas	26
3.4. Perfis Proteômicos	28
4. Discussão.....	31
4.1. Parâmetros físico-químicos e zootécnicos	31
4.2. Atividades Proteolíticas	33
4.3. Perfil Proteômico.....	34

.....

5. Conclusões.....	35
6. Bibliografia.....	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
7. ANEXOS	41
7.1. NORMAS DA REVISTA – Aquaculture	42

1. INTRODUÇÃO

As tilápias são peixes originários da África e foram introduzidas no Brasil a partir de 1971 pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) nos açudes do Nordeste (PROENÇA e BITTENCOURT, 1994; CASTAGNOLLI, 1996). A tilápia é apontada como a principal espécie da piscicultura brasileira, pois suas características biológicas fazem com que ela seja um peixe de fácil manejo (FARIA et al., 2001), além de apresentar carne de boa qualidade com grande aceitação no mercado, sendo muito apropriada para a indústria de filetagem (HAYASHI, 2002).

Os principais cultivos de *Oreochromis niloticus* são classificados de duas formas: cultivo semi-intensivo no qual a utilização de fertilizantes inorgânicos, adubos e dietas suplementares para ampliar a produção (MATAKA e KANG'OMBE, 2007) e o cultivo intensivo que se caracteriza pelas altas densidades (100 a 200 peixes/m³), dietas com altos níveis protéicos e uma alta produtividade (MOHAMMAD, 2006).

Proteômica é o estudo do conjunto de proteínas expressas a partir de um genoma. Esse conjunto, por sua vez, é chamado proteoma. As técnicas de proteômica permitem a separação, quantificação e identificação das proteínas de um determinado proteoma, sendo possível, com a bioinformática, correlacionar os dados obtidos com dados oriundos de outras abordagens (SANTOS et al. 2004). Para o estudo proteômico duas técnicas são essenciais: a eletroforese bidimensional (2D), na primeira dimensão dessa metodologia a separação das proteínas se dá pelo seu ponto isoelétrico (pI), a segunda dimensão separa as proteínas pelo seu peso molecular (GÖRG et al., 2002); e a espectrometria de massas, essa técnica identifica as proteínas a partir das massas dos peptídeos buscando homologia desses dados com bancos pré-existentes (STEEN et al., 2004).

Genômica, transcriptômica e proteômica são ferramentas importantes para a fisiologia de peixes, através delas é possível a análise da evolução de genes, como também análises globais de células e tecidos que vão elucidar os mecanismos fisiológicos responsáveis pelo crescimento, reprodução, stress, dentre outros. Com essas técnicas também é possível a identificação de proteínas e seus papéis nas rotas metabólicas (PARRINGTON, 2002). Assim, o estudo proteômico da fisiologia digestiva é importante para mostrar a influência dos tipos de cultivo no desenvolvimento do animal, já que uma digestão eficiente irá ocasionar impacto direto sobre a produtividade e os ecossistemas (DEGANI e YEHUDA, 1999).

Com isso, o presente trabalho avaliou a influência dos sistemas de cultivo semi-intensivo e intensivo sobre *O. niloticus* através dos parâmetros zootécnicos, atividades proteolíticas alcalinas totais e tríplicas do intestino dos animais submetidos aos dois tipos de cultivo e os perfis proteômicos do intestino e estômago dos animais.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a influência dos cultivos semi-intensivo e intensivo sobre o crescimento e as proteínas presentes no estômago e intestino de *O. niloticus*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento zootécnico dos animais submetidos aos dois tipos de cultivo;
- Mensurar as atividades de proteases alcalinas totais e da tripsina presentes no intestino dos animais cultivados;
- Analisar e comparar o perfil proteômico dos estômagos e intestinos da tilápia do Nilo submetidas a diferentes sistemas de cultivo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. PANORAMA DA AQUICULTURA

Em 2008, a aquicultura mundial produziu mais de 52 milhões de toneladas de pescado. Tendo como maior representante no cenário de produção o continente asiático, com mais de 46 milhões de toneladas de pescado, seguido pelo continente americano com mais de dois milhões de toneladas (FAO, 2010).

Historicamente, a produção pesqueira brasileira mostrou um crescimento da pesca extrativa de 1950 a 1985 quando atingiu a maior produção de quase um milhão de toneladas. A partir daí houve uma queda gradual e a partir do ano de 2000 a produção pesqueira voltou a crescer chegando à quase 800.000 t em 2008. Já a produção aquícola brasileira teve início em 1968 com 0,5 t de pescado produzido e em 2008 houve a maior produção chegando a mais de 360 mil toneladas de pescado (Fig. 1) (MPA, 2011).

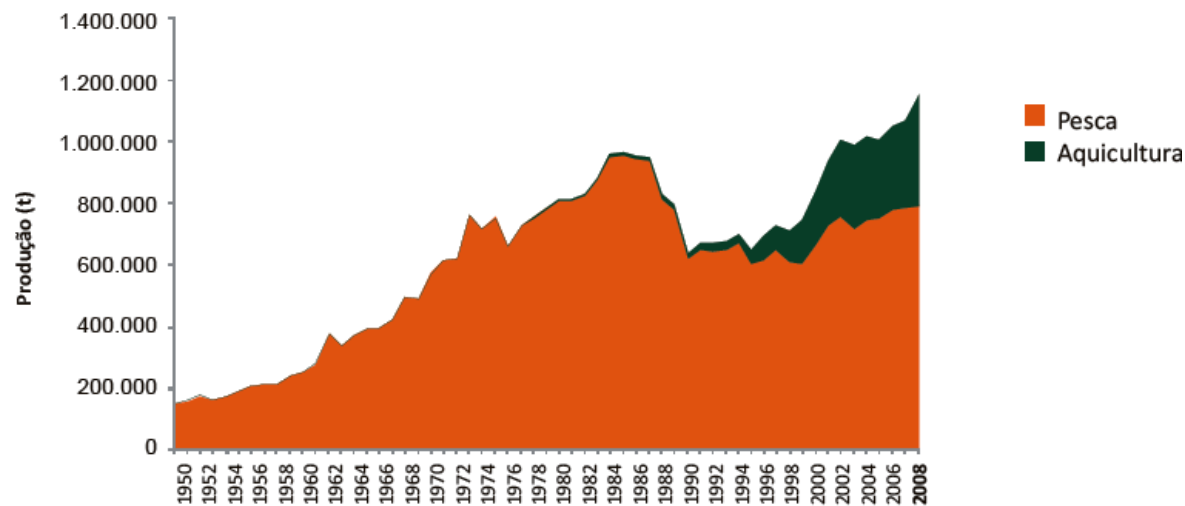


Figura 1: Produção (t) da pesca extrativa e da aquicultura do Brasil de 1950 a 2008 (MPA, 2011).

Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura (2011), a aquicultura brasileira, em 2009, produziu mais de 415 mil toneladas de pescado. Quanto a produção aquícola continental o crescimento de 2007 para 2009 foi de 61% (Fig. 2), sendo a tilápia a responsável por 39% dessa produção. A região Nordeste é a região que mais produziu pescado, chegando a representar 31% da aquíicultura continental nacional.

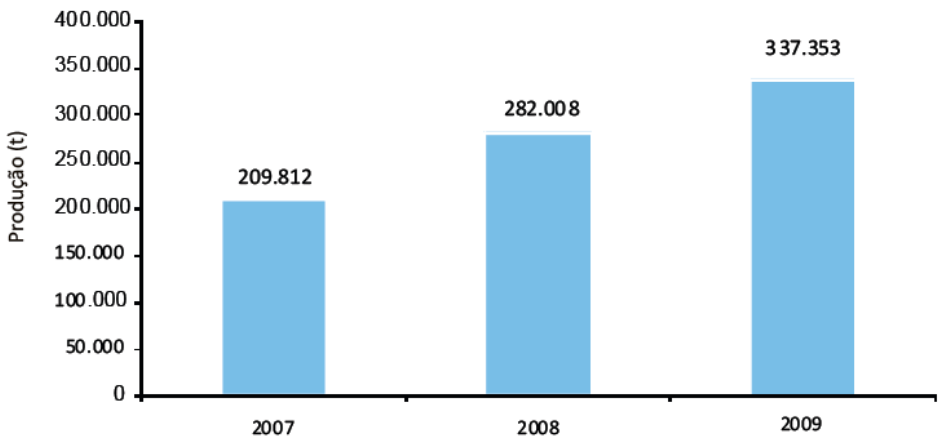


Figura 2: Produção (t) da aquicultura continental brasileira nos anos de 2007, 2008 e 2009 (MPA, 2011).

3.2. *Oreochromis niloticus*

As tilápias são peixes nativos da África, Jordânia e Israel, representados por aproximadamente 70 espécies e cultivados em todo o mundo. Três gêneros apresentam importância comercial, *Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*. O gênero *Oreochromis* possui grande distribuição, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, que está associada à alta tolerância às variações das condições ambientais (TREWAVAS, 1982).

A classificação científica de *O. niloticus* é a seguinte: Reino Animalia, Filo Chordata, Classe Actinopterygii, Ordem Perciformes, Família Cichlidae, Gênero *Oreochromis*, Espécie *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (TREWAVAS, 1983).

Dentre as espécies de peixes onívoros a *O. niloticus* se destaca por sua alta capacidade de utilizar nutrientes tanto de origem vegetal e quanto de origem animal (SILVA et al., 2006). O que mostra a adaptabilidade desse peixe às suas condições alimentares.

Oreochromis niloticus é apontada como uma das principais espécies da piscicultura brasileira, pois é um peixe de fácil manejo, por sua rusticidade; possui rápido crescimento; é bastante resistente a altas temperaturas e baixas concentrações de oxigênio dissolvido (FARIA et al., 2001; MATHEUS, 1984; GALLI & TORLONI, 1999).

A tilápia possui grande aceitação no mercado por sua carne de boa qualidade, ausência de espinhos intramusculares, além de ser muito apropriada para a indústria de

filetagem, com o seu filé podendo chegar a um rendimento de aproximadamente 33% em animais de 350 g a 1000 g, dependendo da utilização (HAYASHI, 2002; FURUYA, 2003; TACHIBANA, 2002).

3.3. SISTEMAS DE CULTIVO

A tilápia do Nilo é produzida em diferentes sistemas de cultivo e escalas, com maior ou menor dependência de insumos, principalmente ração (KÖPRÜCÜ e ÖZDEMİR, 2005).

O sistema semi-intensivo cultiva os animais em viveiros escavados (Fig. 3A). Para aumentar a produção utiliza fertilizantes inorgânicos, adubos e dietas suplementares para que a produção seja ampliada (MATAKA e KANG'OMBE, 2007). Quando as dietas apresentam baixas concentrações de proteína, o déficit é suprido pelo alimento natural (LITI et al., 2006).

O sistema intensivo caracteriza-se pelas altas densidades (100 a 200 peixes/m³), dietas com altos níveis protéicos e uma alta produtividade (MOHAMMAD, 2006) (Fig. 3B). Nesse tipo de sistema há uma contínua renovação de água que retira os metabólitos excretados e os dejetos deixando a água sempre limpa (COLT e MONTGOMERY, 1991). Cultivar animais em tanque-rede ou gaiolas pode ser uma alternativa para o uso de ambientes aquáticos já existentes e não explorados pela piscicultura o que faz ser desnecessário o desmatamento de locais para a instalação de viveiros escavados, evitando, assim, erosão e o assoreamento das áreas (CARDOSO et al., 2005). O cultivo em tanques-rede de *O. niloticus* vem obtendo destaque na piscicultura por esse gênero apresentar boa adaptação em altas densidades (FURLANETO et al., 2006).

Segundo, Cyrino e Conte (2006) o sistema de tanque-rede apresenta uma menor variação dos parâmetros físico-químicos da água e a despesca é de maior facilidade. Além de que o investimento inicial chega a ser 70% menor que o investimento em sistemas semi-intensivo. Porém, estudos feitos por Liti et al. (2005) demonstraram que altas densidades de tilápia promovem redução no ganho de peso. No entanto, os animais podem demonstrar algumas compensações fisiológicas, a qualidade do alimento e o manejo adotado podem contribuir para este tipo de adaptação.



3.4. DIGESTÃO EM PEIXES

O conhecimento sobre a dieta e os hábitos alimentares é essencial na compreensão de vários aspectos da biologia dos peixes sendo muito importante para a aplicação na aquicultura e na formulação de rações. Nas últimas décadas numerosos trabalhos mostraram os conteúdos estomacais de diversas espécies de peixes, evidenciando as diferentes fontes de nutrientes utilizadas por eles (fito e zooplanktons, macroalgas, plantas aquáticas, insetos, crustáceos, moluscos, outros peixes, aves, mamíferos, entre outros). De acordo com seu hábito alimentar os peixes foram categorizados em: herbívoros, onívoros ou carnívoros/piscívoros (GROSSELL et al., 2011).

Segundo Pillay (1952) a natureza do alimento ingerido depende primeiro da morfologia do trato digestório e do comportamento alimentar do peixe e segundo da composição e quantidade do alimento que está disponível no meio. As estruturas macroscópicas e microscópicas dos órgãos digestórios se relacionam com a natureza dos alimentos e a forma como eles são ingeridos. Com isso, o comprimento do intestino tem relação com o hábito alimentar do animal (CHAVES & VAZZOLER, 1984).

Em aquicultura a formulação das rações é uma etapa muito importante. Várias características, como tamanho do pellet, consistência e gosto, têm que ser levadas em consideração para que a ração seja atrativa para o animal (GROSSELL et al., 2011).

Estudos morfológicos do tubo digestório dos peixes elucidam questões da organização espacial dos órgãos e a sua relação com dados fisiológicos e bioquímicos (Fig. 4), já estudos de genômica, proteômica e transcriptômica podem revelar os mecanismos moleculares da digestão (GROSSELL et al., 2011).

Anatomicamente a divisão esôfago e estômago não é claramente demarcada. Os cecos pilóricos, órgão que não está presente em todos os peixes, possuem células muito parecidas com às do intestino e apresenta as funções de digestão e absorção. Além da digestão, o trato digestório nos peixes tem a função de osmorregulação, respiração e defesa (GROSSELL et al., 2011). As espécies de peixes diferem bastante na capacidade de digestão. Esta variação reflete diferenças anatômicas e funcionais do trato gastrointestinal e dos órgãos associados. Os peixes onívoros possuem funções digestivas capazes de hidrolisar uma variedade maior de alimentos quando comparados com os peixes carnívoros (ALMEIDA et al., 2006).

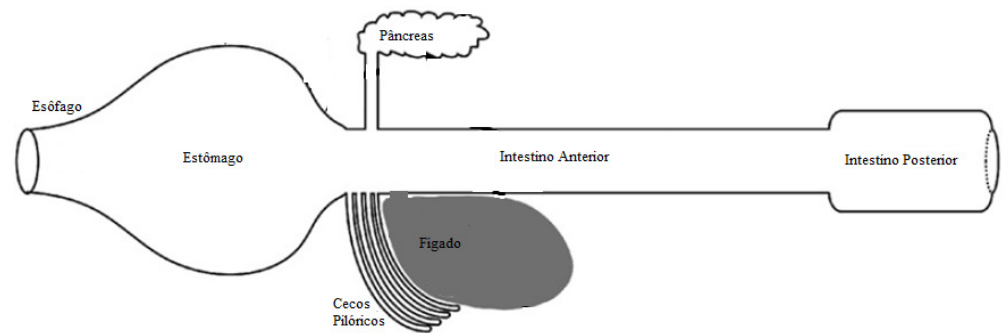


Figura 4: Esquema do trato digestório de peixes em geral. (Adaptado de GROSELL et al., 2011.)

No estômago começa a quebra física e enzimática do alimento. Neste órgão a secreção do HCl converte o pepsinogênio em pepsina e começa a quebra das proteínas (YUFERA et al., 2004; WU et al., 2009; GROSELL et al., 2011). Quando o bolo alimentar segue para o intestino a ação das enzimas secretadas pelos órgãos acessórios (pâncreas e fígado) continuam a quebra das proteínas até peptídeos e irão fazer a digestão das gorduras e carboidratos para que possam ser absorvidos pelas células intestinais (Fig. 5) (GROSELL et al., 2011).

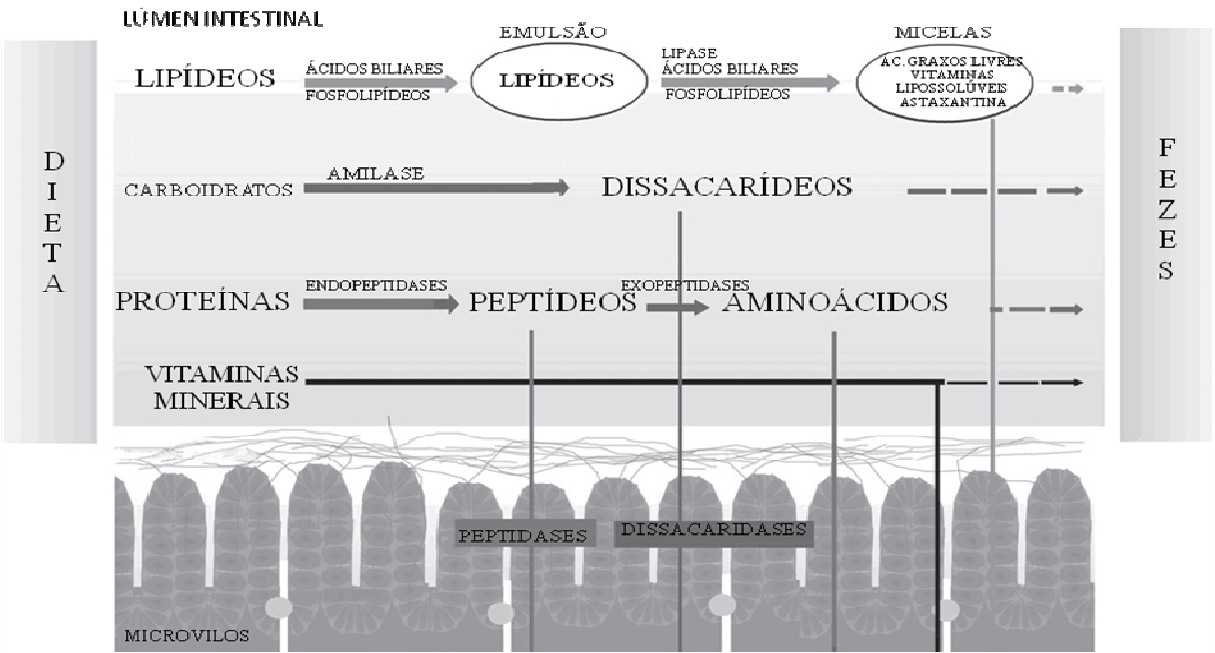


Figura 5: Esquema do processo de digestão no trato digestório dos peixes (GROSELL et al., 2011).

3.5. PROTEÔMICA

Proteoma é o conjunto de proteínas resultante da expressão gênica, síntese ribossomal e da modificações pós-traducionais, o que gera informações cruciais para a

compreensão do funcionamento celular. Um estudo proteômico é uma importante fonte de informação, pois pode caracterizar tanto quantitativamente quanto qualitativamente a expressão protéica global (ZOLLA, 2008). Para o estudo proteômico duas técnicas são essenciais: a eletroforese bidimensional (2D), onde na primeira dimensão a separação das proteínas se dá pelo seu ponto isoelétrico (pI) e na segunda dimensão separa as proteínas pelo seu peso molecular (GÖRG et al., 2002); e a espectrometria de massas, essa técnica identifica as proteínas a partir das massas dos peptídeos buscando homologia desses dados com bancos pré-existentis (STEEN et al., 2004).

Os espectrômetros de massa determinam a massa molecular de compostos químicos através da ionização e separação desses íons moleculares de acordo com sua razão massa/carga (WAGNER et al., 2002). O espectrômetro do tipo MALDI-ToF (Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight) consegue identificar os peptídeos através do tempo de voo dos mesmos. Através desse tempo a massa/carga de cada peptídeo é determinada, essa razão é característica do peptídeo e é chamada de PMF (Peptide Mass Fingerprint) (SHEVCHENKO et al., 1996; CAGNEY et al., 2003).

Com o avanço das tecnologias nas áreas de genômica e proteômica, o estudo da fisiologia dos peixes tem crescido, tornando possível a análise dos efeitos do stress na fisiologia desses animais (PARRINGTON et al., 2002).

Chen et al. (2009) mostraram a influência da salinidade em juvenis de *Plecoglossus altivelis*, a proteômica dos rins de indivíduos dessa espécie mostrou que proteínas envolvidas com o metabolismo energético, metilação do DNA, biossíntese e diferenciação celular foram afetadas.

Em nutrição, um estudo proteômico mostrou 45 proteínas que foram afetadas em peixes, da espécie *Danio rerio*, submetidos a dietas desbalanceadas em lisina. Dessas, 29 foram identificadas e estavam envolvidas com o crescimento muscular, metabolismo energético e de lipídeos, diferenciação de células do olho, atividade das chaperonas e apoptose (GÓMEZ-REQUENI et al., 2011).

Berg et al. (2010) estudaram a toxicidade de metil mercúrio em cérebros de *Gadus morhua* expostos a esse composto. Sanchez et al. (2009) compararam o proteoma de fígado entre indivíduos da espécie *Micropterus salmoides* expostos a alguns contaminantes ambientais e indivíduos sem este tipo de exposição.

Keyvanshokoo & Vaziri (2008) fizeram o perfil proteômico da ova de *Acipenser persicus*, conhecido como esturjão, peixe muito apreciado comercialmente

pela qualidade de sua ova, conhecida como caviar. Neste trabalho os autores identificaram 73 proteínas diferentes envolvidas na divisão celular, síntese protéica, transporte, estrutura celular, entre outras.

4. BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, L. C.; LUNDSTEDT, L. M.; MORAES, G. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipid. *Aquaculture Nutrition*, v. 12, p. 443–450. 2006.

BERG, K.; PUNTERVOLL, P.; VALDERSNES, S.; GOKSØYR, A. Responses in the brain proteome of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to methylmercury. *Aquatic Toxicology*, v.100, p. 51-65, 2010.

CAGNEY, G.; AMIRI, S.; PREMAWARADENA, T.; LINDO, M.; EMILI, A. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. *Proteome Sci.*, v.1, p.1-15, 2003.

CARDOSO, E.L.; FERREIRA, R.M.A.; PEREIRA, T.A.; CARDOSO, M.M.F. Cultivo de peixes em tanques-rede: EPAMIG/IEF. In: CARDOSO, E. L e FERREIRA, R.M.A (Editores). *Cultivo de peixes em tanques-rede: desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável*. EPAMIG, Minas Gerais. p.9-22, 2005.

CASTAGNOLLI, N. *Aqüicultura para o ano 2000*. Brasília: CNPq, 95p., 1996.

CHAVES, P. T. C.; VAZZOLER. G. Aspectos biológicos de peixes amazônicos. III. Anatomia microscópica do esôfago, estômago e cecos pilóricos de *Sernaprochilodus insignis* (Characiformes: Prochilodontidae). *Acta Amazonica*, v. 14, p. 343-353. 1984.

CHEN, J.; WU, H. Q.; SHI, Y. H.; LI, C. H.; LI, M. Y. The effects of environmental salinity on trunk kidney proteome of juvenile ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, v. 4, p. 263-267, 2009.

COLT, J.; MONTGOMERY, J. M. Aquaculture production systems. *Journal of Animal*

Science, v. 69, p. 4183- 4192, 1991.

CYRINO, J. E.; CONTE, L. Tilapicultura em Gaiolas: produção e economia. In: José Eurico POSSEBON CYRINO E ELISABETH CRISCUOLO URBINATI (Eds.). *AquaCiência 2004: Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática*, cap.12, p.151-171, 2006.

DEGANI, G.; YEHUDA, Y. Digestibility of protein sources in feed for *Oreochromis aureus* × *O. niloticus*. *Indian Journal of Fisheries*, v. 46, p. 33–39. 1999

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Roma, Italia. 219p. 2010.

FARIA, A. C. E. A., HAYASHI, C., GALDIOLI, E. M. & SOARES, C. M. Farinha de peixe em rações para alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), linhagem tailandesa. *Acta Scientiarum*, v. 23, p. 903-908. 2001.

FURLANETO, F. P. B.; AYROZA, D. M. M. R.; AYROZA, L. M. S. Custo e rentabilidade da produção de tilápia (*Oreochromis sp.*) em tanque-rede no médio Paranapanema, estado de São Paulo, safra 2004/05. *Informações Econômicas*, v.36, n.3, p.63-69, 2006.

FURUYA, W. M.; SILVA, L. C.; HAYASHI, C.; FURLAN, A. C.; NEVES, P. R.; BOTARO, D.; SANTOS, V. G. Substituição do milho pela silagem de sorgo com alto e baixo teor de tanino em dietas para juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum*, v. 25, n. 2, p. 243-247, 2003.

GALLI, L. F.; TORLONI, C. E. C. *Criação de peixes*. São Paulo: Livraria Nobel, S. A., 1999.

GÓMEZ-REQUENI, P.; VAREILLES, M.; KOUSOULAKI, K.; JORDAL, A. E. O.; CONCEIÇÃO, L. E. C.; RØNNESTAD, I. Whole body proteome response to a dietary

lysine imbalance in zebrafish *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, v. 6, p. 178-186, 2011.

GÖRG, A.; BOQUTH, G.; KÖF, A.; REIL, G. PARLAR, H.; WEISS, W. Sample prefractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels. *Proteomics*, v. 2, p. 1652-1657. 2002.

GROSELL, M; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. The multifunctional gut of fish. *Fish Physiology* v. 30, p 64-65, 2011.

HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R.; SOARES, C.M.; MEURER, F. Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a reversão sexual. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.31, n.2, p.823-828. 2002.

KEYVANSHOKOOH, S.; VAZIRI, B. Proteome analysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) ova. *Animal Reproduction Science*, v. 19, p. 287-297, 2008.

KÖPRÜCÜ, K.; ÖZDEMİR, Y. Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v. 205, p. 308-316. 2005.

LITI, D. M.; FULANDA B.; MUNGUTI, J. M.; STRAIF M.; WAIDBACHER, H. Effect of open-pond density and caged biomass of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L). *Aquaculture Research*, v. 36, p. 1535-1543. 2005.

LITI, D. M.; MUGO, R. M.; MUNGUTI, J. M.; WAIDBACHER, H. Growth and economic performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed on three brans (maize, wheat and rice) in fertilized ponds. *Aquaculture Nutrition*, v. 12, p. 239-245. 2006.

MATAKA, L.; KANG’OMBE, J. Effect of substitution of maize with chicken manure in semi-intensive pond culture of *Tilapia rendalli* (Boulenger). *Aquaculture Research*, v. 38, p. 940-946. 2007.

MATHEUS, C. E. Aspectos do crescimento e reprodução de *Sarotherodon niloticus* (tilápias do Nilo) em lagoas de estabilização e sua influência no tratamento biológico.

São Carlos, 1984. *Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais)* – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos. 1984.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). *Boletim estatístico da pesca e aquicultura* (Brasil 2008-2009). 2011.

MOHAMMAD, T. R. Comparative study of growth performance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L. at two stocking densities. *Aquaculture Research*, v. 37, p.172-179. 2006.

PARRINGTON, J.; COWARD, K.. Use of emerging genomic and proteomic technologies in fish physiology. *Aquatic Living Resource*, v. 15, p. 193–196. 2002.

PEDRAZZANI, A. S.; MOLENTO, C. F. M.; CARNEIRO, P. C. F.; FERNANDES DE CASTILHO, M.. Senciência e bem estar de peixes: Uma visão de futuro do mercado consumidor. *Panorama da Aquicultura*, v. 19, p. 24 – 29. 2007.

PILLAY, T. V. R. A critique of the methods of study of food of fishes. *Journal Zoological. Society*. v. 4; p. 185-200, 1952.

PROENÇA, C. E. M.; BITTENCOURT, P. R. L. *Manual de Piscicultura Tropical*. Brasília: IBAMA, p. 196, 1994.

SANCHEZ, B. C.; RALSTON-HOOPER, J. K.; KOWALSKI, K. A.; INEROWICZ, H. D.; ADAMEC, J.; SEPÚLVEDA, M. S. Liver proteome response of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to several environmental contaminants: Potential insights into biomarker development. *Aquatic Toxicology*, v. 95, p. 52-59, 2009.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microrganismos. *Boletim de Biotecnologia*, p. 7-17. 2004.

SILVA, L. C. R.; FURUYA, W. M.; SANTOS, L. D.; SANTOS, V. G.; SILVA, T. S. C.; PINSETTA, P. J. Níveis de teonina em rações para tilápias-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n.4, p.1258-1264, 2006.

SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O.N.; PODTELEJNIKOV, A.V.; SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSEN, P.; SHEVCHENKO, A.; BOUCHERIE, H.; MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Largescale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.93, p.14440-14445, 1996.

STEEN, H., MANN, M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nature Reviews. Molecular Cellular Biology*, v. 5, p. 699-711. 2004.

TACHIBANA, L. Desempenho inicial e digestibilidade aparente de nutrientes de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2002. *Dissertação (Mestrado)* – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista . Jaboticabal, 2002.

TREWAVAS, E. Generic groupings of Tilapiine used in aquaculture. *Aquaculture*, v. 27, p. 79-81. 1982.

TREWAVAS, E. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. *British Mus. Nat. Hist. London*, UK. 583p., 1983.

WAGNER, K.; MILIOTIS, T.; MARKO-VARGA, G.; BISCHOFF, R.; UNGER, K. K. An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation. *Analytical Chemistry*, v.74, p.809-820, 2002.

WU, T., SUN, L. C., DU, C. H., CAI, Q. F., ZHANG, Q. B., SU, W. J., AND CAO, M. J. Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*). *Food Chemistry*. v. 115, p. 137–142, 2009.

YUFERA, M., FERNANDEZ-DIAZ, C., VIDAURRETA, A., CARA, J. B., AND MOYANO, F. J. Gastrointestinal pH and development of the acid digestion in larvae and early juveniles of *Sparus aurata* (Pisces: Teleostei). *Marine Biology*, v. 144, p. 863–869, 2004.

ZOLLA, L.; RINALDUCCI, S.; ANTONIOLI, P.; RIGHETTI, P. G. Proteomics as a Complementary Tool for Identifying Unintended Side Effects Occurring in Transgenic Maize Seeds As a Result of Genetic Modifications. *Journal of Proteome Research*, vol. 7, n5, p. 1850-1861. 2008.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados desta dissertação serão apresentados no artigo “**Análises zootécnicas, bioquímicas e proteômicas em *Oreochromis niloticus*, L. submetidas a diferentes sistemas de cultivos.**” (manuscrito), que será submetido à publicação para a “**Aquaculture**” (ISSN: 0044-8486) com fator de impacto 2,552 e classificação A2 pela CAPES 2012.

Análises zootécnicas, bioquímicas e proteômicas em *Oreochromis niloticus*, L. submetidas a diferentes sistemas de cultivos.

Karollina Lopes de Siqueira Soares^a, Juliana Ferreira dos Santos^{a,b}, Thiago Cahú^a, Márcia Vanusa^c, Ranilson Souza Bezerra^a

^aLaboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil

^bDepartamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brazil

^cDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil

Corresponding author:

Ranilson Souza Bezerra

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brazil.

Tel, +55 81 21268540; Fax, +55 81 21268576

E-mail: ransoube@uol.com.br

Resumo

A produção de tilápia em escala global mostrou um aumento significativo na última década, no Brasil é a principal espécie cultivada. A *Oreochromis niloticus* é uma espécie onívora que se destaca por sua alta capacidade de digerir proteínas de diferentes fontes protéicas. O trabalho teve como objetivo observar a influência dos cultivos sobre os parâmetros zootécnicos, as atividades proteolíticas e os perfis proteômicos do trato digestório dos animais. O crescimento zootécnico, só mostrou diferença estatística nos parâmetros de peso médio final, conversão alimentar e sobrevivência. As atividades enzimáticas não se mostraram estatisticamente diferentes, porém se mostraram com um mesmo padrão durante os 120 dias de cultivo. Nos perfis proteômicos dos intestinos pode-se detectar 731 spots diferentes, na análise do estômago foi observada a presença de 543 spots diferenciais. Com isso, o presente trabalho conclui que os sistemas de cultivo influenciaram diretamente os animais. Os presentes resultados contribuem na elucidação da influência dos fatores dos sistemas sobre o crescimento e a fisiologia digestiva da tilápia do Nilo.

1. Introdução

A produção de tilápia em escala global mostrou um aumento significativo na última década (SCHULZ, 2007). Esses peixes são naturais da África, Jordânia e Israel, representados por aproximadamente 70 espécies e cultivados em todo o mundo. O gênero *Oreochromis* possui grande distribuição, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, que está associada à alta tolerância às variações das condições ambientais (TREWAVAS, 1982). No mundo, entre as espécies mais cultivadas as tilápias são o segundo grupo em volume de produção e o terceiro em geração de renda (NAYLOR et al., 2000; BORGHETTI et al., 2003). No Brasil, essa espécie é apontada como uma das principais espécies cultivadas, pois é um peixe de fácil manejo, que possui rápido crescimento, e é bastante resistente a altas temperaturas e baixas concentrações de oxigênio dissolvido (FARIA et al., 2001; MATHEUS, 1984; GALLI e TORLONI, 1999). Para cultivo desses animais dois sistemas são bastante comuns: o intensivo onde há uma alta densidade (100 a 200 peixes/m³) e a alimentação se dá através de dietas com altos níveis protéicos acarretando uma alta produtividade (MOHAMMAD, 2006); e o sistema semi-intensivo (1 peixe/m³) onde há a utilização de fertilizantes inorgânicos,

adubos e dietas suplementares para ampliar a produção (MATAKA e KANG'OMBE, 2007).

Os diferentes sistemas de cultivo podem influenciar positivamente ou negativamente os animais, principalmente no que diz respeito à fisiologia digestiva. A habilidade de um organismo para digerir partículas de alimento depende da presença e da quantidade apropriada de enzimas digestivas (SMITH, 1980).

Proteoma é o conjunto de proteínas resultante da expressão gênica, síntese ribossomal e da degradação proteolítica, o que gera informações cruciais para a compreensão do funcionamento celular. Um estudo proteômico é uma importante fonte de informação, pois pode caracterizar tanto quantitativamente quanto qualitativamente a expressão protéica global (ZOLLA, 2008). Com o avanço das tecnologias nas áreas de genômica e proteômica, o estudo da fisiologia dos peixes tem crescido, tornando possível a análise dos efeitos do stress na fisiologia desses animais (PARRINGTON et al., 2002).

Para a avaliação da influência dos sistemas de cultivo sobre as tilápias do Nilo foram analisados os parâmetros de crescimento zootécnicos, as atividades proteolíticas alcalinas totais, tríplicas e de quimotripsina do intestino dos animais submetidos aos dois tipos de cultivo e os perfis proteômicos do intestino e estômago dos animais.

2. Material e Métodos

2.1. Materiais

Todos os reagentes utilizados para os experimentos foram da Merck, GE e Sigma.

2.2. Cultivos

Os cultivos tiveram duração total de 120 dias e foram realizados no período de janeiro a maio de 2011.

Os alevinos utilizados foram provenientes de um fornecedor comercial, localizado na cidade de Paulo Afonso, Bahia. Os mesmos apresentavam um peso médio de 38 g e comprimento total de 12,7 cm (Alevino tipo II). Na chegada, os animais passaram por processo de aclimação e tratamento com cloreto de sódio a 0,8 %, de acordo com Kubtiza (2007). Em seguida, foram transferidos para um viveiro de alvenaria com 100 m², profundidade mínima de 70 cm e máxima de 80 cm. Adotou-se

uma densidade de 40 peixes/m², onde os mesmos passaram oito dias e foram alimentados duas vezes ao dia, com ração a 35% de proteína bruta (PB), a partir de 10% da biomassa. Após esse período, os peixes foram transferidos para os locais de cultivo (povoamento).

2.2.1. Sistemas

2.2.1.1. Semi-intensivo

O cultivo experimental em sistema semi-intensivo foi realizado na estação de Piscicultura UAST/IPA (Unidade Acadêmica de Serra Talhada/Instituto Agrônômico de Pesquisas Agropecuárias) (Sul 7°55'79" - Oeste 38°33'83"). Foram utilizados três viveiros de terra escavados com área de 338 m² e profundidade máxima de um metro, abastecidos por água proveniente do açude Saco.

Antes do início do cultivo, os mesmos passaram pelo processo de preparação, foram esvaziados completamente e expostos por um período de oito dias para desinfecção e mineralização da matéria orgânica. Em seguida foram submetidos ao processo de calagem, utilizando carbonato de cálcio (CaCO³) na proporção de 15 kg/1000 m², após três dias da realização desse processo, foram reabastecidos.

Após atingir cerca de 40 cm de lâmina d'água, os viveiros foram adubados utilizando esterco bovino, na proporção de 1 t/ha. Para esses processos de calagem e adubação, adotou-se a metodologia desenvolvida por Woynarovich & Horváth (1983).

Após preparação dos viveiros, estes foram povoados com a densidade de 1 peixe/m².

2.2.1.2. Sistema Intensivo

O cultivo intensivo foi realizado no Açude Saco em Serra Talhada – PE (Sul 7° 55' 79" - Oeste 38° 33' 83"), utilizando-se três tanques-rede. Foram utilizados três tanques-rede, com dimensões de 2m x 2m x 1,5m, malha de 30 mm, possuindo em seu entorno na parte superior, o comedouro com malha de 3mm. O povoamento desses tanques-rede foi realizado utilizando a densidade de 110 peixe/m³.

2.2.3. Monitoramento dos parâmetros físico-químicos

Diariamente foram analisados os principais parâmetros físico-químicos da água: pH, temperatura (°C), condutividade (µS/cm), oxigênio dissolvido (mg.L-1), utilizando-se um multiparâmetro Hanna®.

2.2.4. Biometria

Antes do povoamento, os peixes passaram por biometria utilizando 30% da população total. No decorrer do cultivo esse procedimento foi realizado mensalmente, sempre nas horas iniciais da manhã, utilizando 10% da população, com balança de precisão 0,5 g e ictiômetro.

Para a realização da biometria os animais eram anestesiados com uma solução anestésica (AQUI-S ®), na proporção de 0,5 ml/L. Após a pesagem e medição, os animais foram submetidos a uma aeração constante, retornando ao estado normal, e em seguida, devolvidos aos respectivos locais de cultivo.

2.2.5. Alimentação

Enquanto os peixes estavam mantidos no viveiro de alvenaria, foram alimentados com ração comercial extrusada com 35% de PB a partir de 10% da biomassa, porém, de acordo com a realização das biometrias, a quantidade e o teor de proteína foi diminuído nos sistemas, adotando a metodologia desenvolvida por Kubitza (2009), para peixes onívoros.

Foram adotados planos nutricionais bifásico e trifásico (Tab. 1), para os cultivos intensivo e semi-intensivo, respectivamente. No primeiro o teor de proteína bruta foi alterado apenas duas vezes durante o cultivo, já no trifásico, a proteína ofertada foi diminuída três vezes de acordo com a realização das biometrias. A composição da ração encontra-se exposta na tabela 2. A alimentação foi realizada na frequência de duas porções em 24 horas.

141 Tabela 1. Plano nutricional adotado para o cultivo de peixes em viveiros e tanques-rede.

Período (Dias)	Plano Nutricional	
	Bifásico (Sistema Intensivo)	Trifásico (Sistema Semi-intensivo)
0-30	35% PB	35% PB
30-60	35% PB	32% PB
60-105	32% PB	28% PB
105-120	32% PB	28% PB

142
143
144 Tabela 2. Composição centesimal das dietas utilizadas para os sistemas de cultivo, a partir da
145 porcentagem de proteína bruta.

Composição	Proteína Bruta		
	35 %	32 %	28 %
Pelete (mm)	3-4	4-6	6-8
Umidade (g/kg)	130	130	130
Proteína bruta (g/kg)	350	320	280
Extrato etéreo (g/kg)	65	50	50
Matéria Fibrosa (g/kg)	50	50	50
Matéria mineral (g/kg)	120	120	120
Cálcio (g/kg)	25	25	25
Cálcio* (g/kg)	15	15	15
Fósforo* (mg/kg)	6.000	6.000	6.000
Vitamina C* (mg/kg)	500	500	50

146 Fonte: Irca – Nutrição Animal. *Valor mínimo

147
148
149 **2.2.6. Cálculos dos parâmetros zootécnicos**

150
151 A partir das biometrias, foram obtidos os cálculos do crescimento zootécnico:
152 peso final, ganho de peso, ganho de peso diário, biomassa, ganho de biomassa,
153 comprimento total, taxa de crescimento específico, fator de conversão alimentar
154 aparente e sobrevivência, a partir das seguintes equações:

- 155
156 - **Peso médio ou peso médio final (PM)**, avaliado a partir da biometria em realização;
157
158 - **Ganho de peso (GP)**, calculado a partir do peso médio final subtraído pelo peso
159 inicial, a partir da equação:

160
$$GP = \text{peso médio final} - \text{peso médio inicial}$$

161

162 - **Ganho de peso diário (GPD)**, encontrado através da relação entre o ganho de peso e a
163 quantidade de dias cultivados:

164
$$GPD = \text{ganho de peso (g)} / \text{tempo (dias)}$$

165

166 - **Biomassa (BIOM)**, determinada através da multiplicação do peso médio e a
167 quantidade de indivíduos:

168
$$BIOM = \text{peso médio} \times \text{quantidade de indivíduos}$$

169

170 - **Ganho de Biomassa (GB)**, determinado pela subtração entre a biomassa final e a
171 biomassa inicial:

172
$$GB = \text{biomassa final} - \text{biomassa inicial}$$

173

174 - **Comprimento Total (CT)**, medido a partir da distância entre o focinho e a nadadeira
175 caudal.

176

177 - **Taxa de crescimento específico (TCE)**, determina o quanto o animal cresceu por dia:

178
$$TCE = 100 (\ln Pf - \ln Pi) / \text{tempo (dias)}$$

179

180 - **Fator de conversão alimentar aparente (FCA)**, determinado pela relação entre a
181 quantidade de ração ofertada e o ganho de biomassa:

182
$$FCA = \text{alimento ofertado (g)} / \text{ganho de biomassa (g)}$$

183

184 - **Sobrevivência (S)**, encontrada pela subtração da quantidade de indivíduos no tempo
185 inicial e final:

186
$$S = 100 * (\text{quantidade de indivíduos inicial} - \text{quantidade de indivíduos final})$$

187

188 **2.2.7 Análises Estatísticas**

189

190 Os dados dos parâmetros zootécnicos foram submetidos ao teste T com P < 0,05,
191 utilizando o programa STATISTICA 7.0.

192

193 **2.3. Obtenção dos animais e extração dos tecidos**

194

195 Após os cultivos três animais de cada viveiro e tanque rede foram coletados e
196 sacrificados segundo Pedrazzani et al. (2007). Foi feita a secção de medula e depois a

sangria branquial. Um corte na altura da linha lateral foi realizado para abrir a “janela” para a retirada do intestino e estômago dos animais. Os órgãos foram congelados em nitrogênio líquido para a posterior extração de proteínas.

2.4. Preparação do extrato bruto e quantificação protéica

Os intestinos foram transportados para o Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Pernambuco. Intestinos de três animais de cada repetição foram homogeneizados com uma solução salina 0,15 M. O homogenato foi centrifugado a 10000 g por 25 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido (extrato bruto) foi coletado e congelado a -20°C para posteriores análises. A dosagem de proteína total foi realizada pela metodologia de Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão protéico.

2.5. Ensaios enzimáticos e análises estatísticas

2.5.1. Atividade proteolítica alcalina total

Em microtubos (triplicatas), azocaseína 1% foi preparada em tampão Tris-HCl 0.1M pH 8.0, esta foi incubada com o extrato bruto do intestino (30 µL) por 60 minutos a 25°C. Após, a reação foi parada utilizando 240 µL de ácido tricloroacético 10%. Após 15 minutos foi realizada uma centrifugação por 8000 xg durante 5 minutos. 70 µL do sobrenadante foi adicionado a NaOH 1 M (130 µL) em uma microplaca e a absorbância foi mensurada a 450 nm. Um branco foi igualmente preparado substituindo apenas o extrato bruto por solução salina 0,15 M (Bezerra et al., 2005).

2.5.2 Atividade de tripsina

As atividades de tripsina foram determinadas utilizando BApNA 8mM (Nα-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide). O extrato bruto do intestino (30 µL) foi incubado com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8.0 (140 µL) e o substrato (30 µL) em uma microplaca. A absorbância foi mensurada a 405 nm e um branco foi similarmente preparado apenas utilizando solução salina 0,15 M no lugar do extrato bruto. Os ensaios foram realizados em triplicata (Bezerra et al., 2005).

233 **2.5.3. Análises estatísticas**

234
235 Os dados das atividades enzimáticas foram submetidos ao teste T. As diferenças
236 foram tidas como significantes quando $P < 0,05$, usando o programa Microcal™
237 Origin™ versão 8.0 (Software, Inc, U.S.).

238
239 **2.6. Extração e quantificação protéica para a proteômica**

240
241 O tecido foi macerado em nitrogênio líquido, alíquotas de macerado são
242 colocadas em eppendorfs e adicionado 1 mL de Trizol (Invitrogen®) para 100 mg de
243 tecido macerado, incuba-se por cinco minutos. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio
244 100%, incuba por 3 minutos. Centrifugou-se a 12000 xg a 4°C por 20 minutos.
245 Desprezou-se o sobrenadante e ao centrifugado adicionou-se 300 µL de etanol 100%
246 gelado, incuba por 3 minutos. Centrifuga a 12000 xg a 4°C por cinco minutos. O
247 sobrenadante foi coletado e a ele adicionado 1 mL de isopropanol 100% gelado e deixou
248 reagir por 10 minutos à temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 12000 xg a
249 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado três vezes, em
250 cada lavagem foi adicionado 1 mL de uma solução de hipoclorito de guanidina e etanol
251 95%, o pellet na solução foi deixado sob agitação por 20 minutos à temperatura
252 ambiente e depois centrifugado à 8000 xg à 4°C por cinco minutos. Após as três
253 lavagens 1 mL de etanol foi adicionado ao pellet, foi feita uma agitação e deixou-se
254 incubar por 20 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 8000 xg à 4°C por 10
255 minutos. O sobrenadante foi descartado e deixou-se o centrifugado secar por 10 minutos
256 à temperatura ambiente. Após, o pellet foi dissolvido com 200µL de SDS 1% e PBS 1X.
257 Depois de dissolvido a amostra foi deixada incubada por duas horas à 50°C em banho
258 maria.

259 A quantificação protéica foi realizada utilizando o 2D Quant Kit (Ge Healthcare)
260 segundo instruções do fabricante. Para a quantificação foi feita uma curva de albumina,
261 as soluções de albumina também foram preparadas seguindo as instruções do kit.

262
263 **2.7. Precipitação das proteínas**

264
265 As proteínas extraídas foram precipitadas usando Ácido Tricloroacético (TCA)
266 20%. A alíquota da amostra necessária para 600 µg segundo a quantificação protéica
267 foi separada. A ela foi adicionado o triplo do volume da alíquota de TCA 20%. Foi

deixado à 4°C por duas horas. Foi centrifugado a 14000 xg por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o centrifugado foi lavado duas vezes com 1 mL de acetona 100% gelada. A cada lavagem após a adição da acetona a amostra foi incubada por 10 minutos e depois centrifugada a 14000 xg por cinco minutos.

2.8. Eletroforeses bidimensionais em géis de Poliacrilamida (2D)

2.8.1. Primeira Dimensão – Focalização Isoelétrica

Após a precipitação das proteínas, foi realizado a ressuspensão em 250 µL de tampão de amostra acrescido de Dithiothreitol (DTT) e 1% de anfólitos (Ge Healthcare). Fitas de 13 cm (Immobiline DryStrip pH 3-10 - Ge Healthcare) foram hidratadas por 16 horas. A focalização isoeletrica foi realizada no *Ettan IPGphor III* (GE Amersham Biosciences) por aproximadamente 6 horas.

2.8.2 Segunda Dimensão – SDS-PAGE

Antes de correr as amostras em um gel SDS-PAGE, as fitas foram equilibradas em um tampão de equilíbrio (Uréia 6 M, Tris-HCl 75 mM pH 8,8, Glicerol 29,3%, SDS 2%, Azul de Bromofenol 0,002%) em duas fases: na primeira com tampão de equilíbrio com adição de 1% de DTT e na segunda com a adição de 2,5% de Iodoacetamida, cada fase com 20 minutos de incubação, sob agitação, à temperatura ambiente. As fitas foram aplicadas acima de um gel de poliacrilamida de 12,5% de concentração, com SDS, de dimensões de 16 cm altura de 18 de largura e 1 mm de espessura. As eletroforeses foram realizadas com a aplicação de duas tensões 15 mA nos primeiros 30 minutos e depois 45 mA até o final da corrida (por gel). A corrida foi realizada com tampão SDS 1X.

Para a coloração, os géis foram submetidos ao processo de coloração de proteínas totais utilizando o reagente azul de coomassie (*Coomassie Brilliant Blue G250*) coloidal. Os géis foram incubados com a solução corante (20% de metanol, 5% de ácido acético e 0,2% de azul de Coomassie) por duas horas, sob agitação e à temperatura ambiente, e descorados com solução descorante (20% de metanol e 5% de ácido acético) por 16 horas sob agitação e também à temperatura ambiente.

2.9. Análise dos géis bidimensionais

Os géis bidimensionais foram submetidos a análises com o software ImageMaster 2D Platinum (Amersham Biosciences) para detecção das diferenças quantitativas e qualitativas das proteínas entre os tratamentos.

3. Resultados

3.1. Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos da água durante o cultivo estão presentes na tabela 3.

A temperatura, salinidade, oxigênio, condutividade e pH foram estatisticamente diferentes nos dois cultivos (Tab. 3).

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos da água, analisados ao decorrer cultivo.

Parâmetros	Sistema	
	Semi-Intensivo	Intensivo
Temperatura (°C)	30,15±2,6 ^a	29,40±1,4 ^b
Salinidade	0,64±0,1 ^a	0,62±0,14 ^b
Oxigênio (mg/L)	6,67±3,4 ^a	8,19±1,9 ^b
pH	7,15±0,4 ^a	8,07±0,2 ^b

*Letras iguais na mesma linha, não apresentam diferença significativa, segundo o teste T, n=120.

3.2. Parâmetros zootécnicos

Os dados dos parâmetros zootécnicos da tilápia do Nilo submetidas aos sistemas de cultivo encontram-se na tabela 4.

O peso médio final foi significativamente maior no sistema intensivo (557,33±157,6 g) do que no sistema semi-intensivo (501,73±76,6 g). Consequentemente, o ganho de peso dos peixes cultivados em tanques-rede foi maior que o dos viveiros (519,33±48,3 g e 463,73±4,4 g, respectivamente). Entretanto, no sistema semi-intensivo há um menor desvio padrão, o que indica uma maior padronização no crescimento (Tab. 4).

O tamanho final, biomassa final, ganho de biomassa e o crescimento específico, para ambos os sistemas de cultivo, apresentaram-se sem diferenças estatísticas (Tab. 4).

332 Com relação aos valores da conversão alimentar o do sistema semi-intensivo
333 apresentou-se significativamente melhor que o do sistema intensivo, (1,4±0,1 e
334 2,81±0,5, respectivamente). A sobrevivência no semi-intensivo (85,40%) foi
335 significativamente maior que no intensivo (69,03%) (Tab. 4).
336
337 Tabela 4. Parâmetros zootécnicos da tilápia do Nilo, submetida aos sistemas de cultivo semi-
338 intensivo e intensivo, ao decorrer de 120 dias.

Parâmetros	Sistemas	
	Semi-intensivo	Intensivo
Peso Médio Final (g)	501,73±76,6 ^a	557,33±157,6 ^b
Ganho de Peso (g)	463,73±4,4 ^a	519,33±48,3 ^a
Ganho de Peso Diário (g)	4,18±0,0 ^a	4,65±0,4 ^a
Tamanho Final (cm)	29,77±1,6 ^a	29,40±2,5 ^a
Biomassa Inicial (kg)	12,84	20,90
Biomassa Final (kg)	139,48±7,5 ^a	120,55±17,6 ^a
Ganho de Biomassa (kg)	126,64±7,5 ^a	99,61±17,6 ^a
Conversão Alimentar	1,4±0,1 ^a	2,81±0,5 ^b
Crescimento Específico (%/dia)	2,15±0,0 ^a	2,24±0,1 ^a
Sobrevivência (%)	85,40 ^a	69,03 ^b

339 *Letras iguais na mesma linha, não apresentam diferença significativa, segundo o teste de T, n=3.
340 Os dados de valores de biomassa inicial e final são para cada viveiro e tanque-rede.

341
342 **3.3. Atividades Proteolíticas**
343

344 As atividades das proteases analisadas podem ser observadas nas figuras 6 e 7.
345 Comparando os dois sistemas de criação pôde-se perceber que as atividades enzimáticas
346 analisadas não apresentaram diferença significativa.

347 O perfil da atividade das proteases alcalinas no decorrer do tempo para os dois
348 sistemas está representado na figura 6, houve uma queda nas atividades tanto nos
349 tanques-rede quanto nos viveiros de forma similar. A figura 6 demonstra a atividade da
350 tripsina. Em 30 dias essa atividade mostrou um aumento. Com 60 dias de cultivo
351 observou-se uma queda na atividade tríptica (Fig. 7). Ao final da criação, com a
352 diminuição das porcentagens protéicas na ração, as enzimas demonstraram uma
353 diminuição em seus valores.

354

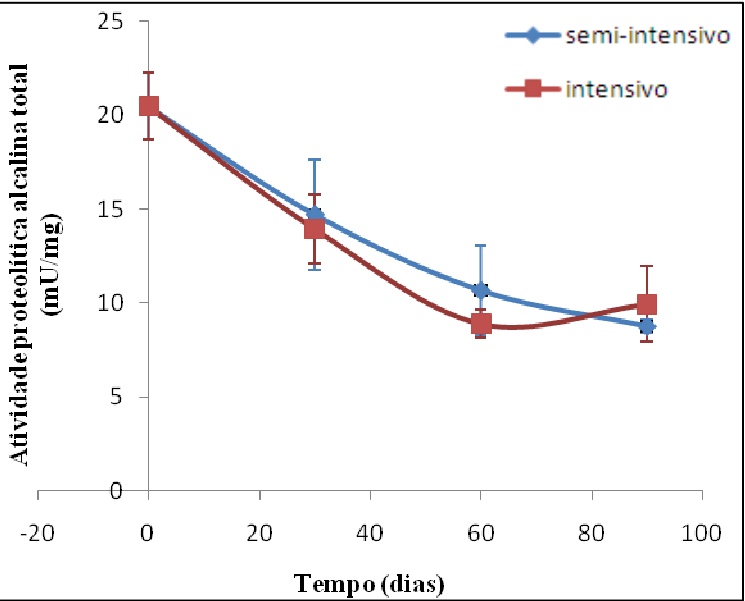


Figura 6: Atividade proteolítica alcalina total do extrato bruto do intestino de tilápia do Nilo cultivada em sistema intensivo e semi-intensivo durante 120 dias, utilizando azocaseína como substrato.

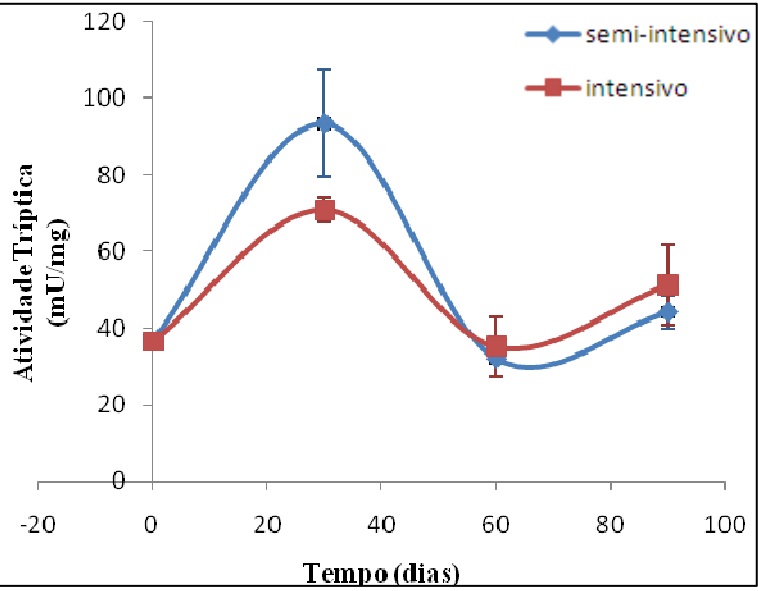


Figura 7: Atividade trípica do extrato bruto do intestino de tilápia do Nilo cultivada em sistema intensivo e semi-intensivo durante 120 dias, utilizando BApNA (N α -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) como substrato.

3.4. Perfis Proteômicos

Os géis obtidos mostraram-se com spots bem definidos sem arrastes (horizontais e verticais) que impossibilitassem a detecção. As proteínas estão distribuídas pela faixa de pH 3-10 e entre os pesos moleculares entre 100 kDa e 10 kDa.

No intestino a comparação do perfil proteômico dos animais cultivados em sistema semi-intensivo (Fig. 8) com os animais cultivados em sistema intensivo (Fig. 9) mostrou um total de 1233 spots sendo 731 diferentes. No estômago houve a detecção de 1067 spots no total mostrando-se 543 spots diferentes na comparação do perfil proteômico dos dois sistemas de cultivo (Fig. 10 e 11).

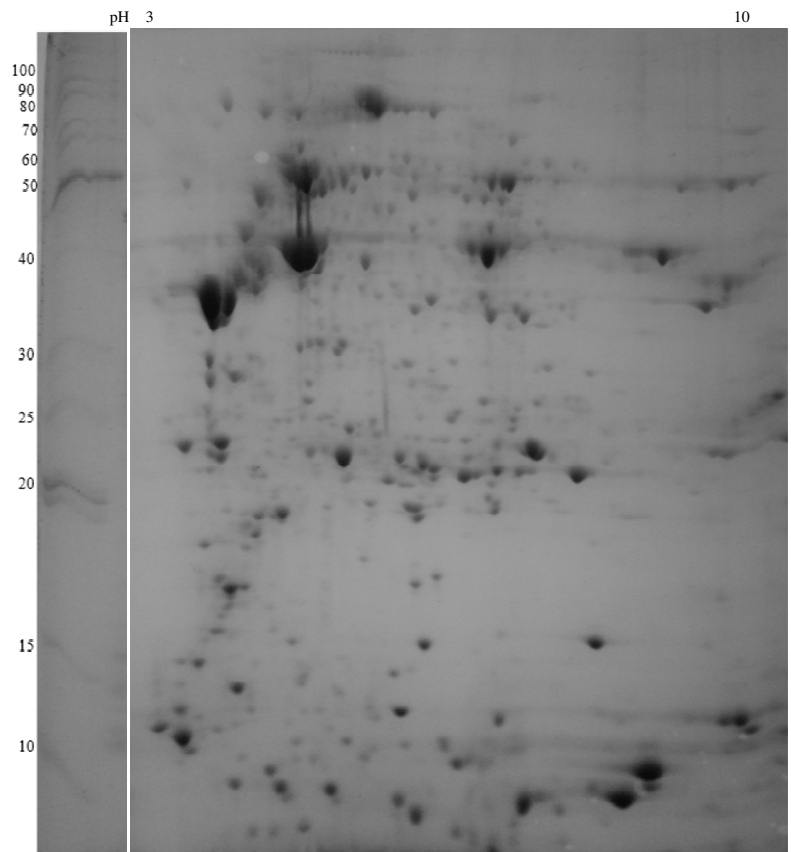


Figura 8: Eletroforese bidimensional do intestino de indivíduos de tilápia do Nilo cultivados em sistema semi-intensivo.

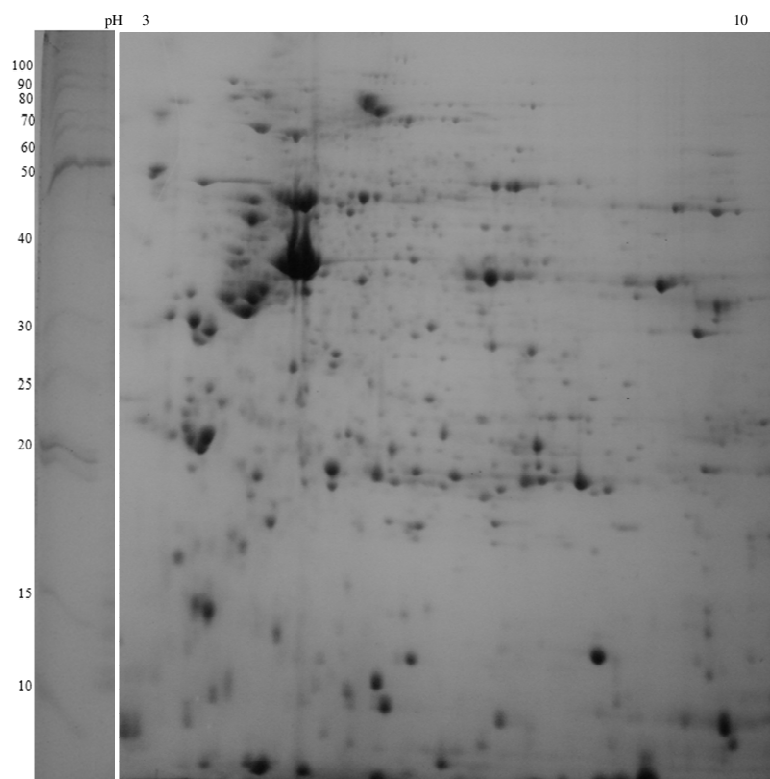


Figura 9: Eletroforese bidimensional do intestino de indivíduos de tilápia do Nilo cultivados em sistema intensivo.

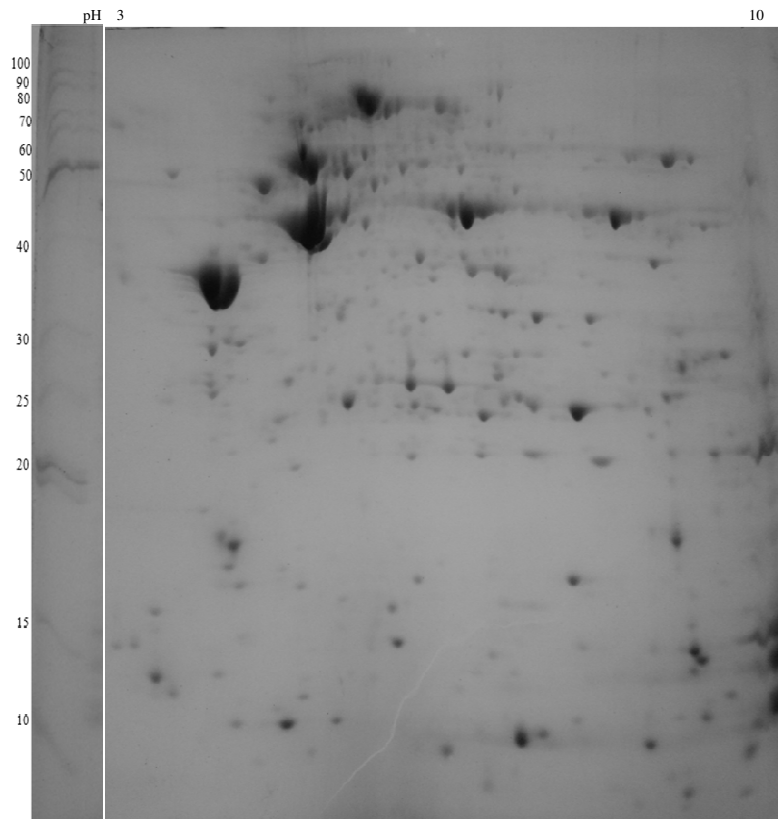


Figura 10: Eletroforese bidimensional do estômago de indivíduos de tilápia do Nilo cultivados em sistema semi-intensivo.

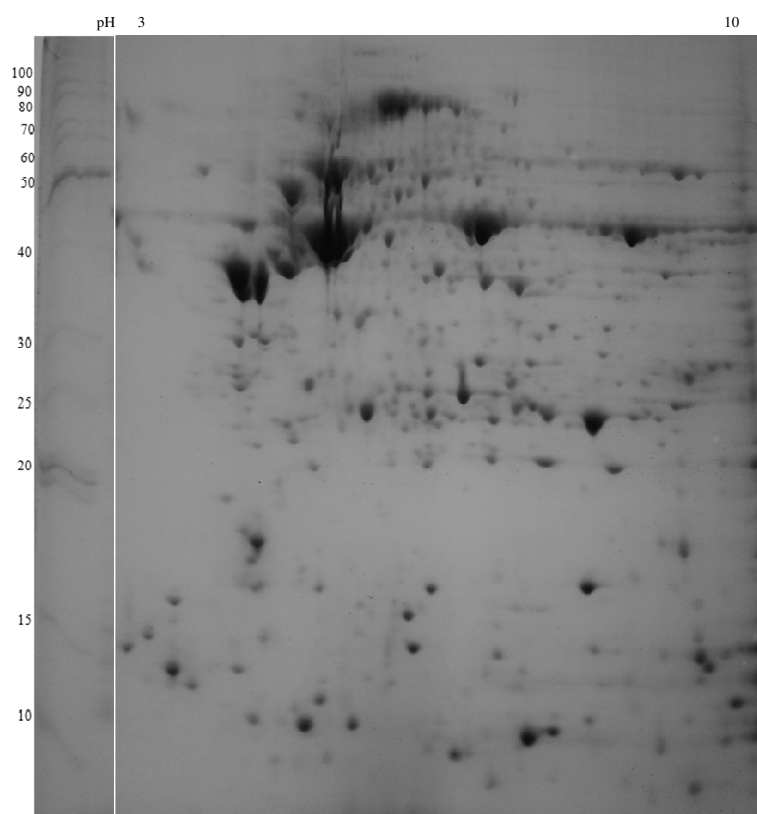


Figura 11: Eletroforese bidimensional do estômago de indivíduos de tilápia do Nilo cultivados em sistema intensivo.

4. Discussão

4.1. Parâmetros físico-químicos e zootécnicos

A média da temperatura da água no sistema semi-intensivo foi de 30,15°C e no intensivo foi de 29,4°C. Quanto às médias de pH foram de 7,15 e 8,07 para os cultivos semi-intensivo e intensivo, respectivamente (Tab. 3). Segundo Kubitza (2011) as tilápias apresentam conforto térmico de 26 a 30°C e o pH ideal deve ser mantido entre 6 a 8,5, o que mostra que as condições de temperatura e pH, do presente trabalho, se mantiveram dentro da faixa ideal.

A salinidade nos viveiros e nos tanques-rede apresentou uma média de 0,64 e 0,62, respectivamente (Tab. 3). Sendo, portanto, considerada uma água doce, segundo as definições da Resolução CONAMA N° 357 (2005). Quanto ao oxigênio dissolvido o sistema semi-intensivo mostrou uma média de 6,67 mg/L e o intensivo de 8,19 mg/L (Tab. 3). A condição mínima ideal de oxigênio dissolvido para o crescimento ótimo em cultivos de tilápia fica em torno de 3mg/L (Boyd e Tucker, 1998).

O peso médio final foi maior para os peixes do cultivo intensivo, porém com um alto desvio padrão. Segundo Caverro et al. (2003) os peixes costumam formar interações comportamentais que levam à produção de peixes com tamanho bastante heterogêneo, assim explicando a grande diferença de peso nos animais do cultivo intensivo.

França (2003), em análise dos parâmetros zootécnicos da tilápia do Nilo ao sistema intensivo, utilizou juvenis com peso inicial de 63,62 g. Neste trabalho o autor obteve, com 96 dias de cultivo, animais com maior peso (607,71g), que o presente trabalho que obteve animais com 557,33 g com 120 dias de cultivo. Tais valores demonstram que é possível uma diminuição da proteína bruta ofertada na ração, já que as tilápias, obtidas por França (2003), estavam com um peso maior em um menor tempo de cultivo.

Relacionando o plano nutricional adotado em cada sistema (Tab. 3), com o peso médio final, pode-se verificar que não houve grandes diferenças, o que pode envolver a disponibilidade de alimento natural nos viveiros. A presença desse alimento natural se mostrou suficiente para suprir os teores de proteína bruta diminuídos no decorrer do cultivo semi-intensivo. Segundo Loures et. al. (2001) o alimento natural é importante e

500 deve ser levado em consideração na determinação da quantidade de ração que será
501 fornecida em um cultivo.

502 Mesmo que a alimentação artificial seja determinante na otimização de um
503 sistema de cultivo, a alimentação natural representa um papel importante tanto na
504 adaptação do animal à ração quanto em suprir as necessidades de proteínas quando a
505 disponibilidade protéica estiver baixa (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001). Segundo
506 Kubitza (2009) o zooplâncton e o fitoplâncton podem contribuir com cerca de 30 a 40%
507 do ganho de peso das tilápias.

508 Quanto ao tamanho final dos animais do sistema semi-intensivo e intensivo não
509 houve diferença estatística (Tab. 4). Porém, segundo El-Sayed (2002), peixes mantidos
510 em altas densidades costumam apresentar menor crescimento.

511 O crescimento específico também não se mostrou estatisticamente diferente
512 entre os dois sistemas. O que pode mostrar que foi alto o nível de reversão sexual dos
513 animais submetidos aos sistemas, em especial os animais do sistema semi-intensivo.
514 França (2003) executou um cultivo intensivo e obteve uma taxa de crescimento
515 específico (2,44%/dia) próxima ao presente trabalho (2,24%/dia).

516 A taxa de conversão alimentar foi estatisticamente diferente para os dois
517 cultivos, se mostrando melhor no cultivo semi-intensivo onde o valor encontrado foi de
518 1,4 kg de ração para a produção de 1 kg de peixe em contrapartida do cultivo intensivo
519 onde para produzir 1 kg de peixe foi necessário utilizar 2,8 kg de ração. Segundo, Sarig
520 e Arieli (1980) o aumento da densidade de estocagem da tilápia piora a conversão
521 alimentar. Como em cultivos de tanque-rede a ração chega a representar 70% do custo
522 total de produção é de grande importância que este insumo seja aproveitado de forma
523 mais eficiente (Jolly e Clonts, 1993; Kubitza e Ono, 2003).

524 Ao que concerne a menor sobrevivência no cultivo intensivo, ela pode ser
525 associada à heterogeneidade no tamanho dos animais deste tipo de cultivo. Moraes
526 (2008) realizou um cultivo intensivo de tilápia do Nilo com 84 dias de duração e obteve
527 uma sobrevivência com aproximadamente 80%. Para Salaro et al. (2003) a
528 heterogeneidade presente em cultivos intensivos pode influenciar na sobrevivência dos
529 animais.

530

531

532

533 4.2. Atividades Proteolíticas

534

535 A digestão protéica em tilápia começa com a hidrólise de proteínas e
 536 polipeptídeos pela ação da pepsina, tripsina e quimotripsina (Fish, 1960; Cockson e
 537 Bourne, 1972; Moriarty, 1973; Fang e Chiou, 1989). Segundo Hsu & Wu (1979) essas
 538 enzimas são as enzimas proteolíticas mais importantes do trato gastrointestinal de
 539 peixes.

540 A ausência de diferença estatística entre as atividades dessas enzimas entre os
 541 cultivos pode ser explicada por um dos fatores que estão presentes no cultivo, a
 542 diminuição dos níveis protéicos na alimentação. Essa diminuição seguiu um mesmo
 543 padrão para os dois tratamentos, ainda no momento em que o cultivo intensivo passou a
 544 receber mais proteína as atividades não se mostraram diferentes, o que pode mostrar que
 545 a alimentação natural do sistema semi-intensivo supriu os níveis protéicos. A queda na
 546 atividade das proteases alcalinas foi de forma similar para os dois sistemas, isto pode ter
 547 ocorrido também pela diminuição das taxas de proteína para ambos os sistemas.

548 Estudos realizados com o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) demonstraram
 549 que a atividade das proteases alcalinas (tripsina e quimotripsina) sofre influência pela
 550 variação da quantidade de proteína, porém essa variação é mais expressiva quando a
 551 composição da dieta é alterada (Lundstedt, et al., 2004).

552 Em torno dos primeiros 30 dias a atividade de tripsina mostrou um aumento, isto
 553 pode ser devido ao maior índice protéico da alimentação artificial quanto da abundância
 554 de alimento natural nos viveiros. Nagase (1964) e Kohla et al. (1992), estudando
 555 *Oreochromis mossambicus* e *Colossoma macropomum*, respectivamente, encontraram
 556 maiores atividades tríplicas correspondentes ao aumento da taxa de alimentação. No
 557 entanto, com 60 dias de cultivo observou-se uma queda, que pode ter ocorrido pelo
 558 reajuste da ração e diminuição de PB nos sistemas.

559 Outro fator que pode ter influenciado nas atividades enzimáticas é a origem dos
 560 substratos. Os substratos para a análise de atividades proteolíticas são provenientes de
 561 mamíferos, essas atividades sem diferença estatística pode evidenciar que as enzimas da
 562 tilápia do Nilo são pouco compatíveis com os substratos.

563 Dentre as espécies onívoras, a tilápia tem se destacado pela elevada capacidade
 564 de utilizar nutrientes de origem vegetal e animal, o que possibilita a elaboração de

565 rações de baixo custo e alto valor nutritivo (Silva et al., 2006). Isto sugere que este
566 animal apresenta um sistema enzimático adaptável a mudanças na alimentação.

567

568 **4.3. Perfil Proteômico**

569

570 Comparando o perfil proteômico do intestino dos animais submetidos aos
571 sistemas foi encontrado um número médio total de 1233 proteínas sendo 731, em média,
572 diferentes. Quanto ao estômago, foi encontrado um número médio menor de proteínas,
573 1067, e dessas 543 mostraram-se diferentes entre os tratamentos. É evidente que a
574 diferença no número de proteínas foi bastante alta.

575 Lucitt (2008) comparou perfis proteômicos de dois diferentes estágios
576 embrionários do peixe-zebra. Utilizando 2D-PAGE, o autor encontrou mais de 660
577 proteínas, sendo 477 proteínas diferentes. Um alto grau de diferença, o que é justificado
578 pelos diferentes estágios embrionários.

579 No presente trabalho o alto número de proteínas diferentes pode ser justificado
580 pela influência que os animais sofreram do ambiente em que estavam expostos. A
581 influência que o ambiente exerce sobre os peixes está presente em vários trabalhos.
582 Burnett (2005) mostra que o sistema imune dos peixes sofreu mudanças quando exposto
583 a toxinas e alterações dos parâmetros físico-químicos da água. Wulff et al., (2008)
584 mostraram os efeitos da anoxia em células cultivadas de *Oncorhynchus mykiss*. Outro
585 estudo observou as influências do clima sobre animais marinhos através de técnicas de
586 proteômica (Piñeiro et al., 2010).

587 Em sistema semi-intensivo há a presença de microorganismos na água. Esses
588 microorganismos além de servirem de alimentação podem formar simbiose com o
589 peixe. Com isso, é possível a existência de proteínas que sejam pertencentes a esses
590 microorganismos presentes no trato digestório, os quais podem não estavar presentes no
591 sistema intensivo.

592 Outro fator de importância é o nível e o tipo de proteína aos quais os animais
593 foram sujeitos. No cultivo intensivo os níveis de PB ofertados na ração foram mais altos
594 que os do sistema semi-intensivo. Além, também, da ingestão de proteínas oriundas de
595 zooplâncton e fitoplâncton que os animais do sistema semi-intensivo ingeriram. Gómez-
596 Requeni (2011) submeteram o peixe-zebra à alimentação não balanceada em apenas um

597 aminoácido, a lisina, e o perfil proteômico de corpo completo mostrou 207 proteínas, no
598 total, sendo 45 significativamente diferentes.

599 Outros fatores podem contribuir para essa diferença, como o stress sofrido por
600 conta da alta densidade a qual os animais do cultivo intensivo foram submetidos.

601

602 **5. Conclusões**

603

604 Com os dados obtidos foi possível observar que os tipos de sistemas de cultivo
605 influenciaram na digestão da tilápia do Nilo. Porém, ainda são necessários estudos
606 futuros para a identificação das proteínas diferentemente expressas evidenciadas nos
607 perfis proteômicos, para saber quais proteínas são influenciadas e com que processo da
608 fisiologia elas estão envolvidas.

609

610 **6. Bibliografia**

611

612 Bezerra, R. S., Lins, E. J. F., Alencar, R. B., Paiva, P. M. G., Chaves, M. E. C., Coelho,
613 L. C. B. B., Carvalho júnior, L. B., 2005. Alkaline proteases from intestine of Nile
614 tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process Biochemistry., v. 40, p. 1829-1834.

615

616 Borghetti, N. R. B.; Ostrensky, A.; Borghetti, J. R. 2003. *Aqüicultura*: Uma visão geral
617 sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: Grupo
618 Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, p.128.

619

620 Boyd, C. E.; Tucker, C. S. 1998. Pond aquaculture water quality management. Boston:
621 Kluwer Academic, p. 700.

622

623 Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of
624 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. Anal.
625 Biochemistry, v. 72, p. 248-254.

626

627 Burnett, K. G. 2005. Impacts of environmental toxicants and natural variables on the
628 immune system of fishes. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, v. 6. p. 231-
629 253.

630

- 631 Carmo, J. L. 2003. Avaliação do crescimento de três linhagens de tilápia *Oreochromis*
632 sp., em sistema semi-intensivo, cultivadas em viveiros. Dissertação de Mestrado –
633 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, p. 62.
- 634
- 635 Cavero, B. A. S.; Pereira-Filho, M.; Roubach, R.; Ituassú, D. R.; Gandra, A. L.;
636 Crescêncio, R. 2003. Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do
637 crescimento de juvenis de pirarucu em ambiente confinado. Pesquisa Agropecuária
638 Brasileira, Brasília, v.38, p.103-107.
- 639
- 640 Cockson, A., Bourne, D. 1972. Enzymes in the digestive tract of two species of
641 euryhaline fish. Comp. Biochemistry Physiology, v. 41, p. 715–718.
- 642
- 643 CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. 2005. Resolução CONAMA Nº
644 357.
- 645
- 646 El-Sayed, A. 2002. Effects of stocking density and feeding levels on growth and feed
647 efficiency of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L.) fry. Aquaculture Research, v. 33, p.
648 621-626.
- 649
- 650 Faria, A. C. E. A., Hayashi, C., Galdioli, E. M. & Soares, C. M. 2001. Farinha de peixe
651 em rações para alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), linhagem
652 tailandesa. Acta Scientiarum, v. 23, p. 903-908.
- 653
- 654 Fang, L. S., Chiou, S. F. 1989. Effect of salinity on the activities of digestive proteases
655 from the tilapia fish, *Oreochromis niloticus* in different culture environments. Comp.
656 Biochem. Physiology, v. 93, p. 439–443.
- 657
- 658 Fish, G.R., 1960. The comparative activity of some digestive enzymes in the alimentary
659 canal of tilapia and perch. Hydrobiology, v. 15, p. 161–178.
- 660
- 661 França, J. M. B. 2003. Crescimento de três linhagens de tilápia *Oreochromis* spp.,
662 cultivadas em tanques-rede. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Rural de
663 Pernambuco, Recife – PE, 69pp.

- 664 Freato, T. A. 2009. Interação entre linhagem e plano nutricional em diferentes sistemas
665 de cultivo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Tese de doutorado apresentada a
666 Universidade Federal de Lavras - Programas de Pós-graduação em Zootecnia, Lavras –
667 Minas Gerais, p. 136.
- 668
- 669 Galli, L. F.; Torloni, C. E. C. 1999. *Criação de peixes*. São Paulo: Livraria Nobel, S. A.
670
- 671 Gómez-Requeni, P.; Vareilles, M.; Kousoulaki, K.; Jordal, A. O.; Conceição, L. E. C.;
672 Rønnestad, I. 2011. Whole body proteome response to a dietary lysine imbalance in
673 zebrafish *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*, v. 6, p. 178–
674 186.
- 675
- 676 Hsu, Y. L.; Wu, J. L. 1979 The relationship between feeding habits and digestive
677 proteases of some freshwater fishes. *Bull. Inst. Zool. Academia Sinica*, v. 18, n. 1, p.
678 45-53.
- 679
- 680 Jolly, C.M.; Clonts. H. A. 1993. *Economics of aquaculture*. Binghamton: The Haworth
681 Press, p. 319.
- 682
- 683 Klomklao, S.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Kishimura, H.; Simpson, B.K. 2007.
684 Purification and characterisation of trypsins from the spleen of skipjack tuna
685 (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry*, v. 100, p. 1580–1589.
- 686
- 687 Kohla, U., Saint-Paul, U., Friebe, J., Wernicke, D., Hilge, V., Braum, E., Gropp, J.
688 1992. Growth, digestive enzyme activities and hepatic glycogen levels in juvenile
689 *Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818, from South America during feeding, starvation
690 and refeeding. *Aquac. Fish. Manag.*, v. 23, p. 189-208.
- 691
- 692 Kubtiza, F. 2011. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. *Acqua &*
693 *Imagem*, 2º ed., Jundiaí – SP, p. 316.
- 694
- 695 Kubtiza, F. 2009. Manejo na produção de peixes: manejo nutricional e alimentar. *Rev.*
696 *Panorama da Aquicultura*, v. 19, p. 14-27.

- 697 Kubitza, F. 2007. A versatilidade do sal na piscicultura. Rev. Panorama da Aquicultura,
698 v. 17, p. 14-23.
699
- 700 Kubitza, F.; Ono, E. A. 2003. Projetos aquícolas: planejamento e avaliação econômica.
701 1. ed. Jundiaí: F. Kubitza. p. 88.
702
- 703 Loures, B. T. R. R.; Ribeiro, R. P.; Vargas, L.; Moreira, H. L. M.; Sussel, R. F.; Povh, J.
704 A.; Cavichiolo, F. 2001. Manejo alimentar de alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis*
705 *niloticus* (L.), associado às variáveis físicas, químicas e biológicas do ambiente. Acta
706 Scientiarum. v. 23, n. 4, p. 877-883.
707
- 708 Lucitt, M. B.; Price, S. P.; Pizarro, A.; Wu, W.; Yocum, A. K.; Seiler, C.; Pack, M.
709 A.; Blair, I. A.; Fitzgerald, G. A.; Grosser, T. (2008) Analysis of the Zebrafish
710 Proteome during Embryonic Development. Mol. Cell Proteomics., v. 5, n. 7, p. 981–
711 994.
712
- 713 Lundstedt, L. M.; Melo, J. F. B.; Moraes, G. 2004. Digestive enzymes and metabolic
714 profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet
715 composition. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, v.137, p. 331-339.
716
- 717 Marengoni, N. G. 2006. Produção de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (linhagem
718 chitralada), cultivada em tanques-rede, sob diferentes densidades de estocagem. Arch.
719 Zootec., v. 55, p. 127-138.
720
- 721 Mataka, L.; Kang'ombe, J. 2007. Effect of substitution of maize with chicken manure in
722 semi-intensive pond culture of *Tilapia rendalli* (Boulenger). Aquaculture Research, v.
723 38, p. 940-946.
724
- 725 Matheus, C. E. Aspectos do crescimento e reprodução de *Sarotherodon niloticus*
726 (tilápias do Nilo) em lagoas de estabilização e sua influência no tratamento biológico.
727 São Carlos, 1984. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de
728 Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.
729

- 730 Mohammad, T. R. 2006. Comparative study of growth performance of three strains of
731 Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, L. at two stocking densities. Aquaculture Research,
732 v. 37, p.172-179.
733
- 734 Moraes, A. M. 2008. Avaliação zootécnica e econômica do cultivo de tilápia do Nilo,
735 *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, considerando diferentes rações comerciais.
736 Tese de doutorado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, p. 51.
737
- 738 Moriarty, D. J. W., 1973. The physiology of digestion of blue-green algae in the cichlid
739 fish, *Tilapia nilotica*. J. Zool., v. 171, p. 25–39.
740
- 741 Nagase, G., 1964. Contribution to physiology of digestion in *Tilapia mossambica*
742 Peters: digestive enzymes and the effects of diets on their activity. Z. Vergl. Physiol. v.
743 49, p. 270–284.
744
- 745 Naylor, R. L.; Goldburg, R. J.; Primavera, J. H.; Kautsky, N.; Beveridge, M. C. M.;
746 Clay, J.; Folke, C.; Lubchenco, J.; Mooney, H.; Troell, M. 2000. Effect of aquaculture
747 on world fish supplies. Nature, London, v.405, n. 6790, p. 1017-1024.
748
- 749 Papoutsoglou, E. S.; Lyndon, A. R. 2006. Digestive enzymes of *Anarhichas minor* and
750 the effect of diet composition on their performance. J. Fish Biol., v. 69, p. 446-460.
751
- 752 Parrington, J.; Coward, K. 2002. Use of emerging genomic and proteomic technologies
753 in fish physiology. Aquatic Living Resource, v. 15, p. 193–196.
754
- 755 Pedrazzani, A. S.; Molento, C. F. M.; Carneiro, P. C. F.; Fernandes De Castilho, M..
756 2007. Senciência e bem estar de peixes: Uma visão de futuro do mercado consumidor.
757 Panorama da Aquicultura, v. 19, p. 24 – 29.
758
- 759 Piñeiro, C.; Cañas, B.; Carrera, M. 2010. The role of proteomics in the study of the
760 influence of climate change on seafood products. Food Research International, v. 43, p.
761 1791-1802.
762

- 763 Ray, A. K. 1988. On the digestive enzymes in three Indian freshwater perches in
764 relation to food and feeding habits. Journal of the Fisheries Society Indonesian, v. 20, p.
765 1-5.
- 766
- 767 Salaro, A. L.; Luz, R. K.; Nogueira, G. C. C. B.; Reis, A.; Sakabe, R.; Lambertucci, D.
768 M. 2003. Diferentes Densidades de Estocagem na Produção de Alevinos de Trairão
769 (*Hoplias cf. lacerdae*). Rev. Bras. Zootec., v. 32, p. 1033-1036.
- 770
- 771 Saraiva, K. A. 2004. Avaliação de densidades de estocagem de alevinos da tilápia
772 *Oreochromis niloticus* (linhagem chitralada) cultivados em gaiola. Dissertação
773 apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura,
774 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife – PE, p. 48.
- 775
- 776 Sarig, S.; Arieli, Y. 1980. Growth capacity of tilapia in intensive culture. Israeli J.
777 Aquac., Bamidgeh, v. 32, n. 3, p. 57-65.
- 778
- 779 Schulz, C., Wickert, M., Kijora, C., Ogunji, J., Rennert, B. 2007. Evaluation of pea
780 protein isolate as alternative protein source in diets for juvenile tilapia (*Oreochromis*
781 *niloticus*). Aquac. Res., v. 38, p. 537-545.
- 782
- 783 Scorvo Filho, J. D.; Pinto, C. S. R. M.; Verani, J. R.; Silva, A. L. 2006. Custo
784 operacional da criação de tilápias vermelha da Florida e tailandesa em tanques-rede de
785 pequeno volume. Informações econômicas, v. 36, p. 71-79.
- 786
- 787 Silva, C. P. 2006. Composição nutricional e análise microbiológica do hidrolisado
788 protéico de subprodutos de camarão da espécie *Litopenaues vannamei*. Dissertação.
789 Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, p. 56.
- 790
- 791 Sipaúba-Tavares, L. H.; Rocha, O. 2001. Produção de plâncton (fitoplâncton e
792 zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. São Carlos: Rima. p. 106.
- 793
- 794 Smith, L. S. 1980. Digestion in teleost fishes. In: Lectures presented at the FAO UNDP
795 Training Course in fish feeding technology, ACDP/ REP/ 80/ 11. p. 3–17.

- 796 Teichert-Coddington, D. R., Popma, T. J, Lovshin, L. L., 1997. Attributes of tropical
797 pond cultured fish. In: Egna, H.S., Boyd, C.E (Eds.), Dynamics of Pond Aquaculture.
798 CRC Press, Boca Raton, USA, p. 183– 198.
799
800 Trewavas, E. 1982. Generic groupings of Tilapiine used in aquaculture. Aquaculture, v.
801 27, p. 79-81.
802
803 Woynarovich, E.; Horváth, L. 1983. A propagação artificial de peixes de águas
804 tropicais: manual de extensão. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, p. 225.
805
806 Wulff, T.; Jessen, F.; Roepstorff, P.; Hoffmann, E. K. 2008. Long term anoxia in
807 rainbow trout investigated by 2-DE and MS/MS. Proteomics, v. 8, p. 1009–1018
808
809 Zolla, L.; Rinalducci, S.; Antonioli, P.; Righetti, P. G. 2008. Proteomics as a
810 Complementary Tool for Identifying Unintended Side Effects Occurring in Transgenic
811 Maize Seeds As a Result of Genetic Modifications. Journal of Proteome Research, v. 7,
812 n.5,p.1850-1861.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mesmo a maioria dos parâmetros zootécnicos não terem se mostrado estatisticamente diferentes entre os cultivos, os dados de conversão alimentar mostraram que o cultivo semi-intensivo obteve peixes com o mesmo ganho de biomassa e com uma menor quantidade de inserção de alimento artificial no sistema. As atividades proteolíticas não se mostraram diferenciadas entre os cultivos, porém os perfis proteômicos (análise mais refinada) mostraram que os dois cultivos influenciaram muito na síntese protéica do trato digestório da tilápia do Nilo.

Análises para identificação das proteínas diferentemente expressas entre os cultivos já foram iniciadas, com esses dados será possível a elucidação exata do tipo de influência que a fisiologia digestiva sofreu pelos sistemas de cultivo.

7. ANEXOS

7.1. NORMAS DA REVISTA – Aquaculture

INTRODUCTION

Types of paper

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere. Articles are expected to contribute new information (e.g. novel methods of analysis with added new insights and impacts) to the knowledge base in the field, not just to confirm previously published work.

Review Articles can cover either narrow disciplinary subjects or broad issues requiring interdisciplinary discussion. They should provide objective critical evaluation of a defined subject. Reviews should not consist solely of a summary of published data. Evaluation of the quality of existing data, the status of knowledge, and the research required to advance knowledge of the subject are essential.

Short Communications are used to communicate results which represent a major breakthrough or startling new discovery and which should therefore be published quickly. They should not be used for preliminary results. Papers must contain sufficient data to establish that the research has achieved reliable and significant results.

Technical Papers should present new methods and procedures for either research methodology or culture-related techniques.

The *Letters to the Editor* section is intended to provide a forum for discussion of aquacultural science emanating from material published in the journal.

Contact details for submission

Papers for consideration should be submitted via the electronic submission system mentioned below to the appropriate Section Editor:

Nutrition:

D.M. Gatlin

The Nutrition Section welcomes high quality research papers presenting novel data as well as original reviews on various aspects of aquatic animal nutrition relevant to aquaculture. Manuscripts addressing the following areas of investigation are encouraged:

- 1) determination of dietary and metabolic requirements for various nutrients by representative aquatic species. Studies may include environmental/stress effects on animal's physiological responses and requirements at different developmental stages;
- 2) evaluation of novel or established feedstuffs as well as feed processing and manufacturing procedures with digestibility and growth trials. Such studies should provide comprehensive specifications of the process or evaluated ingredients including nutrients, potential anti-nutrients, and contaminants;
- 3) comparison of nutrient bioavailability from various ingredients or product forms as well as metabolic kinetics of nutrients, food borne anti-nutrients or toxins;
- 4) identification of key components in natural diets that influence attractability, palatability, metabolism, growth reproduction and/or immunity of cultured organisms;
- 5) optimization of diet formulations and feeding practices;
- 6) characterization of the actions of hormones, cytokines and/or components in intracellular signaling pathway(s) that influence nutrient and/or energy utilization.
- 7) evaluation of diet supplementation strategies to influence animal performance, metabolism, health and/or flesh quality.

Manuscripts concerning other areas of nutrition using novel or advanced methods are also welcome.

Please note that in regard to various diet additives such as probiotics, prebiotics, herbal extracts, etc., a very large number of papers have already been published. Therefore, Aquaculture will not continue to accept manuscripts that present initial and preliminary investigations of such additives. Manuscripts addressing these and other feed additives will be accepted for review only if they are of the highest scientific quality and they represent a significant advance in our knowledge of the mechanisms involved in their metabolism. Manuscripts may also be considered if they present clinical efficacy data generated in large-scale trials and economic cost-benefit analysis of these applications.

Aquaculture Production Science:

B.Costa-Pierce

AQUACULTURE PRODUCTION SCIENCE (PS) is one of 5 sections of the international journal AQUACULTURE dedicated to research on improvements and innovations in aquatic food production. Worldwide dissemination of the results of innovative, globally important, scientific research on production methods for aquatic foods from fish, crustaceans, mollusks, amphibians, and all types of aquatic plants.

Improvement of production systems that results in greater efficiencies of resource usage in aquaculture. Effective applications of technologies and methods of aquaculture production for improved stocking regimes, the use of new species and species assemblages, and research on the efficient and sustainable usage of system space with the objective of minimizing resource usage in aquaculture. Investigations to minimize aquaculture wastes and improve water quality, technologies for nutrient recycling in aquaculture ecosystems, and the synergy of aquaculture and other food production systems using methods such as polyculture and integrated aquaculture.

Physiology and Endocrinology:

E.M. Donaldson

The Physiology and Endocrinology Section welcomes high quality research papers presenting novel data as well as original reviews, on various aspect of the physiology and endocrinology of cultured aquatic animals and plants, providing that their content is relevant to solving aquaculture problems.

Manuscripts submitted to the journal must have a valid hypothesis or objective, clearly state the relevance to aquaculture, have proper experimental design with appropriate controls and utilize appropriate statistical analysis. When a study involves the administration of a pharmaceutical or other commercial product, please use generic or scientific names rather than trade names especially in the Title. The trade name can be mentioned in the Materials and Methods together with an exact description of its composition.

Topics covered by this section include, but are not limited to, physiological and endocrine aspects of:

- Reproductive development including both endocrine and environmental control
- Induced ovulation and spermiation
- Gamete quality, storage and cryopreservation
- Control of sex differentiation
- Physiology and endocrinology of gynogenetic and triploid aquatic organisms
- Physiology and endocrinology of transgenic organisms
- Molecular genetic assessment of physiological processes
- Larval physiology and the ontogeny of endocrine systems
- Malpigmentation
- Metamorphosis, smolting (salmonids) and molting (crustacea)

- Nutritional physiology
- Osmoregulation
- Stress
- Anesthesia, transport, handling
- Physiology of harvest techniques, product quality, flesh quality and pigmentation
- Endocrine and environmental regulation of growth
- Rearing density
- Temperature tolerance
- Disease physiology
- Pollutant physiology and water quality (when directly relevant to aquaculture)
- Respiratory, muscle and exercise physiology of cultured organisms
- Immunology (manuscripts on the physiological effects of probiotics must be of high scientific quality with statistically valid conclusions)

Diseases:

B. Austin

The Diseases Section welcomes high quality research papers presenting novel data as well as original reviews, on various aspect of the diseases of aquatic animals and plants, so long as their content is relevant to solving aquaculture problems.

Please note, however, with respect to the probiotic potential of various bacteria and the antibacterial or immunostimulatory effects of herbal extracts a very large number of papers have already been published. As a result, Aquaculture will not continue to accept manuscripts that present further initial and preliminary investigations of these phenomena. Manuscripts addressing these topics will be accepted for review only if they are of the highest scientific quality and they represent a significant advance in our knowledge of the mechanisms involved. Manuscripts may also be considered if they present clinical efficacy data generated in large-scale trials and economic cost-benefit analysis of these applications.

Genetics:

G. Hulata

The Genetics Section welcomes high-quality research papers presenting novel data, as well as critical reviews, on various aspects of selective breeding, genetics and genomics, so long as the content is relevant to solving aquaculture problems. Please note, however, that Aquaculture will not accept manuscripts dealing with the application of well-

described techniques to yet another species, unless the application solves a biological problem important to aquaculture production. Aquaculture will not accept manuscripts dealing with gene cloning, characterizing of microsatellites, species identification using molecular markers, EST papers with small collections, or mapping papers with a small number of markers, unless the papers also deal with solving a biological problem that is relevant to aquaculture production. Where appropriate, linkage maps should include co-dominant markers, such as microsatellite DNA and SNP markers, to enable application to other populations and facilitate comparative mapping. Aquaculture will not accept manuscripts focusing mainly on population genetics studies that are based on RAPD and AFLP markers, since the dominance and multilocus nature of the fingerprints are not suitable for making inferences about population genetic diversity and structure. There may be other journals that are more suitable for manuscripts not meeting these requirements.

Sustainability and Society:

D.C. Little

The Sustainability and Society section of the journal Aquaculture invites articles at the interface of natural and social sciences that address the broader roles of aquaculture in global food security and trade. Aims and scope of the Sustainability and Society section are the: global dissemination of interdisciplinary knowledge regarding the management of aquatic resources and resulting impacts on people. Interconnections with other sectors of food production; resource management and implications for societal impact. Going beyond a narrow techno-centric focus, towards more holistic analyses of aquaculture within well-defined contexts. Enquiry based on understanding trajectories of change amid the global challenges of climate change and food security. Mixed methods and approaches that incorporate and integrate both social and natural sciences. Relevance for the diverse range of policy makers, practitioners and other stakeholders involved. Articles that take a value chain approach, rather than being wholly production orientated, are encouraged.

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm;

Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit

<http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Authors should avoid responding by messages received from the system using the 'Reply' button on their e-mail message; this will send the message to the system support and not to the editorial office, and will create unnecessary load of sorting out and forwarding. Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/aqua/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix,

Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double

name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should be not longer than 400 words.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 4-6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information. 1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. 2. All biota (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. 3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified. 4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below. Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- GenBank: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI)
(GenBank ID: BA123456)
- PDB: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- CCDC: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- TAIR: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- NCT: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- MINT: Molecular INteractions database (MINT ID: 6166710)
- MI: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- UniProt: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.**

Note that in the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article. Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank

accession no. **AA361117**"). Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below). Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below). Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺ and not Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ¹⁸O. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g., phosphate as P₂O₅).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. Further, high-resolution graphics files must be provided separately whether or not the graphics are embedded. See further under Electronic artwork.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a

substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown' *List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal Abbreviations Source

Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Linking to and depositing data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: doi:10.1016/0016-7037(95)00105-9. Please use

PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions

- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.