

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA

KATTIA APARECIDA WEILER

Farelo de girassol em dietas com e sem suplementação de fitase para juvenis de
jundiá (*Rhamdia quelen*)

Toledo

2016

KATTIA APARECIDA WEILER

Farelo de girassol em dietas com e sem suplementação de fitase para juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Altevir Signor

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Edvaldo Pezzato

Toledo

2016

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Weiler, Kátia Aparecida

Farelo de girassol em dietas com e sem suplementação de fitase para juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) / Kátia Aparecida Weiler; orientador(a), Altevir Signor; coorientador(a), Luiz Edvaldo Pezzato, 2016.
29 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2016.

1. Inclusion. 2. Nutrition. 3. *Rhamdia quelen*. 4. Hematology. I. Signor, Altevir . II. Pezzato, Luiz Edvaldo. III. Título.

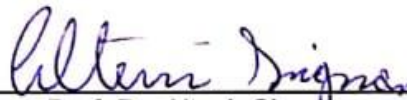
FOLHA DE APROVAÇÃO

KATTIA APARECIDA WEILER

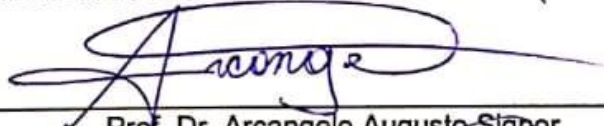
"Farelo de girassol em dietas com e sem suplementação de fitase para juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*)"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Mestrado e Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

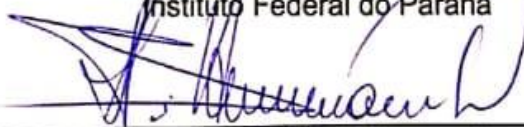
COMISSÃO EXAMINADORA



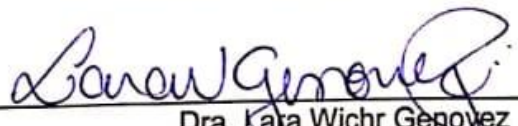
Prof. Dr. Altevir Signor
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)



Prof. Dr. Arcangelo Augusto Signor
Instituto Federal do Paraná



Prof. Dr. Fábio Bittencourt
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Dra. Lara Wichr Genovez
Universidade Estadual do Oeste do Paraná PNPd/PREP

Aprovada em: 07 de junho de 2016, 14h.
Local de defesa: Gemaq – UNIOESTE/Campus de Toledo.

DEDICATORIA

Á Deus e meus anjos da guarda;

Aos meus pais (Nestor Weiler e Lucia Antonieta Weiler), por acreditar e confiar na minha capacidade, apoio, amor, dedicação e esforço;

A minha amiga/irmã Juliana Alexandre da Silva e família, pelo amor, amizade e ajuda;

Aos meus sobrinhos (Rubens Weiler e Rubia Weiler), meu irmão (Rubis Weiler) e cunhada (Cintia Moura Weiler); pela compreensão, apoio e amor;

Ao meu namorado (Geremias Detoni) pelo apoio e compreensão;

E aos amigos Marinheiro e Seu Zé.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Altevir Signor pela oportunidade, ensinamentos, incentivo, amizade e compreensão das minhas dificuldades.

Ao Co-orientador Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, pela atenção, apoio durante a realização deste trabalho;

Ao professor Dr. Aldi Feiden e Dr. Wilson Boscolo por todo o auxílio, orientações e experiências transmitidas;

Ao professor Dr. Fábio Bittencourt pelo acolhimento, apoio no Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura – GEMaQ, contribuição no trabalho e na formação profissional;

A todos colegas e amigos do GEMaQ (Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura) que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento do trabalho e amizade, em especial, Milena Sanchez, Mariana Lins, Deividy Miranda, Sandra Anschau, Evandro Billa, Gracie Kelly Goldinho e Jhonis Pessini;

Ao programa de pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca da Unioeste/*Campus* Toledo, e a todos os funcionários;

Ao InPAA (Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste *Campus* Toledo-PR onde foi realizado o experimento.

Aos amigos queridos pela amizade e apoio, Jonathan Siqueira, Fabiana Machado, Evelin Teixeira, Angélica Dorigon Lira e Seu Antônio;

E aos demais que não citei que estiveram comigo nessa caminhada.

*“Você escolhe, elege, atrai, busca, expulsa, modifica
tudo aquilo que te rodeia.
Teus pensamentos e vontades são a chave de teus atos e atitudes.
São as fontes de atração e repulsão na jornada da tua vida.
Não reclame nem se faça de vítima. Antes de tudo, analise e observa.
A mudança está em tuas mãos.
Reprograma tua meta, busca o bem e você viverá melhor.
Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

(Chico Xavier)

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica *Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB)*. Disponível em: <<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab>>
Fator de impacto 0,756.

**FARELO DE GIRASSOL EM DIETAS COM E SEM
SUPLEMENTAÇÃO DE FITASE PARA JUVENIS DE JUNDIÁ *Rhamdia
quelen***

RESUMO: Esse estudo objetivou avaliar o desempenho produtivo, perfil hematológico e composição centesimal de jundiás alimentados com dietas contendo 0, 10 e 20% de farelo de girassol, suplementadas ou não com fitase (1.500 FTU Kg⁻¹). Utilizou-se 360 juvenis de jundiá (15,77 ± 0,56 g), distribuídos aleatoriamente em 24 tanques (1 m³), alocados em tanque de alvenaria (200 m³). Durante 90 dias os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia e, após período experimental, foram anestesiados e tiveram o sangue coletado e as medidas de peso e comprimento mensuradas para posterior avaliação dos parâmetros hematológicos e de desempenho produtivo. Os dados foram submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey (5%). Não foram observados efeitos isolados dos tratamentos, exceto para a variável de ganho de peso que foi inferior em peixes alimentados com 10% de farelo de girassol, não suplementados com fitase. Os parâmetros hematológicos não apresentaram diferença para série vermelha, entretanto observou-se linfócitose e uma monocitopenia em todos os tratamentos. As dietas experimentais não influenciaram a morfologia intestinal dos peixes, bem como a suplementação de fitase não alterou a absorção dos nutrientes pelos animais. A composição da carcaça dos jundiás não foi influenciada pelas dietas. Concluiu-se que 20% de farelo de girassol na dieta, não causam alterações no desempenho produtivo, na hematologia e composição centesimal de jundiás, já o nível de 10% de inclusão do farelo pode ser recomenda com a presença da fitase (1.500 FTU Kg⁻¹).

Palavras-chave: Inclusão, Nutrição, *Rhamdia quelen*, Hematologia, Desempenho produtivo

**SUNFLOWER MEAL IN DIETS WITH AND WITHOUT PHYTASE
SUPPLEMENTATION FOR JUVENILE SILVER CATFISH *Rhamdia
quelen***

Abstract: This study aimed evaluate growth performance, hematology parameters and proximate composition of silver catfish fed with diets containing 0, 10 and 20% of sun flower meal with or without phytase supplementation (1,500 FTU kg). 360 finger ling silver catfish (15.77 ± 0.56 g) were randomized distributed in 24 aquarium (1m^3) allocated in masonry tank. The fish were fed for 90 days period with diets by four times a day. At the end of experimental period the fish were anesthetized with benzocaine (100 mg L^{-1}) for evaluation of growth performance and hematology parameters. The data were submitted the variance analysis and when significance differences were observed he Tukey test was applied. There were no isolate effects of the treatments except for the weight gain that is lower in fish feed with 10% sunflower meal without phytase supplement. The hematological parameters showed no difference for red series but showed lymphocytosis and amonocytopenia in all treatments. The carcass composition of silver catfish is not differing. It was concluded that 20% of sun flower meal in the diet do not cause changes in the productive performance, hematology parameter sand chemical composition of silver catfish and the level of 10% of inclusion of sun flower meal can be recommended with supplementation no fphytase ($1,500\text{ FTU kg}^{-1}$).

Keywords: Inclusion, Nutrition, *Rhamdia quelen*, Hematology, Productive performance.

Sumário

1. OBJETIVOS	12
1.1 OBJETIVOS GERAL	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2. INTRODUÇÃO	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÃO.....	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. OBJETIVOS

1.1 *Objetivos geral*

✓ Avaliar o desempenho produtivo, as variáveis hematológicas e a composição centesimal de jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de farelo de girassol, suplementadas ou não com fitase (1.500 FTU kg⁻¹).

1.2 *Objetivos Específicos*

✓ Determinar os índices de ganho de peso, conversão alimentar aparente, taxa de eficiência proteica, sobrevivência;

✓ Verificar a influência da inclusão do farelo de girassol nas dietas suplementadas ou não com fitase para jundiás *Rhamdia quelen* no desempenho zootécnico, índices hematológicos e índices hepatossomáticos;

✓ Avaliar a influência da inclusão do farelo de girassol nas dietas suplementadas ou não com fitase sobre a morfometria intestinal de jundiás *Rhamdia quelen*.

Farelo de girassol em dietas com e sem suplementação de fitase para juvenis de jundiá *Rhamdia quelen*

2. Introdução

O crescimento acelerado da produção piscícola tem conduzido várias pesquisas, sendo estas desenvolvidas com o âmbito de viabilizar menores custos de produção e redução do impacto ambiental. Dentre os inúmeros fatores que envolvem o sistema de criação de peixes, os custos homéricos estão agregados a alimentação, onde a indústria de rações objetiva a produção de dietas de boa qualidade e com mínimo custo (Sanchez et al., 2016).

Segundo Golçalvez et al. (2005), dieta balanceado pode permitir um desempenho ótimo do animal durante todos seus estágios de vida, potencializando o sistema imunológico e a homeostase. Uma ração equilibrada deve conter aminoácidos essenciais, carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e sais minerais. Entre as fontes protéticas buscam-se alternativas para substituição das fontes origem animal por fontes de origem vegetal, entre estas se destacam o farelo de canola, farelo de soja, sorgo e farelo de girassol.

O girassol está inserido nesse cenário, pois apresenta potencial para a produção de energia renovável no Brasil, então com o aumento da produção de biodiesel haverá quantidades significativas desse coproduto para alimentação animal (Lopes et al., 2009). Por outro lado, a substituição de ingredientes de produtos de origem animal pelos de origem vegetal podem ser limitadas pela presença de fatores antinutricionais e parâmetros aminocídicos, podendo afetar a utilização de coprodutos como o farelo de girassol na indústria de ração como fonte alternativa (Veiverberg et al., 2008).

Em fontes de origem vegetal pode se considerar como fatores antinutricionais a presença de fitato (ácido fítico), forma em que o fósforo é encontrado nas células vegetais, e que conseqüentemente reduz sua disponibilidade e a de outros nutrientes da dieta (Cyrino et al., 2010). No entanto, esse quadro pode ser revertido, uma vez que, a disponibilidade de

fósforo e dos nutrientes presentes na dieta pode ser melhorada com a suplementação da enzima fitase (Fortes-Silva et al., 2011).

Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar o desempenho produtivo, as variáveis hematológicas e a composição centesimal de Jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de farelo de girassol, suplementadas ou não com fitase (1.500 FTU kg⁻¹).

3. Material e Métodos

Foram confeccionadas seis dietas experimentais de modo a conter 0, 10 e 20% de inclusão de farelo de girassol, suplementadas ou não com fitase (1.500 FTU kg⁻¹) (Tabela 1). Para a elaboração das dietas, os ingredientes foram moídos em um moinho tipo martelo com peneira de 0,5 mm de diâmetro, pesados, misturados manualmente e submetidos ao processo de extrusão (ExtrusoraEx-Micro®), secas em estufa de ventilação forçada por 48 horas, a 55°C e armazenadas sobre refrigeração (4°C). Durante o processo de mistura dos ingredientes, a fitase (BASF -Natuphos®, produzida a partir do fungo *Aspergillus niger*) foi adicionada as rações em forma de grânulos de acordo com Rocha et al. (2007).

Tabela 1. Composição percentual, calculada e determinada dos nutrientes e energia das dietas experimentais.

Níveis de Inclusão F. de Girassol	0%	10%	20%	0%	10%	20%
	Sem Fitase			Com Fitase		
Alimentos						
Farelo de soja 42%	47,10	41,05	35,00	47,10	41,05	35,00
Farelo de girassol	0,00	10,00	20,00	0,00	10,00	20,00
Milho grão	35,15	30,66	26,16	35,15	30,66	26,16
Farinha de peixe	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Suplemento mineral e vitamínico ¹	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
L-treonina	0,41	0,39	0,38	0,41	0,39	0,38
DL-metionina	0,35	0,30	0,24	0,35	0,30	0,24
Cloreto de Colina	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Vitamina C	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Propionato de cálcio	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Butilhidroxi tolueno	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Oléo de Soja	0	0,95	1,89	0	0,95	1,89

Lisina	0,68	0,34	0,00	0,68	0,34	0,00
FitaseBASF –Natuphos	0,00	0,00	0,00	0,015	0,015	0,015
Sal	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Nutrientes Calculados						
Amido	27,86	24,29	20,73	27,86	24,29	20,73
Cálcio	0,83	0,85	0,87	0,83	0,85	0,87
Energia Digestível (Kcal Kg ⁻¹)	3400	3400	3400	3400	3400	3400
Fósforo Disponível	0,48	0,46	0,45	0,48	0,46	0,45
Gordura	5,34	6,51	7,68	5,34	6,51	7,68
Lisina total	2,58	2,25	1,93	2,58	2,25	1,93
Metionina +cistina	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46	1,46
Proteína Digestível	27,70	27,34	26,98	27,70	27,34	26,98
Proteína Bruta	34,00	34,00	34,00	34,00	34,00	34,00
Treonina	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73
Triptofano	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Nutrientes Determinados						
Umidade (%)	9,69	8,60	8,39	7,80	8,49	8,13
Extrato Etéreo (%)	2,25	3,24	3,87	2,27	3,12	3,32
Proteína Bruta (%)	39,39	36,63	37,63	40,81	36,81	38,04
Fibra Bruta (%)	4,81	6,64	8,97	4,75	5,88	8,47
Composição Nutricional do Farelo de Girassol						
Umidade (%)	Extrato Etéreo (%)		Proteína Bruta (%)		Fibra Bruta (%)	
9,57	0,10		41,98		3,786	

¹Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A, 1.750.000UI; Vit. D3, 375.000UI; Vit. E, 20.000UI; Vit. K3, 500mg; Vit. B1, 2.000mg; Vit. B2, 2.500mg; Vit. B6, 2.500mg; Vit. B12, 5.000mg; Ác. Fólico, 625mg; Pantotenato Ca, 7.500mg; Vit. C, 37.500mg; Biotina, 50mg; Inositol, 12.500mg; Niacina, 8.750mg; Colina, 100.000mg; Co, 50mg; Cu, 1.250mg; Fe, 15.000mg; I, 100mg; Mn, 3.750mg; Se, 75mg; Zn, 17.500mg.

Os procedimentos experimentais adotados na pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais – CEUA, sob o protocolo número 63/14. O período experimental teve duração de 97 dias, sendo sete, destinados à adaptação dos peixes as dietas experimentais.

Adotou-se delineamento inteiramente ao acaso, constituído por três níveis crescentes de inclusão de farelo de girassol (0%, 10% e 20%) suplementados ou não com fitase, compondo seis tratamentos com quatro repetições cada. Para isso, foram utilizados 24 tanques-rede de 1 m³ dispostos em um viveiro de alvenaria de 200 m³, sendo as unidades experimentais compostas de 15 peixes por tanque. Utilizou-se no total, 360 juvenis de jundiá com peso médio inicial de 15,77±0,56 g e comprimento total médio de 12,97±1,66.

Durante o experimento as variáveis físico-químicas mensuradas semanalmente foram, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, com o auxílio de uma sonda multi-parâmetro (YSI Professional Plus 6050000, YSI Incorporated 1725 Brannum Lane Yellow Springs, OH, USA), enquanto que, a temperatura da água foi aferida diariamente pela manhã e tarde, por meio de termômetro de bulbo de mercúrio.

Ao final do período experimental os peixes permaneceram em jejum por 24 horas e, posteriormente, foram anestesiados pela adição de benzocaína na água, na concentração de 100 mg.L^{-1} e, posteriormente tiveram seu peso e comprimento mensurados para o cálculo das variáveis de desempenho produtivo: Sobrevivência (SO); Ganho em Peso (GP) = Peso Final – Peso Inicial; Taxa de Crescimento Específico (TCE) = $((\text{LN}(\text{Peso Final}) - \text{LN}(\text{Peso Inicial}))/\text{Tempo}) \times 100$; Conversão Alimentar Aparente (CAA) = Consumo de Ração / Ganho de Peso; Taxa de Eficiência Proteica (TEP) = Proteína consumida/ganho em peso.

Para a avaliação dos índices hematológicos, três peixes por repetição foram anestesiados com benzocaína na concentração de 100 mg.L^{-1} e tiveram seu sangue colhido por meio de punção do vaso caudal, com uso de seringas e agulhas umedecidas internamente com EDTA a 3%. Posteriormente foram determinados o percentual de micro-hematócitos, os níveis de hemoglobina e contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer (Ranzani-Paiva et al., 2013). De posse desses dados, calculou-se o volume corpuscular médio ($\text{VCM} = \text{Ht} \times 10/\text{Er}$) e a concentração de hemoglobina corpuscular média ($\text{CHCM} = \text{Hb} \times 100/\text{Ht}$) segundo (Ranzani-Paiva et al., 2013).

A contagem dos leucócitos e trombócitos totais, bem como a diferenciação dos leucócitos em linfócitos, neutrófilos, monócitos, CGE (Célula Granulocítica Especial) e linfócitos imaturos (células de defesa), foram realizadas a partir de extensões sanguíneas (Ranzani-Paiva et al., 2013). A leitura foi realizada em microscópio utilizando-se aumento de 100x.

Os leucócitos e trombócitos foram contabilizados pelo método indireto (Martins et al.2004): Leucócitos totais (μL) = [(número de leucócitos contados na extensão \times número de eritrócitos em câmara de Neubauer)/2000]; e Trombócitos totais (μL) = [(número de trombócitos contados na extensão \times número de eritrócitos em câmara de Neubauer)/ 2000]. Para o diferencial foram contadas 100 células, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular de interesse.

Após a coleta sanguínea os peixes foram eutanasiados com superdosagem de benzocaína (200 mg.L^{-1}) e posteriormente eviscerados para retirada e pesagem do fígado e gordura visceral. A partir do peso do fígado e da gordura visceral calcularam-se os índices somáticos: IGVS (%) – Índice de Gordura Víscero Somática: ((peso da gordura visceral / peso do corpo) \times 100)) e IHS (%) – Índice Hepatossomático ((peso do fígado / peso do corpo) \times 100)).

Para a análise de histologia das vilosidades intestinais foram colhidas porções do intestino médio dos peixes, fixadas em solução de alfac por seis horas e lavadas e conservadas com álcool 70% para retirada do fixador. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, clarificados em xilol e embebidos em parafina para obtenção de cortes histológicos. Os cortes de intestinos em parafina foram cortados em secções de $7 \mu\text{m}$ e fixados em lâmina, coradas por técnica de (HE) e (PAS + alcian blue (AB)) para análise histoquímica. As amostras foram analisadas em microscopia de luz, equipado com câmera, aonde foram medidas a altura e altura total das vilosidades (distância do ápice das vilosidades até o início da camada muscular e do ápice das vilosidades até o término da serosa, respectivamente) e largura das vilosidades e espessura do epitélio.

Em seguida a evisceração, as carcaças dos peixes foram congeladas para a determinação da composição centesimal. As análises físico-químicas observadas foram umidade, matéria mineral, proteína bruta e extrato etéreo, descritas pela AOAC (2000). As

carcaças de mais três peixes por tratamento foram congeladas para a determinação da composição de minerais nos ossos, aonde, o osso submandibular da cabeça e todos os ossos da coluna vertebral foram moídos e desengordurados por meio de éter de petróleo para análise da retenção de cálcio e fósforo nos ossos segundo Furuya et al., (2001).

Os dados obtidos para as variáveis de desempenho produtivo foram submetidos aos testes de homogeneidade, normalidade e análise de variância em esquema fatorial (Two Way) e, as médias quando significativas comparadas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Já, os índices somáticos, hematimétricos e composição centesimal da carcaça dos peixes, foram submetidos aos testes de homogeneidade, normalidade e análise de variância e, as médias quando significativas comparadas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Statistica 7.1®.

4. Resultados e Discussão

Os valores médios das variáveis físico-químicos da água foram: $25,50 \pm 0,72^\circ\text{C}$; $8,27 \pm 0,31$; $7,99 \pm 1,15 \text{mgL}^{-1}$ e $41,95 \pm 3,28 \mu\text{S cm}^{-1}$, para temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, respectivamente, e encontram-se na faixa ótima para o cultivo da espécie (Gomes et al., 2000).

Não foi observado efeito de interação para os fatores avaliados como, níveis de inclusão de farelo de girassol e presença ou ausência de fitase sobre as variáveis de desempenho produtivo avaliadas. Contudo, notaram-se melhor GP dos peixes alimentados com dietas ausentes de farelo de girassol, suplementadas com fitase e com dietas contendo 20% de inclusão do farelo, sem fitase, quando comparados ao nível de 10% de inclusão, sem a suplementação da enzima. No entanto, o GP desses níveis foram iguais aos demais tratamentos e podem ser observados na Figura 1 (A).

Menor CAA foi apresentada pelos peixes alimentados com 20% de inclusão de farelo de girassol, sem fitase, quando comparado aos peixes alimentados com dietas contendo 10%

de inclusão, suplementadas com a enzima (Figura 1 (B)). Peixes alimentados com 20% de inclusão do farelo, sem fitase, também apresentaram maior TEP, quando comparado aos peixes alimentados com 10% de inclusão do farelo, suplementados com fitase (Figura 2 (C)). Toda via, também apresentaram maior SO quando comparado aos que receberam dieta sem farelo, suplementados com fitase, porém esses tratamentos não diferiram dos demais (Figura 2 (D)).

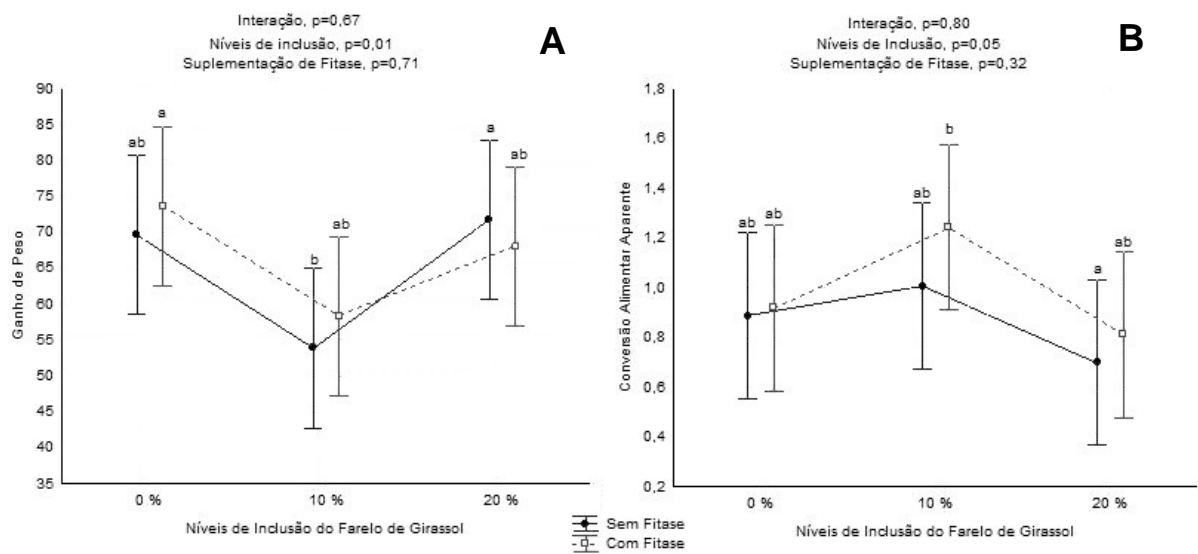


Figura 1. (A) Ganho de Peso (g) e (B) Conversão Alimentar Aparente de Jundiás mantidos em tanques-rede, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de farelo de girassol, com e sem a suplementação de fitase. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os níveis de inclusão de girassol pelo teste de Duncan ($p<0.05$).

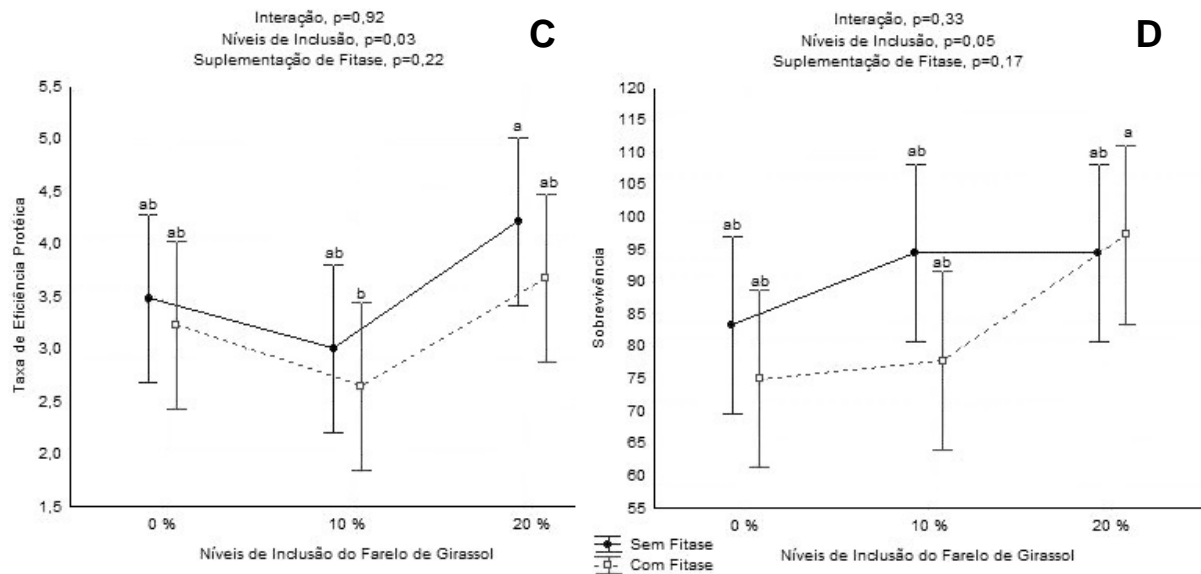


Figura 2. (C) Taxa de Eficiência Protéica (%) e (D) Sobrevivência (%) de Jundiás mantidos em tanques-rede, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de farelo de girassol, com e sem a suplementadas de fitase. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os níveis de inclusão do farelo de girassol pelo teste de Duncan ($p<0,05$).

Outras variáveis avaliadas no desempenho produtivo, como CR, TCE, IHS e IGVS, não apresentaram diferenças (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios de CR, TCE, IHS e IGVS de jundiás alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de farelo de girassol, suplementadas ou não com fitase.

Variáveis	Nível inclusão de Girassol					
	Sem fitase			Com fitase		
	0%	10%	20%	0%	10%	20%
CR (g) ¹	61,52 ± 16,74	52,52 ± 3,28	50,11 ± 2,44	67,62 ± 8,4	68,36 ± 14,9	54,26 ± 2,0
TCE (%) ²	1,52 ± 0,18	1,43 ± 0,16	1,66 ± 0,08	1,47 ± 0,12	1,30 ± 0,34	1,62 ± 0,12
IHS (%) ³	2,03 ± 0,36	1,66 ± 0,60	1,65 ± 0,64	2,02 ± 0,74	1,78 ± 0,43	1,49 ± 0,63
IGVS (%) ⁴	0,91 ± 0,53	0,92 ± 0,44	0,96 ± 0,74	1,60 ± 1,12	1,36 ± 1,01	1,24 ± 0,85

ANOVA: 5% de significância. Valores expressos como média ± desvio padrão. ¹CR: Consumo de Ração; ²TCE: Taxa de Crescimento Específico; ³IHS: Índice Hepatosomático; ⁴IGVS: Índice Gordura Viscerosomática.

Peixes alimentados com 10% de inclusão do farelo de girassol nas dietas apresentaram menor GP, maior CAA e menor TEP, quando comparado aos níveis de 0 e 20% de inclusão do farelo, que não diferiram entre si. Essa redução nas variáveis de desempenho produtivo em níveis intermediários também foi evidenciada por Lira (2014), que ao utilizar 0,0, 3,75, 7,50, 11,25 e 15% do farelo de girassol na dieta de juvenis de tilápia observou uma redução do GP, e do CR dos peixes nos níveis intermediários (7,50 e 11,25). Porém, nesse caso pode estar associada à dificuldade de se controlar a mortalidade em cultivos de tanques-rede.

Por outro lado, evidenciou-se que a inclusão de até 20% de farelo de girassol em dietas não compromete o desempenho produtivo e SO dos peixes. Indicando que o alto teor de fibras, proporção de proteína, perfil de aminoácidos e fatores antinutricionais do farelo de girassol utilizados foram contornados no processamento (Bergamin et al., 2013). Segundo GONZÁLEZ-PÉREZ & VEREIJKEN, 2007, o mesmo é obtido da extração do óleo, e seu teor proteico (35 a 50%) depende do processo de extração e da quantidade de cascas presentes no girassol.

Outros estudos envolvendo a utilização do farelo de girassol na dieta de peixes, além deste, nos levam a acreditar que o nível de 20% de farelo de girassol nas dietas é o recomendado, pois Lozano et al. (2007) observou que a inclusão de 36% de farelo de girassol em dietas de dourada *Sparus aurata* (44g) elevaram o CR e prejudica a CAA. Enquanto que Lovatto et al. (2014) ao incluir 50% de farelo de girassol nas dietas de jundiás constataram prejuízos ao sistema gastrointestinal e enzimático.

No entanto, as análises histológicas realizadas nesse estudo não apresentaram alterações sobre a morfologia do intestino (Tabela 3), sugerindo que os compostos fenólicos ligados à fração fibrosa do girassol, foram minimizados no processo de beneficiamento, pois não foram identificadas adaptações morfológicas das microvilosidades intestinais em resposta as mudanças da dieta.

Tabela 3. Níveis de inclusão de farelo de girassol nas dietas de jundiá sobre a histologia do intestino.

Parâmetros	Nível inclusão de Farelo de Girassol					
	Sem fitase			Com fitase		
	0%	10%	20%	0%	10%	20%
A.V ¹	224,53±52,07	243,11± 60,93	237,52 ±85,10	239,82±60,07	249,26±43,13	253,94±78,87
L.V ²	38,61±14,39	38,45 ±8,36	36,75 ±5,33	45,26±8,36	42,54±11,19	33,27±9,05
P.C ³	35,46± 6,31	30,94 ±11,74	37,03±4,78	30,94±13,07	33,06±5,70	40,31±16,77

Jundiás alimentados com dietas contendo até 20% de inclusão de farelo de girassol, suplementadas ou não com a fitase, também não apresentaram diferenças nos parâmetros hematológicos avaliados (Tabela 4), que estão de acordo com os preconizados para espécie. Segundo BORGES et al. (2004) os valores para hematócrito são de até 43% e para hemoglobina de até 8,7g dl⁻¹.

Tabela 4. Parâmetros eritrocitários de juvenis de jundiá alimentados com dietas contendo diferentes níveis de farelo de girassol, suplementadas ou não com fitase.

Variáveis	Níveis de Farelo de Girassol					
	0%	10%	20%	0%	10%	20%
	Sem Fitase			Com Fitase		
Eritrócito (x10 ⁶ μL ⁻¹)	2,18 ± 0,28	2,11 ± 0,13	2,08 ± 0,19	2,23 ± 0,19	2,12 ± 0,34	2,15 ± 0,31
Hematócrito (%)	34,28 ± 4,46	36,33 ± 5,57	34,12 ± 4,12	34,12 ± 2,47	33,70 ± 3,65	31,71 ± 3,5
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	6,10 ± 0,75	6,22 ± 1,40	5,60± 14,05	5,82 ± 1,14	5,47 ± 1,09	4,72 ± 1,10
VCM (fL) ¹	158,60 ± 27,19	173,20 ± 33,13	165,82 ± 30,99	153,82 ± 19,9	162,07 ± 28,99	149,30 ± 22,19
CHCM (%) ²	17,88 ± 1,69	17,44 ± 4,27	16,32 ± 1,62	17,08 ± 3,17	16,29 ± 3,09	14,90 ± 3,23

¹VCM = volume corpuscular médio; ²CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média. Médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Duncan (p<0,05) entre os tratamentos com ou sem a suplementação de fitase.

Segundo Tavares-Dias & Moraes (2004) o VCM dessa espécie apresentou-se normal com variações de 139,0 a 241,9 fL, entretanto, o número de eritrócitos apresentou-se acima do

intervalo de referência para espécie (1,42 a 1,95). Já o CHCM esteve abaixo do observado para a espécie, que pode variar entre 22,7 e 32,9 % (TAVARES-DIAS & MORAIS, 2004).

Essas alterações podem estar ligadas as variáveis químicas e físicas da água em ambientes de cultivo muitas vezes são extremas e conseqüentemente alteram as variáveis hematológicas (COSTA et al., 2004; CARVALHO & FERNANDES, 2006). O tamanho dos peixes também pode influenciar, já que os animais liberam quantidade de energia equiparada ao tamanho corporal (TAVARES-DIAS et al., 2000). Contudo, a hemoglobina presente nas hemácias só é acumulada à medida que a célula amadurece o que explica o maior número de eritrócitos e a menor CHCM (ZAGO & CALADO, 2013).

Os níveis de inclusão de farelo de girassol nas dietas dos jundiás não influenciaram os valores de leucócitos e trombócitos totais, bem como, não influenciou o número de linfócitos, CGE e linfócitos imaturos (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios de leucócitos e trombócitos totais, e contagem diferencial de leucócitos: linfócitos, neutrófilos, monócitos, células granulocíticas especiais e linfócitos imaturos de juvenis de jundiás alimentados com dietas contendo farelo de girassol, suplementadas ou não com fitase.

Níveis de Girassol	Leucócitos (μL^{-1})	Trombócitos (μL^{-1})	Linfócitos (%)	Neutrófilos (%)	Monócitos (%)	CGE (%) ¹	Linfócitos Imaturos (%)
SemFitase							
0	45733,23 ± 10249	55375,10 ± 19702	80,67 ± 6,63	15,00 ± 4,39 a	2,67 ± 1,21 ab	1,0 ± 1,26	1,00 ± 1,26
10 %	39732,02 ± 19690	58519,21 ± 15172	82,00 ± 9,50	12,40 ± 7,30 a	2,67 ± 2,33 ab	0,17 ± 0,41	0,67 ± 0,82
20 %	39211,13 ± 15501	68195,78 ± 32126	87,50 ± 7,50	5,40 ± 4,09 b	2,33 ± 1,50 ab	0,33 ± 0,81	2,00 ± 3,94
ComFitase							
0	43319,06 ± 11201	62373,10 ± 11554	79,17 ± 8,79	15,60 ± 6,26 a	1,17 ± 0,75 b	1,33 ± 2,33	1,16 ± 1,47
10 %	39013,59 ± 15545	64021,90 ± 27862	89,83 ± 7,46	6,40 ± 2,88 b	0,83 ± 0,98 b	0,83 ± 1,33	0,16 ± 0,40
20 %	44680,18 ± 15679	70144,45 ± 23246	78,50 ± 9,42	12,0 ± 5,33 a	4,33 ± 2,80 a	0,33 ± 0,52	2,66 ± 1,21

¹CGE: Células Granulocíticas Especiais. Médias seguidas de letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre os tratamentos com ou sem a suplementação de fitase.

O número de Leucócitos totais e Trombócitos totais, CGE e linfócitos imaturos dos peixes encontrados dentre os tratamentos estão entre os valores normais observados para a espécie. Mesmo havendo diferenças ($p < 0,05$) para os neutrófilos observados nos peixes alimentados com as dietas experimentais, estes se encontram dentro da percentagem recomendada de 1,8 a 30,0%; porém, observou-se menor percentagem de neutrófilos em peixes alimentados com dietas contendo 10 e 20% de farelo de girassol, com e sem a suplementação da fitase.

Enquanto que os leucócitos totais variaram entre 2.960 a 49.800 ul^{-1} as CGE em 0 a 6%; as porcentagens de linfócitos (78,0 a 89,83%) demonstraram-se superior ao indicado para a espécie que varia entre 58,0 a 68,1% (TAVARES-DIAS E MORAES, 2004). Para os monócitos, os peixes alimentados com 20% de farelo de girassol com suplementação de fitase apresentaram valores superiores ($p < 0,05$) em relação aos alimentados com 0 e 10% de farelo de girassol, suplementados com fitase.

Os parâmetros sanguíneos são influenciados por inúmeros fatores, no entanto, a influência nutricional merece destaque, principalmente por dar as devidas condições de respostas a estímulos externos ou exposição que os animais venham a sofrer (TAVARES-DIAS et al., 2002). Por outro lado, os parâmetros eritrocitários mantiveram-se normais indicando que não houve efeito severo do uso do alimento sobre as variáveis sanguíneas.

As alterações leucocitárias observadas neste provavelmente estão relacionadas à composição e ao perfil dos ácidos graxos que compõem a dieta, uma vez que, atuam sobre a resposta de defesa, já que algumas respostas são baseadas na interação das membranas (ricas em lipídios) dos leucócitos, pela ativação da produção de citocinas e também pela influência da produção da prostaglandina e leucotrienos pelos macrófagos (BALFRY et al., 2006).

Os valores de composição centesimal, umidade, matéria mineral, proteína bruta e extrato etéreo observados na carcaça de jundiás alimentados com dietas contendo até 20% de

farelo de girassol com ou sem a suplementação da enzima fitase não apresentaram variações significativas (Tabela 6).

Tabela 6. Composição centesimal (matéria natural) de juvenis de Jundiá alimentados com níveis de inclusão de farelo de girassol com e sem suplementação da enzima fitase.

Variável	Nível inclusão de Girassol					
	Sem fitase			Com fitase		
	0%	10%	20%	0%	10%	20%
UM ¹	71,72 ± 1,76	69,56 ± 1,45	67,98 ± 1,41	70,08 ± 1,59	68,41 ± 2,69	69,42 ± 1,20
MM ²	4,44 ± 0,81	4,02 ± 1,28	4,60 ± 0,29	3,99 ± 0,81	4,03 ± 0,71	4,22 ± 0,02
PB ³	18,80 ± 1,68	19,82 ± 0,77	19,49 ± 0,79	18,94 ± 0,58	18,95 ± 0,82	18,75 ± 0,82
EE ⁴	5,83 ± 1,75	6,09 ± 0,64	7,18 ± 1,01	7,13 ± 0,70	6,41 ± 0,36	7,53 ± 0,24

¹UM: Umidade; ²MM: Matéria Mineral; ³PB: Proteína Bruta; ⁴EE: Extrato Etéreo. Médias seguidas de letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os tratamentos com ou sem a suplementação de fitase.

Os resultados obtidos para composição da carcaça indicam que a inclusão de até 20% de farelo de girassol em substituição ao farelo de soja, não causam alterações na síntese proteica e deposição lipídica de jundiás, demonstrando que as duas fontes proteicas, são equiparadas nutricionalmente. Este mesmo efeito foi observado por Olvera-Novoa et al. (2002) ao avaliar a inclusão de farelo de girassol em substituição à farinha de peixe na dieta da *tilápia rendalli*. Além disso, por meio da composição de minerais aferida nos ossos dos peixes alimentados com as dietas experimentais não observou-se diferenças entre as dietas experimentais, independente da presença ou ausência de fitase (Tabela 7).

Tabela 7. Composição mineral dos ossos de juvenis de Jundiá alimentados com níveis de inclusão de farelo de girassol com e sem suplementação da enzima fitase.

Níveis de Inclusão do Farelo de Girassol	Variáveis				
	Mg (mg/g)	Zn (mg/g)	Ca (mg/g)	Mn (mg/g)	P (mg/Kg)
Inicial	1,08	0,05	133,12	0,01	104,99
Sem Fitase					
0 %	0,91±0,27	0,06±0,02	74,65±18,75	0,09±0,04	94,60±8,06
10 %	1,00±0,09	0,07±0,01	78,15±4,98	0,10±0,03	98,65±7,00
20 %	1,08±0,04	0,05±0,01	91,53±6,97	0,07±0,02	112,14±9,58
Com Fitase					
0 %	0,99±0,07	0,07±0,01	80,14±3,18	0,12±0,02	93,13±9,26
10 %	1,07±0,18	0,06±0,02	83,05±3,54	0,08±0,03	103,77±0,98
20 %	1,01±0,13	0,06±0,02	82,77±11,15	0,10±0,03	96,44±15,53

Não houve diferença significativa

Sabe que a concentração de minerais na carcaça dos peixes varia com a idade, tamanho e estágio reprodutivo dos animais. Além disso, os fatores antinutricionais como o ácido fítico, comum em dietas de origem vegetal tendem a afetar a digestibilidade dos aminoácidos e a disponibilidade de minerais como o fósforo, que é absorvido em aproximadamente 2% em sua totalidade (Rocha et al., 2008; Pontes et al., 2015). Neste sentido, a utilização da enzima fitase vem sendo empregada para maximizar a absorção desse mineral. Porém, esse efeito, não foi observado nesse estudo propondo que o nível de fósforo exigido pela espécie para o crescimento, utilização de nutrientes e deposição de minerais nos ossos foi atendido pelas dietas experimentais.

Por meio desse estudo, se observou que a inclusão do farelo de girassol com ou sem a suplementação de fitase melhora o desempenho produtivo de jundiás quando alimentados com dietas contendo 20% de inclusão. E, embora tenha apresentado resultados satisfatórios, ainda se fazem necessários estudos que comprovem, quais os efeitos secundários da utilização do farelo de girassol sobre as variáveis metabólicas dos peixes.

5. Conclusão

Concluiu-se que a inclusão de 20% do farelo de girassol com e sem a suplementação de fitase, pode ser utilizado com segurança nas dietas de jundiá, pois não influencia negativamente a fisiologia e a produtividade dos animais.

6. Referências Bibliográficas

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of association of official analytical chemists (method 962.13). Arlington: AOAC. Chapter 29, p. 3. 2000.

BALFRY, S.K.; OAKES, J.; ROWSHANDELI, M.; DEACON, G.; SKURA, B.; HIGGS, D.A. Efficacy of an equal blend of canola oil and poultry fat as an alternate dietary lipid source for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater. **II: effects on haematology and immune competence.** Aquaculture Research, v.37, p.192-199, 2006.

BERGAMIN, G. T.; VEIVERBERG, C. A.; SILVA, L. P.; ALEXANDRA PRETTO, A.; SIQUEIRA, L. V.; RADÜNZ NETO, J. **Extração de a ntinutrientes e aumento da qualidade nutricional dos farelos de girassol, canola e soja para alimentação de peixes.** Ciência Rural. Santa Maria. v.43. n.10.p.1878-1884. Out. 2013.

BORGES, A.; SCOTTI, L. V.; SIQUEIRA, D. R.; JURINITZ, D. F.; WASSERMANN, G. F. **Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*).** Fish Physiology and Biochemistry. v.30. p.21- 25. 2004.

CARVALHO, C. S.; FERNADES, M. N. 2006. **Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH.** Aquaculture, 251:109-117.

COSTA, O.F.T.; FERREIRA, D.J.S.; MENDONÇA, F.L.P.; FERNANDES, M. N. 2004. **Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macrapomum* (Serrasalminae) to short-term exposure to nitrite.** Aquaculture, 232:627-636.

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

FORTES-SILVA, R.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J. and MARTÍNEZ, F.J. **Effects of pretreating a plant-based diet with phytase on diet selection and nutrient utilization in European sea bass.** Aquaculture 319:417-422. 2011.

FURUYA, W.M.; GONÇALVES, G.S.; FURUYA, V.R.B.; Hayashi, C. 2001 **Fitase na alimentação da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Desempenho e digestibilidade.** Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, 30 (3): 924-929.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. **Biologia do jundiá *Rhamdiaquelen* (Teleostei, Pimelodidae).** Ciência Rural. Santa Maria. v.30.n.1.p.179-185. 2000.

GONÇALVES, G. S.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; KLEEMAN, G. K.; ROCHA, D. **F. Efeitos da Suplementação de Fitase sobre a Disponibilidade Aparente de Mg, Ca, Zn, Cu, Mn e Fe em Alimentos Vegetais para a Tilápia-do-Nilo.** R. Bras. Zootec., v.34, n.6, p.2155-2163, 2005 .

GONZÁLEZ-PÉREZ, S.; VEREIJKEN, J.M. **Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties.** Journal of the Science of Food and Agriculture. v.87. n.12. p.2173-2191. 2007.

LOPES, P.V.L.; MARTINS, M.C.; TAMAI, M.A.; OLIVEIRA, A.C.B.; CARVALHO, C.G.P. **Produtividade de genótipos de girassol em diferentes épocas de semeadura no oeste da Bahia.** EMBRAPA, comunicado técnico, Pelotas, RS, jun., n. 208, 2009

LOZANO, N. B. S.; VIDAL, A. T.; MARTÍNEZ-LLORENS, S.; MÉRIDA, S. N.; BLANCO, J.E.; LÓPEZ, A.M.; TORRES, M.P.; CERDÁ, M.J. **Growth and economic profit of gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) fed sunflower meal.** Aquaculture, n. 272.p. 528–534. 2007.

OLVERA-NOVOA, M. A.; OLIVEIRA-CASTILLO, L.; MARTÍNEZ-PALACIOS, C. A. **Sunflower seed meal as a protein source in diets for *Tilapia rendalli* (Boulanger, 1896) fingerlings.** Aquaculture Research. Oxford. v.33. n.3. p.223-229. Mar. 2002.

PONTES, T. C.; CAGOL, L.; DUTRA, F. M.; PORTZ, L. **Disponibilidade do fósforo em alimentos de origem vegetal: atuação na nutrição de peixes.** Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, v. 18, n. 3, p. 199-205, jul./set. 2015.

RANZANI-PAIVA, M.J.T., PÁDUA, S.B., TAVARES-DIAS, M., EGAMI, M.I. 2013 **Técnicas de análise hematológica em peixes**. Eduem, Maringá, PR. 130 p.

ROCHA, C. B. POUHEY, J. L. O. F.; LOPES, P. R. S.; ENKE, D. B. S.; XAVIER, E. G. **Suplementação da enzima fitase e o desempenho e retenção mineral em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*)**. B. Inst. Pesca, São Paulo, 34(1): 151 - 157, 2008

SANCHEZ, M. S. S.; NASCIMENTO, M. S.; HISANO, H. **Replacement of corn by sorghum in diets for pacu juvenile**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 51, n. 1, p. 1-8, 2016.

TAVARES-DIA, M; SANDRIM, E. F. S.; MORAES, F. R. & CARNEIRO, P. C. F. **Physiological responses of “Tambaqui” *Colossomacropomum* (Characidae) to acute stress**. B. Inst. Pesca. 27 (1): 43-48. 2001.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J. F. B.; MORAES, G.; MORAES, F. R.; **Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do Jundiá (*Rhamdia quelen*) (*Pimelodidae*)**. Ciência Rural. Santa Maria. v.32,n.4. p. 693-698. 2002.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress.p.144.2004.

TAVARES-DIAS, M.;SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R.**Haematological characteristics of Brazilian teleostes. III. Parameters of the hybrid**

tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) (Osteichthyes: Characidae). Revista Brasileira de Zoologia. 17 (4): 899-926. 2000.

VEIVERBERG, C.A.; BERGAMIN, G.T.; RADÚNZ NETO, J.; LAZZARI, R.; CORRÊIA, V.; ROSSATO, S.; SUTILI, F.J.; FERREIRA, C.C. **Farelo de soja como substituto à farinha de carne e ossos em dietas para juvenis de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*).** Boletim do Instituto de Pesca, v.34, n.3, p.463-472, 2008.