

Levedura íntegra e derivados do seu processamento em rações para tilápia do Nilo: aspectos hematológicos e histológicos

Hamilton Hisano^{1*}, Maeli Dal Pai Silva², Margarida Maria Barros³ e Luiz Edivaldo Pezzato³

¹Embrapa Agropecuária Oeste, BR 163, km 253,6, Cx. Postal 661, 79804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: hhisano@cpao.embrapa.br

RESUMO. Os efeitos da inclusão de levedura íntegra, levedura autolisada e parede celular para juvenis da tilápia do Nilo sobre parâmetros hematológicos e perímetro das vilosidades intestinais foram avaliados após 80 dias de experimento. Foram utilizadas rações práticas isoprotéicas (32,0% PD) e isoenergéticas (3.200 kcal ED kg⁻¹ de ração) suplementadas com três níveis de levedura íntegra ou autolisada (1,0; 2,0 e 3,0%) e três níveis de parede celular (0,1; 0,2 e 0,3%), além de uma ração controle, isenta destes microingredientes. Foram avaliados a contagem de eritrócitos, taxa de hemoglobina, proteína plasmática total, porcentagem de hematócrito, volume globular médio, concentração de hemoglobina globular média e o perímetro das vilosidades intestinais. Constatou-se que as variações nos parâmetros hematológicos dos animais alimentados com levedura íntegra, levedura autolisada e parede celular estão dentro da faixa de normalidade para a espécie. Houve influência significativa ($p < 0,05$) dos diferentes níveis de levedura e derivados sobre o perímetro das vilosidades intestinais. Pode-se concluir que o período experimental e os níveis adotados neste estudo para levedura íntegra, levedura autolisada e parede celular não provocam alterações prejudiciais nos padrões hematológicos de tilápia do Nilo e podem ser utilizados com segurança para comporem rações para esta espécie e que a suplementação de parede celular proporciona maior perímetro das vilosidades intestinais.

Palavras-chave: levedura autolisada, parede celular de levedura, *Oreochromis niloticus*, *Saccharomyces* sp.

ABSTRACT. Whole yeast and yeast derivatives in Nile tilapia diets: hematological and histological aspects. The effects of inclusion of whole yeast, autolyzed yeast and yeast cell wall on hematological parameters and gut villus perimeter were evaluated in juvenile Nile tilapia, after 80 experimental days. Isoproteic (32.0% DP) and isoenergetic (3200 kcal DE kg⁻¹) practical diets were supplemented with three levels of whole yeast or autolyzed yeast (1.0, 2.0 and 3.0%) and three levels of yeast cell wall (0.1, 0.2 and 0.3%), plus a control diet (with no test microingredients). Red blood cell count, hemoglobin concentration, total plasmatic protein, hematocrit percentage, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration and gut villus perimeter were evaluated. Variations on hematological parameters in animals fed diets with whole yeast; autolyzed yeast and yeast cell wall were observed to be within normal ranges for this species. There was significant influence ($p < 0.05$) of different levels of yeast and derivatives on intestinal villus perimeter. Results showed that experimental period and proposed levels of whole yeast, autolyzed yeast and yeast cell wall do not provide undesirable alterations on standard hematological parameters to Nile tilapia and can be safely used to compound diets for this species. Results also showed that supplement of yeast cell wall provide higher intestinal villus perimeter.

Key words: autolyzed yeast, yeast cell wall, *Oreochromis niloticus*, *Saccharomyces* sp.

Introdução

Atualmente, na produção animal, existe uma tendência mundial para limitação e proibição da suplementação de determinadas classes de

antibióticos e quimioterápicos. Estes compostos, quando utilizados em dosagens subterapêuticas, podem proporcionar resistência de bactérias patogênicas, ocasionando riscos consideráveis ao animal e principalmente para a saúde humana. Além

disso, a utilização inadequada desses produtos pode ocasionar atividade mutagênica e carcinogênica para algumas células, acúmulo de resíduos em órgãos e tecidos humanos e animais e também gerar poluentes ao meio ambiente (Menten, 2001).

Considerando estas adversidades e a sensibilização dos consumidores diante desta questão, diversos microingredientes de alimentação estão sendo avaliados como alternativa de substituição ao uso de antibióticos e quimioterápicos promotores de crescimento, destacando a utilização dos produtos naturais. Dentre estes, as leveduras e derivados do seu processamento podem ser recomendados para comporem rações para organismos aquáticos, pois se caracterizam por sua biossegurança, fácil incorporação à mistura durante o processamento da ração, pelas respostas positivas de desempenho zootécnico (Hisano et al., 2004) e pelos ganhos proporcionados à saúde dos animais (Ortuño et al., 2002; Li e Gatlin 2003 e 2004).

Durante muitos anos, a levedura tem sido difundida como fonte alternativa de proteína e de vitaminas do complexo B para alimentação de peixes. A literatura tem recomendado níveis de inclusão de leveduras às rações de peixes, que variam entre 15,0 a 30,0% (Pezzato, 1997). No entanto, a utilização de altos níveis pode provocar alterações metabólicas, como consequência dos constituintes da parede celular e do seu alto conteúdo em nitrogênio não protéico. Os altos níveis de nucleotídeos podem provocar alterações em enzimas hepáticas, acúmulo de ácido úrico e de uréia no sangue, anemia microcítica, anomalia e fragilidade eritrocitária em truta arco-íris (Sánchez-Muniz et al., 1979 e 1982; Tacon e Cooke, 1980).

Por outro lado, compostos presentes na levedura como os mananoligossacarídeos e nucleotídeos, quando utilizados em baixas dosagens, atuam positivamente no trato digestório e microbiota intestinal. Segundo Devresse (2001), os nucleotídeos dietéticos podem ter efeito no trato gastrointestinal aumentando o crescimento e a diferenciação das células. Nesse mesmo sentido, Burrels et al. (2001) destacaram respostas morfológicas diferenciadas dos intestinos de salmões alimentados com dieta suplementada com nucleotídeo, aumentando a superfície total do intestino.

Dessa forma, o presente estudo teve por objetivos avaliar o estado nutricional dos peixes alimentados com as rações contendo diferentes níveis de levedura íntegra, levedura autolisada e parede celular, por meio de possíveis diferenciações nos parâmetros hematológicos e verificar possíveis alterações macro e microscópicas no aparelho

digestório dos peixes.

Material e métodos

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista (Unesp), no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (*AquaNutri*) do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp, Câmpus de Botucatu, Estado de São Paulo.

Foram utilizados, durante 80 dias, 240 alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) revertidos sexualmente, com peso médio inicial de $2,22 \pm 0,07$ g, distribuídos aleatoriamente em quarenta aquários circulares com volume de 250 litros cada, numa densidade de estocagem de seis peixes/aquário. Para manutenção dos parâmetros físico-químicos da água, os aquários foram reabastecidos por sistema de circulação de água, dotados de filtro biológico e sistema de aquecimento controlado por termostato digital. A temperatura da água dos aquários foi aferida diariamente às 8h00 e às 16h00. Realizou-se o controle do pH e do teor de oxigênio dissolvido na água que foi mensurado semanalmente, respectivamente, por meio de oxímetro e peagâmetro digitais.

As rações experimentais foram formuladas de acordo com a exigência nutricional da espécie apresentada pelo NRC (1993). Estas se apresentaram isoprotéicas (32,0% de PD) e isocalóricas (3.200 Kcal ED kg^{-1} ração). Os tratamentos se caracterizaram pela suplementação da levedura íntegra, da levedura autolisada e da parede celular originária da fermentação de cana-de-açúcar e desidratadas pelo método *spray dry*. Os níveis utilizados foram, respectivamente, 1,0, 2,0 e 3,0% para as leveduras e 0,1, 0,2 e 0,3% para parede celular. Foi utilizada, ainda, uma ração controle a qual não foi suplementada pelos microingredientes em estudo. Dessa forma, foram obtidas dez rações (tratamentos) e quatro repetições (Tabela 1).

Após o período experimental, foram utilizados 3 peixes por repetição para determinação dos parâmetros hematológicos com peso médio de $73,62 \pm 8,32$ g. Os peixes foram anestesiados com benzocaína ($1,0 \text{ g } 15 \text{ L}^{-1}$) e o sangue foi coletado com auxílio de seringa de 1,0 mL por meio de punção do vaso caudal, banhada com anticoagulante EDTA a 3,0%. A contagem do número de eritrócitos foi realizada pelo método do hemocítômetro, em câmara de Neubauer, utilizando-se o azul de toluidina (Merck®) a 0,01%, diluído em solução fisiológica (0,9%), com pipeta de Thoma, na

Tabela 1. Composição porcentual e químico-bromatológica das rações experimentais.

Ingrediente (%)	Tratamento									
	Cont.	Levedura íntegra			Levedura autolisada			Parede celular		
		1,0%	2,0%	3,0%	1,0%	2,0%	3,0%	0,1%	0,2%	0,3%
Farelo de soja	66,00	66,00	65,50	65,00	66,00	65,50	65,00	66,00	66,00	66,00
Fubá de milho	17,10	16,10	15,60	15,10	16,10	15,60	15,10	17,00	16,90	16,80
Farelo de trigo	8,40	8,40	8,40	8,40	8,40	8,40	8,40	8,40	8,40	8,40
Levedura íntegra	-	1,00	2,00	3,00	-	-	-	-	-	-
Levedura autolisada	-	-	-	-	1,00	2,00	3,00	-	-	-
Parede celular	-	-	-	-	-	-	-	0,10	0,20	0,30
DL-metionina	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
Fosfato bicálcico	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90
Óleo de soja	3,59	3,59	3,59	3,59	3,59	3,59	3,59	3,59	3,59	3,59
Suplem. vit min ⁻¹	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Vitamina C	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
NaCl	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
BHT ²	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Composição calculada										
PD (%) ³	32,00	32,30	32,20	32,30	32,20	32,10	32,40	32,00	32,00	32,10
ED (kcal kg ⁻¹) ⁴	3200	3209	3212	3230	3215	3227	3235	3200	3210	3216
FB (%) ⁵	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
EE (%) ⁶	3,89	3,90	4,01	3,71	3,88	3,76	3,77	3,96	4,12	3,90
Cálcio (%)	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20	1,20
Pd (%) ⁷	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Metionina (%)	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
Lisina (%)	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70

¹Suplemento vitamínico e mineral: nível de garantia por kg do produto: Vit. A = 1.200.000 UI; vit. D3 = 200.000 UI; vit. E = 12.000 mg; vit. K3 = 2.400 mg; vit. B1 = 4.800 mg; vit. B2 = 4.800 mg; vit. B6 = 4.000 mg; biotina = 48mg; colina = 65.000 mg; niacina = 24.000 mg; Fe= 10.000 mg; Cu = 600 mg; Mn = 4.000 mg; Zn = 6.000 mg; I = 20 mg; Co = 2mg e Se = 20 mg; 8 Vitamina C: sal cálcica 2-monofosfato de ácido ascórbico - 42% de princípio ativo; ²BHT: Butil hidróxido tolueno; ³PD = Proteína Digestível; ⁴ED = Energia Digestível. Cálculos realizados com base nos valores de energia e proteína digestível do farelo de soja, milho, farelo de trigo, levedura íntegra, levedura autolisada e parede celular para tilápia do Nilo (Pezzato *et al.*, 2002; Hisano, 2005); ⁵FB = Fibra bruta; ⁶EE = Extrato etéreo; ⁷Pd = Fósforo disponível. Cálculos realizados com base nos valores de fósforo disponível do farelo de soja, milho e farelo de trigo para tilápia do Nilo (Gonçalves, 2003).

proporção 1:200; a taxa de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se kit comercial para determinação colorimétrica (Análise Diagnóstica[®]); a porcentagem de hematócrito foi obtida utilizando-se o método do microhematócrito e a proteína plasmática total por meio de refratômetro. Determinaram-se, ainda, os índices hematimétricos volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina globular média (CHGM), úteis para a classificação morfológica das anemias e para a avaliação da resposta eritropoiética.

Após a retirada de sangue, os peixes foram eviscerados para posterior análise macroscópica. Para proceder ao exame detalhado dos órgãos, foram realizadas três incisões, uma paralela ao dorso, na região abdominal ventral e duas no sentido dorso-ventral, sendo uma próxima ao opérculo e outra na abertura do poro urogenital. Assim, as vísceras ficaram expostas permitindo análise completa com a utilização de uma lupa com aumento de dez vezes e assumindo como critério de padrão avaliativo a coloração e a morfologia dos órgãos dos indivíduos do tratamento controle.

Na preparação do material para a análise microscópica, foi recolhida parte do terço medial do intestino de cinco peixes por tratamento. Após 24 horas de permanência na solução de Bouin, o material foi lavado em álcool 70,0% por várias vezes

para retirada do ácido pícrico e, em seguida, submetido à desidratação, por tratamento com álcool em concentrações crescentes (70,0 a 100,0%). As amostras foram então diafanizadas e incluídas em Paraplast[®]. Os cortes, com sete micrômetros de espessura, foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE).

Nas lâminas histológicas, foi avaliado o perímetro das vilosidades, sendo efetuadas vinte mensurações por intestino. Estes foram divididos em quatro quadrantes e, de cada, foi medido o perímetro de cinco vilosidades, estabelecidos dentro de um padrão morfológico encontrado para a maior parte dos vilos (Figura 1). A avaliação do perímetro foi realizada contornando as bordas das vilosidades intestinais, de sua base até a região do ápice, de acordo com metodologia proposta por Loddi (1998). As lâminas histológicas foram analisadas com o auxílio de microscópio ótico com aumento de 40x, acoplado ao sistema analisador de imagens Leica (Image-Pro Plus versão 4.5.0.27) pertencente ao Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ, Unesp – Botucatu, Estado de São Paulo.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com dez tratamentos e quatro repetições. Os resultados dos estudos foram avaliados por meio da técnica da análise de variância e, quando significativo, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de médias de Tukey (Stell e

Torrie, 1984). A análise incluiu os contrastes ortogonais entre totais de tratamentos (levedura íntegra, levedura autolisada e parede celular). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o procedimento General Linear Model (GLM) do pacote computacional SAS®.

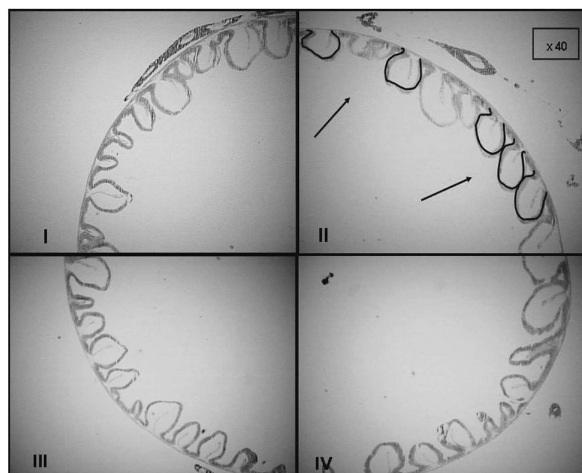


Figura 1. Esquema representativo para mensuração das vilosidades intestinais.

Resultados e discussão

Os valores médios e desvio padrão da temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água dos aquários durante o período experimental foram de $26,0 \pm 0,7^\circ\text{C}$, $7,1 \pm 0,3 \text{ mgL}^{-1}$ e $7,3 \pm 0,2$, respectivamente, resultados estes que estão dentro da faixa de conforto recomendada por Popma e Green (1990) para tilápias.

Parâmetros hematológicos

Os valores médios da contagem de eritrócitos, taxa de hemoglobina, porcentagem de hematócrito, proteína plasmática total, volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de juvenis de tilápia do Nilo alimentados, por 80 dias com rações contendo diferentes níveis de levedura íntegra (LI), de levedura autolisada (LA) e de parede celular (PC) estão apresentados na Tabela 2.

Considerando os resultados apresentados para os parâmetros sanguíneos avaliados, observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre os totais de tratamentos para o número de eritrócitos e para a taxa de hemoglobina. O desdobramento dos graus de liberdade, dentro da própria análise de variância, formado pelos contrastes ortogonais entre totais de tratamentos (LI, LA e PC) demonstraram que entre a LI e LA houve diferença significativa ($p < 0,05$) para número de eritrócitos, sendo que a LI proporcionou

maior número de eritrócitos. Observou-se, ainda, diferença entre a LA e a PC para taxa de hemoglobina, com maior valor para a PC.

Quando se comparou as médias dos diferentes níveis de LI, por meio do teste de Tukey, foi possível observar diferença ($p < 0,05$) para o número de eritrócitos e para o VGM. Os peixes alimentados com 2,0% de LI apresentaram maiores valores para estes parâmetros hematológicos em relação ao tratamento controle.

Tabela 2. Contagem de eritrócitos (Erit), hemoglobina (Hb), porcentagem de hematócrito (Htc), proteína plasmática total (PPT), volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de juvenis de tilápia do Nilo alimentados, por 80 dias, com rações contendo diferentes níveis de levedura e derivados.

	Erit ($10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	Hb (g dL^{-1})	Htc (%)	PPT (mg dL^{-1})	VGM [†] (fL)	CHGM [‡] (%)
Tratamento	($p < 0,05$)	($p < 0,05$)	ns	ns	ns	ns
LI ¹ x LA ²	($p < 0,05$)	ns	ns	ns	ns	ns
LI x PC ³	($p < 0,05$)	($p < 0,05$)	ns	ns	ns	ns
LA x PC	ns	($p < 0,05$)	ns	ns	ns	ns
Levedura Íntegra						
Controle	1,65 b	6,37	28,00	3,22	170,63 a	22,83
LI 1,0%	1,74 ab	6,32	28,37	3,32	162,17 ab	21,79
LI 2,0%	2,08 a	6,56	27,13	2,99	134,16 b	23,24
LI 3,0%	1,84 ab	6,73	29,25	3,35	158,87 ab	22,40
ANOVA	($p < 0,05$)	ns	ns	ns	($p < 0,05$)	ns
CV (%)	11,78	10,32	8,37	11,79	12,75	9,80
Levedura Autolisada						
Controle	1,65	6,37	28,00	3,22	170,63	22,83
LA 1,0%	1,82	6,36	28,37	3,01	156,13	22,76
LA 2,0%	1,69	6,42	26,90	2,76	160,55	23,88
LA 3,0%	1,67	6,05	27,64	3,22	166,57	22,27
ANOVA	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)	9,70	10,35	9,68	14,34	11,79	12,97
Parede Celular						
Controle	1,65	6,37 b	28,00	3,22	170,63	22,83 b
PC 0,1%	1,92	6,39 ab	28,00	2,95	147,00	22,80 b
PC 0,2%	1,75	7,54 a	28,70	3,04	166,27	26,28 a
PC 0,3%	1,69	6,99 ab	28,00	3,30	165,92	25,04 a
ANOVA	ns	($p < 0,05$)	ns	ns	ns	($p < 0,05$)
CV (%)	10,61	9,30	9,42	11,69	11,43	9,38

¹LI = levedura íntegra; ²LA = levedura autolisada; ³PC = parede celular; Coeficientes dos contrastes ortogonais: LxLI (Co=0, LI 1%=1, LI 2%=1, LI 3%=1, LA 1%=-1, LA 2%=-1, LA 3%=-1, PC 0,1%=0, PC 0,2%=0, PC 0,3%=0); LxPC (Co=0, LI 1%=1, LI 2%=1, LI 3%=1, LA 1%=0, LA 2%=0, LA 3%=0, PC 0,1%=-1, PC 0,2%=-2, PC 0,3%=-3); LxLA (Co=0, LI 1%=0, LI 2%=0, LI 3%=0, LA 1%=1, LA 2%=1, LA 3%=1, PC 0,1%=-1, PC 0,2%=-1, PC 0,3%=-1); Peso médio dos peixes: $73,62 \pm 8,32 \text{ g}$; [†]VGM (fL) = hematócrito x 10^6 / n° eritrócitos x 10^3 ; [‡]HGM (%) = (hemoglobina x 100)/hematócrito ns = não significativo; Médias seguidas por letras idênticas, na mesma coluna, não diferem pelo teste de Tukey.

As leveduras são consideradas excelentes fontes de vitaminas do complexo B e, segundo Halász e Laszity (1991), a levedura seca apresenta em sua composição de 0,2 a 2,0 mg kg^{-1} de vitamina B1; 3,0 a 6,0 mg kg^{-1} de vitamina B2; 4,0 a 5,0 mg kg^{-1} de vitamina B6 e 3,0 a 20,0 mg kg^{-1} de ácido pantotênico. Feldman (2000) ressaltou que as vitaminas essenciais para a eritropoiese são as vitaminas do complexo B, principalmente tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina, niacina, folato, e cianocobalamina (B6). No entanto, os níveis

utilizados neste estudo (até 3,0%) proporcionaram pequeno aporte de vitaminas do complexo B nas rações experimentais, sendo insuficientes para determinar efeitos marcantes na eritropoiese e aumentar significativamente o número de eritrócitos do tratamento contendo levedura íntegra.

De acordo com Tacon e Cooke (1980), quando a levedura é suplementada em altos níveis em dietas para truta arco-íris podem ocorrer efeitos prejudiciais como conseqüência de alterações metabólicas ocasionada pela quantidade elevada de ácidos nucléicos, que promovem maior ação de enzimas hepáticas, acúmulo de ácido úrico e uréia no sangue. Segundo estes mesmos autores, nesta situação, os peixes deverão apresentar quadro de anemia microcítica e anomalia eritrocitária. Alterações no padrão hematológico também foram observadas por Sánchez-Muniz *et al.* (1979, 1982), os quais utilizaram a levedura *Hansenula anomala* como única fonte protéica para truta arco-íris e constataram que os animais alimentados com levedura apresentaram anemia microcítica e hipocrômica, possivelmente em função da interferência desordenada no mecanismo de transferência do ferro. Estes autores observaram alterações morfológicas nos eritrócitos e degenerações oxidativas, possivelmente ocasionados pela produção de peróxido de hidrogênio gerado pelo catabolismo dos ácidos nucléicos.

Com relação à LA, não foi determinada diferença estatística para nenhum dos parâmetros avaliados, sendo este o tratamento que apresentou valores sanguíneos similares aos obtidos nos peixes do tratamento controle.

A PC quando suplementada em rações para alevinos de tilápia do Nilo apresentou diferença estatística entre as médias dos diferentes níveis utilizados em relação à concentração de hemoglobina. Foi observado que a suplementação de 0,2% de PC determinou efeito ($p < 0,05$) sobre a taxa de hemoglobina, quando comparado ao tratamento controle. Com relação à concentração de proteína plasmática total, não se observou influência dos diferentes níveis de levedura e derivados. Segundo Swenson (1996), as proteínas plasmáticas sintetizadas pelos tecidos linfóides e pelo fígado são identificadas como albumina, globulinas e fibrinogênio, podendo estar marcadamente reduzidas nas alterações hepáticas graves ou dietas prolongadas com deficiência de proteína.

Feldman (2000) relatou que, funcionalmente, as proteínas plasmáticas estão envolvidas na nutrição, manutenção da pressão osmótica, tamponamento, transporte de pequenos íons e moléculas, homeostase e

resistência a infecções. Os resultados deste estudo demonstraram, de forma indireta, que os níveis de proteína e de energia das rações foram adequados para manterem o desempenho produtivo dos peixes, não havendo diferença entre os diversos tratamentos para a quantidade de proteína plasmática total.

De acordo com Barros *et al.* (2004), a determinação dos valores hematológicos sofre influência das diferentes condições experimentais, metodologias, tamanhos dos peixes e tipos de alimentação utilizada, e destacam que a comparação dos resultados com pesquisas realizadas sobre as mesmas condições seria o parâmetro mais adequado. Os resultados do presente estudo apresentaram-se bastante similares, quando comparado aos observados por Barros *et al.* (2002); Kleemann (2003); Hisano *et al.* (2003); Barros *et al.* (2004), em estudos realizados sobre as mesmas condições experimentais. Estas pesquisas apresentaram os seguintes valores médios: $1,80 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ para os eritrócitos; 28,0% para o hematócrito; 8,46 g dL⁻¹ para hemoglobina; 161,55% para VGM e 27,30% para CHGM.

Constatou-se que as variações nos parâmetros hematológicos dos animais alimentados com LI, LA e PC, durante 80 dias, quando comparados entre si e com o tratamento controle, estão dentro da faixa de normalidade para a espécie. Não foi possível detectar sinais clínicos de anemia microcítica e hipocrômica e alterações morfológicas nos eritrócitos, como descrito por Sánchez-Muniz *et al.* (1979, 1982). Em estudo prévio com levedura íntegra, levedura autolisada e parede celular, Hisano (2005) observou que estes produtos demonstraram respostas de desempenho produtivo superiores e melhora no coeficiente de digestibilidade aparente, em relação ao controle, além de melhorar as características zootécnicas, não provocando alterações prejudiciais no padrão hematológico para tilápia do Nilo.

Análise macro e microscópica do aparelho digestório

Não se constatou diferenças macroscópicas quanto à morfologia do fígado e rins dos peixes submetidos aos diferentes tratamentos. Os fígados apresentaram coloração castanha clara e lobos bem definidos, segundo padrão de normalidade descrito por Roberts (1989). Nos demais órgãos avaliados, não foram observadas alterações macroscópicas de destaque.

Os perímetros (μm) das vilosidades do segmento referente ao terço medial do intestino de juvenis de tilápia do Nilo, alimentados com a ração controle e com as rações contendo os diferentes níveis de levedura íntegra, levedura autolisada e parede celular, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Perímetros das vilosidades (μm) do terço medial de intestinos de juvenis de tilápia do Nilo, alimentados com rações contendo diferentes níveis de levedura e derivados, durante 80 dias.

Contrastes ortogonais	Perímetro das vilosidades intestinais (μm)
Tratamento	($p < 0,05$)
LI ¹ x LA ²	($p < 0,05$)
LI x PC ³	($p < 0,05$)
LA x PC	($p < 0,05$)
Levedura Íntegra	
Controle	900,81 b
LI 1,0%	785,24 c
LI 2,0%	1048,35 a
LI 3,0%	914,47 b
ANOVA	($p < 0,05$)
CV (%)	19,90
Levedura Autolisada	
Controle	900,81 a
LA 1,0%	783,09 b
LA 2,0%	959,21 a
LA 3,0%	732,86 b
ANOVA	($p < 0,05$)
CV (%)	22,35
Parede Celular	
Controle	900,81 b
PC 0,1%	1011,95 a
PC 0,2%	931,19 ab
PC 0,3%	963,47 ab
ANOVA	($p < 0,05$)
CV (%)	21,42

¹LI = levedura íntegra; ²LA = levedura autolisada; ³PC = parede celular; Coeficientes dos contrastes ortogonais: LAxLI (Co=0, LI 1%=1, LI 2%=1, LI 3%=1, LA 1%=-1, LA 2%=-1, LA 3%=-1, PC 0,1%=0, PC 0,2%=0, PC 0,3%=0); LxPC (Co=0, LI 1%=1, LI 2%=1, LI 3%=1, LA 1%=0, LA 2%=0, LA 3%=0, PC 0,1%=-1, PC 0,2%=-2, PC 0,3%=-3); LAxPC (Co=0, LI 1%=0, LI 2%=0, LI 3%=0, LA 1%=1, LA 2%=1, LA 3%=1, PC 0,1%=-1, PC 0,2%=-1, PC 0,3%=-1); Médias seguidas por letras idênticas, na mesma coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey.

Observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre os totais de tratamentos (LI, LA e PC) para o perímetro das vilosidades intestinais. O desdobramento dos graus de liberdade, dentro da própria análise de variância, formado pelos contrastes ortogonais entre totais de tratamentos, demonstraram que houve diferença significativa para todos os contrastes formados, sendo que o tratamento contendo PC proporcionou maior perímetro para vilosidades intestinais.

Foi possível constatar diferenças significativas entre as médias dos diferentes níveis de LI suplementados na ração. O tratamento contendo 2,0% LI apresentou maior perímetro de vilosidades ($p < 0,05$), quando comparado aos demais tratamentos. Não houve diferença entre o tratamento suplementado com 3,0% de LI e o controle, no entanto, quando se comparou com o tratamento contendo 1,0% LI, este apresentou menor perímetro em relação aos demais.

Quando se comparou às médias dos perímetros das vilosidades intestinais dos animais que receberam rações suplementadas com LA, foi possível observar diferença significativa para os peixes alimentados com a ração controle e com 2,0% de LA, os quais apresentaram maior perímetro da vilosidade intestinal, sendo superiores ($p < 0,05$) aos

animais que receberam rações com 1,0 e 3,0% de LA. No entanto, entre o tratamento controle e 2,0% LA, assim como entre 1,0 e 3,0% LA, não houve diferença significativa.

Para os tratamentos contendo diferentes níveis de PC, foi possível observar diferença significativa ($p < 0,05$) entre os níveis utilizados neste estudo. O tratamento contendo 0,1% PC apresentou maior perímetro da vilosidade intestinal, sendo estatisticamente superior ao tratamento controle. Entretanto, quando comparado aos tratamentos contendo 0,2 e 0,3% PC, pôde-se verificar que não houve diferença ($p > 0,05$).

Existem poucos estudos em relação à ação da levedura e derivados sobre respostas morfofisiológicas do trato gastrointestinal de animais monogástricos. Em estudo com frango de corte, Iji et al. (2001) observaram que a suplementação de diferentes níveis de BioMos® (0,0; 0,1; 0,3 e 0,5%), produto comercial à base de mananoligossacarídeo, aumentou significativamente ($p < 0,01$) o comprimento do jejuno dos animais alimentados com 0,5%, quando comparado aos outros tratamentos. No entanto, os autores constataram que não houve influência dos diferentes níveis suplementados em relação a outros índices morfoométricos (profundidade de cripta, comprimento e área superficial das vilosidades, da porção do jejuno e íleo).

A respeito de outros derivados do processamento da levedura, pode-se destacar a utilização de nucleotídeos suplementados em rações animais, com respostas positivas no trato gastrointestinal e microbiota intestinal. Segundo Devresse (2001), os nucleotídeos dietéticos podem ter efeito no trato gastrointestinal aumentando o crescimento e a diferenciação das células, além de proporcionar resposta positiva na flora bacteriana de ratos, leitões e humanos. Também foram encontrados efeitos positivos no fígado melhorando as funções hepáticas.

Em peixes, cabe ressaltar a pesquisa desenvolvida por Burrells et al. (2001), que observaram respostas morfológicas diferenciadas dos intestinos de salmões alimentados com dieta suplementada com nucleotídeo. Neste mesmo estudo, os autores relataram que a média do comprimento da porção proximal, mediana e distal do intestino, assim como a superfície total do intestino dos peixes alimentados com a ração contendo nucleotídeo foram estatisticamente superiores aos que receberam a ração controle. Na porção proximal e medial, o aumento foi de 18,7 e 18,0%, respectivamente, enquanto na distal houve aumento de 21,4% em relação ao controle.

A levedura íntegra, a levedura autolisada e parede celular apresentam alto conteúdo em mananoligossacarídeos e nucleotídeos, os quais potencialmente influem sobre o trato e a microbiota intestinal de peixes. No presente estudo, entre totais de tratamento, a parede celular apresentou maior perímetro de vilosidade intestinal em relação aos demais tratamentos, indicando que a proporção entre os níveis e a característica dos nucleotídeos e nucleosídeos, assim como de alguns polissacarídeos, influenciaram positivamente na diferenciação e crescimento de células do epitélio intestinal.

Os polissacarídeos e nucleotídeos presentes na levedura íntegra, autolisada e parede celular também podem ter influenciado positivamente a microbiota intestinal, no entanto, o modo de atuação sobre o trato gastrointestinal e sua digestão e absorção ainda são pouco conhecidos em peixes e, todavia, não há relatos de efeitos prebióticos e modulação do crescimento e fixação de bactérias probióticas. Como ocorre em outras espécies, parece evidente que haja influência direta destes compostos, no entanto, esforços serão necessários para o levantamento de informações sobre o modo de ação e a classe de bactérias probióticas que poderiam beneficiar o animal e proporcionar melhor equilíbrio da microbiota intestinal.

Conclusão

Pode-se concluir que o período experimental e os níveis adotados neste estudo para levedura íntegra, levedura autolisada e parede celular não provocam alterações prejudiciais nos padrões hematológicos de tilápia do Nilo e podem ser utilizados com segurança para comporem rações para esta espécie e que a suplementação de parede celular proporciona maior perímetro das vilosidades intestinais.

Agradecimentos

Às seguintes empresas, pelo apoio científico: Usina Santo Antônio S.A. e Supremais Produtos Bioquímicos Ltda.

Referências

- BARROS, M.M. *et al.* Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2149-2156, 2002.
- BARROS, M.M. *et al.* Farinha de sangue tostada em dietas práticas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). *Acta Sci.*, Maringá, v. 26, n. 1, p. 5-13, 2004.
- BURRELS, C. *et al.* Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 2. Effects on vaccination, salt

water transfer, growth rate and physiology of Atlantic salmon. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 199, p. 171-184, 2001.

DEVRESSE, B. Nucleotides - a key nutrient for shrimp immune system. *Feed Mix*, Doetinchen, v. 8, p. 20-22, 2001.

FELDMAN, B.F. *Schalm's veterinary hematology*. 5. ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2000.

GONÇALVES, G.S. *Fitase na digestibilidade aparente de alimentos vegetais pela tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus)*. 2003. Dissertação (Mestrado)–Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

HALÁSZ, A.; LASZTITY, R. *Use of yeast biomass in food production*. USA: CRC, 1991.

HISANO, H. *Levedura desidratada íntegra, autolisada e parede celular como pró-nutriente para tilápia do Nilo*. 2005. Tese (Doutorado)–Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

HISANO, H. *et al.* Yeast and zinc on hematological parameters of Nile tilapia fingerlings *Oreochromis niloticus*. In: WORLD AQUACULTURE SOCIETY, 2003, Salvador. *Anais...* Salvador: WAS, 2003. p. 575.

HISANO, H. *et al.* Zinco e levedura desidratada de álcool como pró-nutrientes para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Sci.*, Maringá, v. 26, n. 2, p. 171-179, 2004.

IJI, P.A. *et al.* Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. *J. Sci. Food Agric.*, London, v. 81, p. 1186-1192, 2001.

KLEEMAN, G.K. *Exigência nutricional em ferro pela tilápia do Nilo Oreochromis niloticus*. 2003. Dissertação (Mestrado)–Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

LI, P.; GATLIN III, D.M. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops x M. saxatilis*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 219, p. 681-692, 2003.

LI, P.; GATLIN III, D.M. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops x M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 231, p. 445-456, 2004.

LODDI, M.M. *Aspectos produtivos e qualitativos do uso de probiótico para frangos de corte*. 1998. Dissertação (Mestrado)–Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

MENTEN, J.F.M. Aditivos alternativos na nutrição de aves: probióticos e prebióticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: SBZ, 2001. p.151-157.

NRC-National Research Council. *Nutrient requirements of fish*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1993.

ORTUÑO, J. *et al.* Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Spaurus auratus* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Amsterdam, v. 85, p. 41-50, 2002.

- PEZZATO, L.E. Uso da levedura desidratada na alimentação de peixes. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1997, Campinas. *Anais...* Campinas: CBNA, 1997. p. 13.
- PEZZATO, L.E. et al. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 1595-1604, 2002.
- POPMA, T.J.; GREEN, B.W. *Aquacultural production manual: Sex reversal of tilapia in earthen ponds*. International Center for Aquaculture. Ala. Agri. Exp. Sta., Alabama: Ed. Auburn University, 1990.
- ROBERTS, R.J. *Fish pathology*. 2. ed. Philadelphia: Ed. Elsevier, Ballure Tindael, 1989.
- SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J. et al. The yeast *Hansenula annala* as protein source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Hematological aspects. *Comp. Biochem. Physiol.*, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 153-157, 1979.
- SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J. et al. Alterations of erythrocytes of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by the use of *Hansenula annala* yeast as sole protein source. *Comp. Biochem. Physiol.*, Amsterdam, v. 72, n. 4, p. 693-696, 1982.
- STELL, R.G.D.; TORRIE, S.H. *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. 2. ed. Auckland: Mc Graw-Hill International, 1984.
- SWENSON, M.J. Propriedades fisiológicas e constituintes químicos e celulares do sangue. In: DUKES, H.H. et al. (Ed.). *Fisiologia dos animais domésticos*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 19-43.
- TACON, A.G.J.; COOKE, D.J. The nutrition value of dietary nucleic acids to trout. *Nutr. Rep. Inst.*, Stoneham, v. 22, n. 5, p. 631-640, 1980.

Received on October 19, 2006.

Accepted on December 05, 2006.