

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

**INFLUENCIA DA DIETA COM DIFERENTES NÍVEIS DE PROTEINA SOBRE AS
RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DO TAMBACUI (*Colossoma macropomum*)
DURANTE A FASE DE ENGORDA EM TANQUE ESCAVADO**

Bolsista: Andreson do Santos Amâncio, FAPEAM

MANAUS/AM

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

**INFLUENCIA DA DIETA COM DIFERENTES NÍVEIS DE PROTEINA SOBRE
AS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DO TAMBAQUI (*Colossoma
macropomum*) DURANTE A FASE DE ENGORDA EM TANQUES
ECAVADOS**

Bolsista: Andreson dos Santos Amâncio, FAPEAM

Orientador: Prof^o Dra Christiane Patrícia Feitosa de Oliveira

MANAUS/AM

2015

Resumo

INFLUENCIA DA DIETA COM DIFERENTES NÍVEIS DE PROTEÍNA SOBRE AS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) EM FASE DE ENGORDA EM TANQUES ECAVADOS

O presente estudo teve por objetivo avaliar as respostas fisiológicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetido ao manejo alimentar com diferentes níveis de proteína. Para tanto, 900 peixes com peso inicial de 50g, foram distribuídos em 6 viveiros de 15x40m, em uma densidade de 1,5 peixe/m². O delineamento inteiramente casualizado constituiu de dois tratamentos, com três repetições cada: T1 dieta contendo 28% de Proteína e T2 dieta contendo 34% de proteína bruta. No decorrer do período experimental foram coletados dezoito indivíduos de cada tratamento para coleta de sangue. Foi avaliado como indicadores de higidez, como os parâmetros hematológicos (número de células vermelhas (RBC), a concentração de Hb) e parâmetros metabólicos como glicose, colesterol e proteína. Ainda monitorados os parâmetros físico-químicos das águas utilizadas no experimento. Os parâmetros físico-químicos da água estavam dentro dos limites toleráveis pela espécie. Não houve diferenças significativas tanto nas variáveis hematológicas quanto metabólicas nos peixes alimentados com 28% e 34% de proteína. Com isso foi concluído que a ração com 28% de proteína pode ser usada sem qualquer prejuízo fisiológico diminuindo assim o custo de produção.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	5
2	REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1	Piscicultura na Amazônia	6
2.1	Proteínas na Alimentação de Peixes	6
2.2	Nutrição do Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	7
3	OBJETIVOS	8
3.1	Objetivo geral	8
3.2	Objetivos específicos	8
4	MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1	Local do experimento	9
4.2	Delineamento Experimental	9
4.3	Monitoramento da qualidade da água	9
4.4	Coleta de sangue e análise dos parâmetros sanguíneos	9
4.5	Parâmetros Sanguíneos	10
4.5.1	Concentração de hemoglobina [Hb]	10
4.5.2	Contagem de eritrócitos (RBC)	10
4.6	Análise estatística	10
5	RESULTADOS	11
6	CONCLUSÕES	Erro! Indicador não definido.
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
8	CRONOGRAMA	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

A atividade aquícola, na qual está inserida a piscicultura, apresentou um considerável crescimento no fornecimento de proteína animal para o consumo humano (QUEIROZ et al., 2005). Segundo boletim da FAO (2006) a tendência de aumento na produção aquícola e no consumo per capita de peixes nos países da América Latina é crescente. O Brasil bem como a Região Amazônica destaca-se no cenário mundial por apresentar o grande potencial para atividade, com grande abundância de recurso hídrico e muitas espécies de valor econômico (ONO, 2005).

Dentre as espécies criadas no estado do Amazonas o tambaqui (*Colossoma macropomum*) desponta como a mais cultivada. Deve-se isso, a suas características apreciáveis para a criação, como; onívoros, rusticidade e crescimento rápido (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998) além de fácil de aceitação a ração artificial e adaptação à criação em cativeiro. Uma das mais relevantes características é a consistência bem como o sabor de sua carne muito apreciada pelo consumidor. Tendo a espécie grande importância na economia regional (VAL & HONCKZARIC, 1992).

Para qualquer sistema intensivo de cultivo, a alimentação corresponde a maior parte do custo de produção (EL-SAYED 1999). A utilização de rações desbalanceadas, além de provocar menor desempenho nos organismos cultivados, causa vários impactos para o meio ambiente uma vez que os nutrientes não aproveitados são excretados no meio aquático (MILLWARD, 1989). Os alimentos proteicos utilizados na ração além de entrarem em grandes quantidades, são mais caros que os energéticos (PEZZATO, 1999).

Diversos estudos demonstram que diferenças na formação e funções nas células sanguíneas podem ser indicativas de manipulação da alimentação (GRENNE & SELIVONCHICK, 1990; DUNCAN et al., 1993; WISE et al., 1993). O claro conhecimento das respostas hematológicas para diferentes dietas podem ser útil em diferentes formulações. Entretanto, a determinação do desempenho nutricional baseia-se no teste de desempenho, em diferentes períodos ambientais (GERHANOVICH & KISELEV, 1993).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Piscicultura na Amazônia

Amazônia se apresenta pela sua grande biodiversidade, pela sua dimensão da bacia hidrográfica aproximadamente de 7.050.000 Km², possui 1/5 da água doce do mundo, possui inúmeros rios, lagos e igarapés, está estimada a existência de 6 mil espécies de peixes de água doce (HONDA *et al.*, 1975).

A FAO projeta um aumento do consumo mundial para 2030 dos atuais 16 kg/habitantes/ano para 22,5 kg/habitantes/ano. A região possui condições extremamente favoráveis para o incremento da produção. São 30 milhões de hectares de lâmina d'água nas várzeas, 960 hectares de lâmina d'água nos reservatórios de usinas hidrelétricas e 130 milhões de hectares de estabelecimentos rurais na Amazônia, e mais 1.600 km de costa marítima.

Fatores como: clima favorável, recursos hídricos, ocorrência de vales interiores, existência de espécies nobres com excelente desempenho quando cultivada, uma atividade sustentável que preserva as florestas e mais o valor simbólico do produto regional para comercialização ao mercado interno e externo favorecem a produção de peixes na Amazônia (ONO, 2005).

Por tanto, a produção de pescado é uma grande oportunidade para a Amazônia produzir uma proteína nobre e gerar milhões de postos de trabalho, emprego, renda e fazer isso de forma sustentável aproveitando o vasto território de águas da região tem condições de ser uma das maiores produtoras de pescado cultivado no mundo.

2.1 Proteínas na Alimentação de Peixes

As proteínas são biomoléculas de máxima importância para o animal em crescimento, sendo o perfil de aminoácido decisivo na sua qualidade definindo seu valor como componente da dieta (PEZZATO, 1999).

Este constituinte dietário é um dos principais fatores que influenciam a produtividade dos peixes apresentando dentre outras funções formação e

manutenção dos tecidos, formação de hormônios, enzimas, anticorpos, transporte de minerais e para peixes carnívoros fontes de energia (LOGATO, 1999).

Entretanto deve-se conhecer a quantidade ideal de proteína demandada pela a espécie, pois dietas insuficientes de proteínas e aminoácidos podem reduzir o crescimento e a eficiência alimentar. Por outro lado, dietas com excesso de proteína será utilizada, parte para a formação do tecido muscular e crescimento e o restante convertido em energia encarecendo a dieta, haja vista esse ingrediente ter o maior custo na formulação da dieta (MILLWARD, 1989).

Diante disso torna-se necessário a determinação a da exigência proteica da espécie estudada afim de oferecer uma ração balanceada e com menor custo.

2.2 Nutrição do Tambaqui (*Colossoma macropomum*)

O tambaqui silvestre tem uma dieta basicamente herbívora quando adulto, mas, durante seu período juvenil e pré-adulto, ingere mais proteínas, especialmente, de origem animal, apresentando uma dieta onívora (ARAUJO-LIMA; GOULDING, 1998). A quantidade de proteína animal é ainda maior quando nos estágios mais jovens. Como o tambaqui criado em cativeiro é um juvenil, essa necessidade nutricional deve ser observada.

Tambaquis cultivados são alimentados com ração peletizada ou extrusada, embora essa dieta seja suplementada com frutas, restos de vegetais e, mesmo, de alimentos industrializados, além do zooplâncton produzido no próprio viveiro. A quantidade de proteína nas Rações varia de 19 a 40 %. Essas rações tem em torno de 12 a 17 Kj/g (CARNEIRO SOBRINHO et al., 1989; ANDRADE; TOLENTINO; FREITAS, 1983), são mais ricas em proteína que a dieta natural.

Em estudos recente, Santos et al. (2010) determinaram que a exigência protéica de juvenis de tambaqui (50,3 ± 0,26 g) é de 36% - com maior incremento de proteína corporal e melhor desempenho zootécnico – e a melhor relação energia digestível: proteína bruta é de 9,5 kcal g⁻¹. Os autores constataram que o tambaqui apresenta ganho compensatório após período de privação alimentar de 15 dias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar as respostas fisiológicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetido ao manejo alimentar com diferentes níveis de proteína.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as respostas sanguíneas do tambaqui submetido ao manejo alimentar com diferentes níveis de proteína.

- Avaliar as respostas metabólicas do tambaqui submetido ao manejo alimentar com diferentes níveis de proteína.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido no Centro de Tecnologia e Produção de Aquicultura (CTTPA), localizado no Município de Balbina/AM KM 170/BR 174.

4.2 Delineamento Experimental

Peixes pesando em média 50g, foram distribuídos em 6 viveiros 15 x 40 m, na densidade de 1,5 peixes/m² no total de 900 peixes com três repetições cada em delineamento inteiramente casualizado. Os peixes foram alimentados com ração comercial extrusada de 28% e 34% de PB duas vezes ao dia, sete dias por semana, exceto nos dias anteriores às biometrias. A taxa de alimentação variou em função do peso médio dos peixes. As biometrias foram realizadas a cada 30 dias, juntamente com a coleta do sangue com amostragem de 10% do total de exemplares de cada tanque rede para ajustar a quantidade de ração a ser fornecida. O experimento teve duração de 150 dias.

4.3 Monitoramento da qualidade da água

Durante todo o período experimental foi realizado o monitoramento das características físico-químicas da água nas unidades experimentais. Foram avaliadas diariamente a temperatura, o pH e a concentração de oxigênio dissolvido condutividade, transparência e turbidez.

4.4 Coleta de sangue e análise dos parâmetros sanguíneos

Para as coletas de sangue, os animais foram anestesiados com benzocaína (etyl-p-aminobenzoato) 10% na dose de 100 mg/L, segundo recomendações de Gomes *et al.* (2001). A coleta do sangue ocorreu por punção da veia caudal utilizando seringas heparinizadas. Após a coleta, as amostras de sangue foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e refrigeradas para realização das análises sanguíneas.

4.5 Parâmetros Sanguíneos

Para avaliação da série vermelha foram determinados: o número de eritrócitos circulantes (RBC), o hematócrito (Ht) e a concentração de hemoglobina.

4.5.1 Concentração de hemoglobina [Hb]

A concentração de hemoglobina foi determinada utilizando o método da cianometohemoglobina descrito por Kampen & Zijlstra (1964), que consiste em colocar 15µl de sangue em um tubo de ensaio contendo 3 ml de solução Drabkin (KCN 0,5g; KH₂ PO₄ 1,4g; K₃ [Fe (CN)₆] 2,0g em 1 litro de água destilada). Após agitação os tubos permaneceram por 15 minutos em repouso para efetivação da hemólise. O conteúdo do tubo foi colocado em uma cubeta de plástico e a absorbância medida em um espectrofotômetro Genesis-2, em 540nm. A determinação da concentração de hemoglobina (em gramas por 100 ml de sangue) foi obtida pela equação:

[Hb] (g/dl) = absorbância (500nm) x 0,146 x diluição da amostra, onde: 0,146 = fator de correção.

4.5.2 Contagem de eritrócitos (RBC)

A contagem dos eritrócitos foi realizada pelo método usual colocando em um tubo de ensaio uma amostra de 10µl de sangue diluída em 2ml de Formol Citrato (3,8g de citrato de sódio; 2ml formol e água destilada q.s.p. 100ml). Após homogeneização, a contagem dos eritrócitos (10⁶/mm³) foi feita em câmara de Neubauer, com objetiva de 40 X.

4.5.3 Determinação de Glicose, Colesterol e Proteínas Plasmática

As dosagens de glicose, colesterol total e proteínas foram realizados a partir do plasma sanguíneo obtido após centrifugação do sangue total. Para tanto, foram utilizados kits específicos para determinação desses metabólicos.

4.6 Análise estatística

Os dados dos parâmetros analisados foram comparados nos diferentes tratamentos por teste T e o nível de significância assumido foi de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSAO

5.1 Qualidades da Água

Os resultados dos parâmetros físico-químicos da água das unidades experimentais estão apresentados a seguir (Tabela 1). A temperatura média da água dos viveiros esteve entre os 30,52 (T1) e 30,88, não havendo grande amplitude de variação entre os tratamentos, estando esses valores dentro da faixa tolerada pela espécie. Oxigênio Dissolvido esteve dentro dos padrões ideais para cultivo apresentando valores médio maiores que de 5 mg/L.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água de tambaqui alimentados com ração contendo diferentes concentrações de proteína.

	Cond.	Tempo°C	pH	O ²	Turbidez	Transp.
Proteínas Brutas	Qualidade de Agua					
34%	36,68 ± 1,96	30,88 ± 0,31	7,526 ± 0,33	5,44 ± 0,76	73,88 ± 11,82	67 ± 6,245
28%	34,96 ± 2,25	30,52 ± 0,41	8,02 ± 0,30	5,26 ± 0,82	63,5 ± 5,63	61 ± 4,58

5.2 Parâmetros Hematológicos

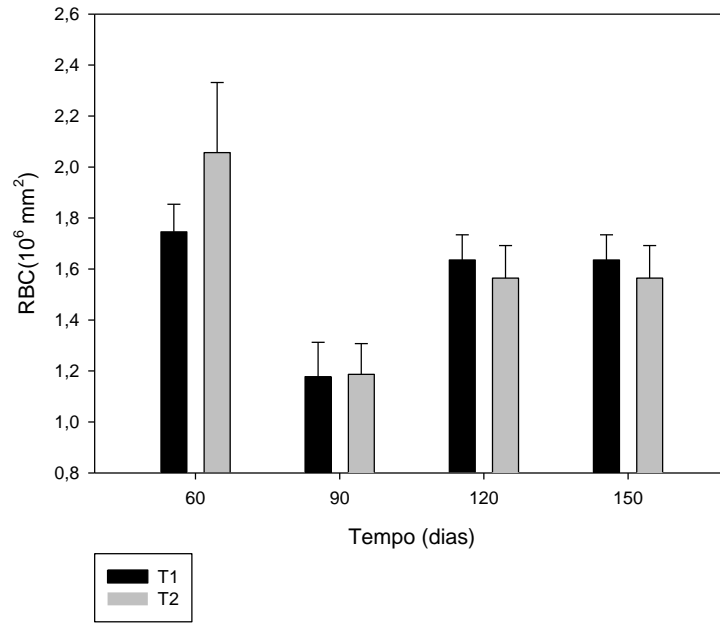
Para que ocorra o melhor desenvolvimento dos peixes os componentes celulares precisam estar em um funcionamento sincronizado com todos os órgãos realizando funções que contribuam para homeostasia, a comunicação entre os diversos órgão é realizada pelo sangue, que pode ser entendido como um sistema de transporte em que as artérias veias e capilares sevem como dutos (GARCIA-NAVARRO, 2005).

As variações nos índices hematológicos podem ocorrer em função da alteração de parâmetros tanto bióticos quanto abióticos, através desses índices pode-se avaliar o estado de saúde do animal (MORGAN & IWAMA, 1997, GARCIA-NAVARRO, 2005; AZEVEDO *et al.*, 2006).

A membrana eritrocitária é constituída por dupla camada lipídica, atravessada por várias proteínas (BAIN, 1997) e quando ocorre deficiência de alguns aminoácidos, a produção de eritrócitos (eritropoiese) pode ser prejudicada, assim como também pode ocorrer decréscimo na produção de hemoglobina, causando anemia (GARCIA-NAVARRO & PASCHALY, 1994).

Os valores de eritrócitos e hemoglobina dos tratamentos T1 (28%) e T2 (34%) foram comparados por tempo de coleta, onde os mesmos não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos no período de 60, 90, 120 e 150 dias (Figura 1A e 1B). CAMARGO *et al.* (2005) trabalhando com Jundiá (*Rhandia quelen*) submetidos diferentes níveis de proteína 30%, 40% e 50% proteínas observou uma aumento significativo no numero de eritrócitos e concentração de hemoglobina nos tratamentos com 50% de proteína em comparação de 30% e 40%. No entanto, não houve diferença significativa nas concentrações de 30% e 40%. Esses resultados sugerem que essa variação significativa ocorre quando a concentração de proteínas atingem elevados valores.

Eritrócitos



Hemoglobina

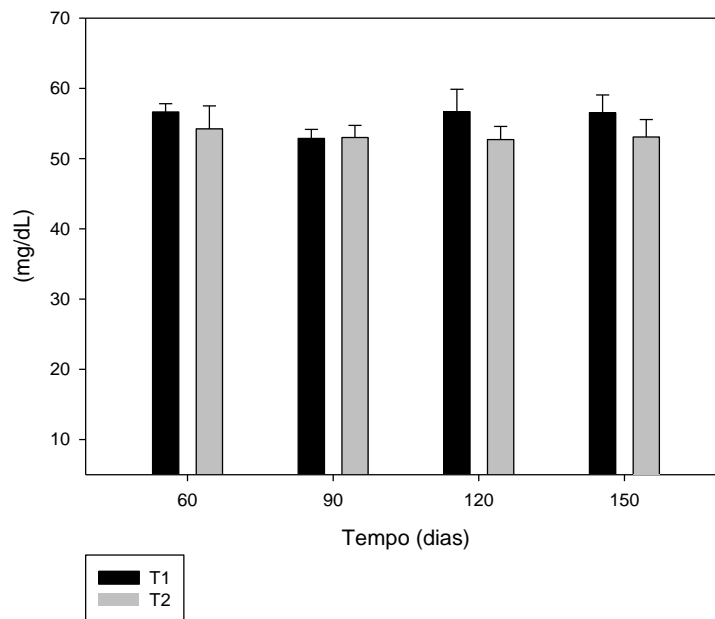


Figura 1. Número de eritrócitos (A) concentração de hemoglobina [Hb] (B) de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com dietas com diferentes concentrações de proteínas T1 (28%) T2 (34%) por um período de 150 dias.

5.2 Parâmetros Metabólicos

Segundo Hilbig et al., (2010) a composição bioquímica do plasma sanguíneo reflete a situação metabólica dos tecidos animais, sendo possível a avaliação de alterações no funcionamento de órgãos, adaptação de animais diante desafios nutricionais e fisiológicos e desequilíbrio metabólicos específicos ou de origem nutricional.

A dosagem da glicose sanguínea é um importante parâmetro no estudo do metabolismo animal (LEHNINGER, 2002). No experimento realizado, não houve diferença significativa entre os tratamentos T1 (28%) e T2 (34%) nos primeiros 60 dias e demais épocas de coleta (Figura 2A) apresentando valores próximos de 60 (mg]dL). Em estudo com jundiá (*Rhandia quelen*) alimentados com dietas isoprotéica e duas fontes de carboidratos aveia e arroz LOVATTO et al. (2013) não encontraram diferença significativa para os parâmetros de crescimento, entretanto demonstrou que ocorreram variações no metabolismo do animal, havendo diferença significativa na glicose. Os autores sugerem que o jundiá é capaz de metabolizar diferentes fontes de carboidrato, sem a necessidade de utilizar a proteína, tanto da dieta quanto a corporal, como fonte de energia. Desta forma podemos sugerir que neste estudo a diferença de proteínas na ração não interferiu significativa nos níveis glicêmicos. Nos valores de colesterol houve diferença significativa entre os tratamentos T1 (28%) e T2 (34%) apenas nos tempos 60 e 90 (Figura 2B). A concentração de proteína plasmática esteve próxima de 55(mg/dL) esteve e não apresentou diferença significativa na concentração de proteína plasmática entre os tratamentos (Figura 2C).

GONÇALVES (2014), avaliou o desempenho produtivo e respostas fisiológicas de juvenis de Cachara (*pseudoplatystoma reticulatum*) alimentados com diferentes níveis de proteína e carboidratos e observou valores semelhantes aos encontrados nesse estudo,

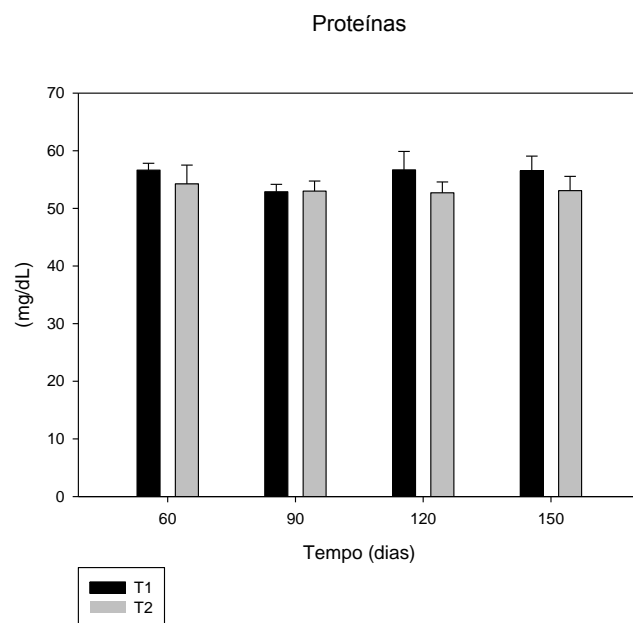
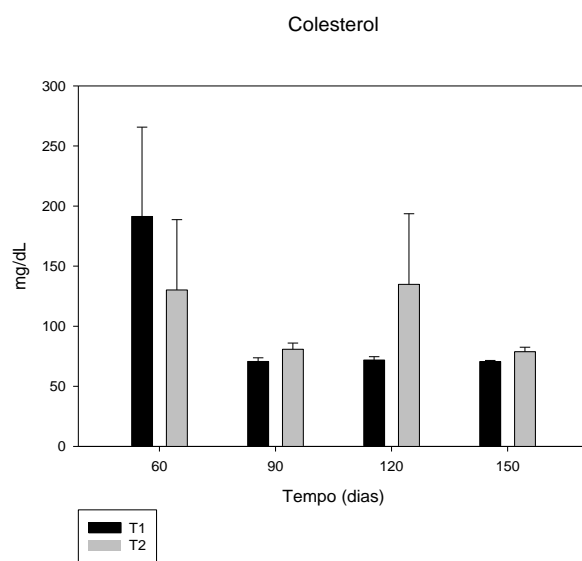
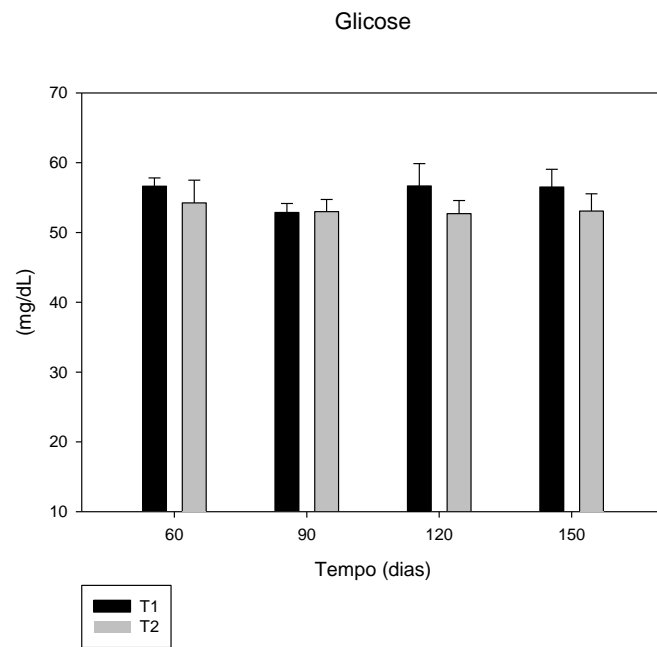


Figura 2. Glicose (A) Colesterol (B) Proteínas Totais (C) de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com dietas com diferentes concentração de proteínas T1 (28%) T2 (34%) por um período de 150 dias.

6 CONCLUSÃO

A ração com 28% de proteína bruta pode ser utilizada para a engorda do tambaqui sem causar prejuízos fisiológicos, diminuindo assim o custo de produção do piscicultor.

7 ERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, P. C. M.; TOLENTINO, A. S.; FREITAS, C. E. C. 1993. Desenvolvimento de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) em gaiolas. Revista Latino americana de aquicultura, v.30, p.23-32.

ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Sociedade Civil Mamirauá, MCT – CNPq. 186 pp, 1998

AYROZA, D. M. M. R. DE; Furlamento, F. P. B.; Ayroza, L. M. S. Regulamentação do acesso territorial aos tanques-rede em áreas de preservação permanente – APP, no estado de São Paulo. Panorama da Aquicultura, Rio de Janeiro v. 15 n.90, p.63-65, 2005.

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. & Ferreira, R. M. A. Cultivo de peixes em tanques-rede: desafios e oportunidades para o desenvolvimento. EPAMIG, Minas Gerais. P. 9-22. 2005.

CARNEIRO SOBRINHO, A. et al. 1989. Resultados de um experimento sobre o cultivo do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, na densidade de estocagem de 10.000 peixes/ha. Ciências Agrônômicas, v.20, p.25-31.

DUNCAN, P. L. et al., Dietary folate requirement determined for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Journal of Nutrition, v.123, p.888-1887, 1993.

El-Sayed, A. F. M. Alternative dietary Protein Sources for farmed tilapia, *Oreochromis spp.* Aquaculture, the Netherlands, v.97 p. 383-394,1999.

FAO. FIGIS. Fisheries Statistics, 2004. Fisheries global information system. Disponível em <http://www.fao.org/figis/servlet/static?dom=root&xml=tseries/index.xml>. Acesso em: 16/10/2004. 33

FAO, Review of the current state of world aquaculture insurance. FAO Fisheries Technical Paper, 493. Rome: FAO, 2006, 107p.

GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R., CHIPPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P. 2003. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34:76-84.

GERSHANOVICH, A. D. ; KISELEV, G. A. Growth and hematological response of Sturgeon hybrids Russia Sturgeon (*Acipenser guldensdadi*) x beluga (*Huso huso* L.) to protein and lipid contents in the diet. *Comparative Biochemistry Physiology*, v.106 A, n.3, p. 581-586, 1993.

GREENE, D. H. S.; SELIVONCHICK, D. P. Effects of dietary vegetable, animal and marine lipids on muscle lipids and hematology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Aquacultura* v.89 p.165-182 1990.

KAMPEN, E.J.; ZIJLSTRA, W.G. 1964. Standardization of hemoglobinometry. *In: Erythrocytometric methods and their standardization. Ch. G Boroviczény ad. Bibl. Haematol.* v.18, p.68-72.

LOGATO, P.V.R. Nutrição e alimentação de peixes de água doce. 1º edição, Lavras, Editora UFLA, v.1, 79p. 1999.

MILLWARD, D. J. The nutritional of muscle growth and protein turnover. *Aquaculture*, The Netherlands, v.79 p. 1-58, 1989.

ONO, E. A. 2005. Cultivar peixes na Amazônia: possibilidade ou utopia? *Panorama da Aquicultura*, 15:41-48.

PEZZATO, L. E. Alimentação de peixes – Relação custo benefício. *Anais...* In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootécia, 37, 1999, Porto Alegre. Porto Alegre: SBZ, P. 109-118. 1999.

PEZZATO, L. E.; Castangnolli, N.; Rossi F. Nutrição e Alimentação de peixes Viçosa, Editora: Aprenda Fácil, 72p., 2001

Silva, A. L. N.; Siqueira, A. T. Piscicultura em tanques-rede: princípios básicos. Recife: SUDENE:URPE - Imprensa Universitária 72p. 1997.

VAL, A. L.; HONCZARYCK, A. 1992. *Creating fish the amazon*. Instituto de Pesquisa da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil. 149p.

WISE, D. J. et al., Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cell peroxidation, glutathione peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, v.5, p.177-182, 1993.