

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**UTILIZAÇÃO DO β - GLUCANO SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO,
INDICADORES DE ESTRESSE, PERFIL HEMATOLÓGICO E SOBREVIVÊNCIA DO
PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**

Marianne Schorer
Zootecnista

**JABOTICABAL
Estado de São Paulo - SP
2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**UTILIZAÇÃO DO β - GLUCANO SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO,
INDICADORES DE ESTRESSE, PERFIL HEMATOLÓGICO E SOBREVIVÊNCIA DO
PACU (*Piaractus mesopotamicus*)**

Marianne Schorer

**Orientador: Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes
Co – orientadora: Prof.^a Dr.^a Elisabeth Criscuolo Urbinati**

**Dissertação apresentada ao
Centro de Aqüicultura da
UNESP, como parte das
exigências para obtenção do
Título de Mestre em
Aqüicultura.**

**JABOTICABAL
Estado de São Paulo - SP
2008**

DEDICO,

A minha mãe, Karin (*in memoriam*), pelo carinho, incentivo e apoio para me tornar mestre.

A minha filha, Anna Laura, por fazer nascer uma mãe e deixar minha vida mais iluminada.

“O conhecimento nos faz responsáveis”

Ernesto Che Guevara

Agradecimentos

Aos meus pais, Karin Gisella Schorer, pelo carinho, dedicação e incentivo, e Hans Gerhard Schorer, pela oportunidade de proporcionar o aperfeiçoamento de meus estudos e pelo exemplo como pai e amigo.

Ao meu marido, Ian, pela paciência e companheirismo durante todo período experimental até minha defesa. Você é fundamental ao meu lado, sempre. Te amo.

A minha filha, Anna Laura, por me tornar ainda mais feliz, paciente e dedicada. Te amo.

As minhas irmãs, Lilian e Gabriela, que mesmo estando longe, sempre estiveram presentes na minha vida.

Ao meu orientador, prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes pela orientação, confiança e atenção neste projeto.

A minha co – orientadora prof. Dr.^a Elisabeth Criscuolo Urbinati, pela oportunidade do projeto, o qual tive muita satisfação em desenvolver, além do carinho e preocupação.

À professora das Bancas de qualificação e defesa, Dra. Fabiana Pilarski, pela disposição em auxiliar – me durante o ensaio de desafio com bactérias, pelo incentivo e confiança.

Ao professor da Banca de qualificação, Dr. Dalton José Carneiro, pelas sugestões ao trabalho e pela amizade.

Ao professor da Banca de defesa, Dr. Sérgio Zaiden, pelas críticas construtivas e sugestões para melhoria do trabalho.

Aos meus amigos, Ana Paula, Laurindo, Thiago Balboa, Mônica, Carlinha, Rafael Sabioni, Rafael, Michelle, Thiago Tilão, Fabrizia, Felipe, Paulo, Camillo, Roberson, Lara, Daniela e Pastor, valeu a disposição e o companheirismo durante as coletas.

A Damaris, pelo apoio técnico, amizade, confiança e carinho.

Aos funcionários do CAUNESP, Veralice, Valdecir, seu Mauro, Márcio (Garnizé), Daniel, Silvinha, Suely, Eliana e Paula pela constante colaboração e boa vontade.

A FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos e reserva técnica.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I – AÇÃO DO β – GLUCANO NA NUTRIÇÃO DE PEIXES.....	3
1. Revisão da Literatura.....	4
1.1. Saúde dos peixes.....	4
1.2. Imunoestimulantes	6
1.3. A utilização do β - glucano pelos peixes.....	11
2. Referências Bibliográficas.....	15
CAPÍTULO II – INFLUÊNCIA DO DESEMPENHO PRODUTIVO DO PACU, <i>Piaractus mesopotamicus</i> ATRAVÉS DE DIETAS SUPLEMENTADAS COM β – GLUCANO	21
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
1. Introdução.....	24
2. Material e Métodos.....	26
2.1. Local	26
2.2. Material Biológico e Condições Ambientais.....	26
2.3. Avaliações físico-químicas da água.....	26
2.4. Manejo Alimentar, Dietas Experimentais e Delineamento Experimental....	26
2.5. Avaliação dos parâmetros Zootécnicos.....	29

3. Resultados.....	30
3.1 Parâmetros físico –químicos da água.....	30
3.2. Desempenho zootécnico	30
4. Discussão.....	33
4.1 Parâmetros físico-químicos da água.....	33
4.2. Desempenho zootécnico....	33
5. Conclusão.....	37
6. Referências Bibliográficas.....	38
CAPÍTULO III – NÍVEIS DE INCLUSÃO DO β – GLUCANO EM DIETAS PARA O PACU SOBRE OS PARÂMETROS FISIOPATOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS	41
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	43
1. Introdução	44
2. Material e Métodos	47
2.1. Local	47
2.2. Material Biológico e Condições Ambientais	47
2.3. Avaliações físico – químicas da água	47
2.4. Manejo Alimentar, Dietas Experimentais e Delineamento Experimental....	47
2.5. Avaliação dos Parâmetros Biométricos, Metabólicos e Hematológicos.....	50
2.6. Análise Estatística	51
3. Resultados.....	52

3.1. Parâmetros físico – químicos da água	52
3.2. Cortisol	52
3.3. Glicemia	53
3.4. Proteínas Totais	54
3.5. Hematócrito	55
3.6. Eritrócitos	57
3.7. Hemoglobina	58
3.8. Volume Corpuscular Médio (VCM).....	59
3.9. Íons	61
3.9.1. Sódio – Na	61
3.9.2. Potássio – K	62
3.10. Cloretos	63
4. Discussão	64
4.1. Parâmetros físico- químicos da água	64
4.2. Cortisol	64
4.3. Glicemia.....	65
4.4. Proteínas Totais	66
4.5. Hematócrito	68
4.6. Eritrócitos	69
4.7. Hemoglobina	69
4.8. Volume Corpuscular Médio (VCM).....	70

4.9. Íons	71
4.9.1. Sódio – Na	71
4.9.2. Potássio – K	71
4.10. Cloretos	72
5. Conclusão	73
6. Referências Bibliográficas	74
CAPÍTULO IV – EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO β – GLUCANO, ATRAVÉS DA DIETA, NA RESISTÊNCIA DE JUVENIS DE PACU, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , INFECTADOS PELA BACTÉRIA <i>Aeromonas hydrophila</i> .	79
RESUMO	80
ABSTRACT	81
1. Introdução	82
2. Material e Métodos	84
2.1. Local	84
2.2. Material Biológico e Condições Ambientais	84
2.3. Avaliação dos Parâmetros físico – químicos da água.....	84
2.4. Manejo Alimentar, Dietas Experimentais e Delineamento Experimental....	84
2.5. Desafio com a bactéria <i>A. hydrophila</i>	86
2.6. Análise Estatística	87
3. Resultados	88
4. Discussão	91
5. Conclusão	93

6. Referências Bibliográficas.....	94
------------------------------------	----

Resumo:

Em peixes, o β - glucano apresenta uma potente função imunestimulante sendo cada vez maior a sua utilização como suplemento alimentar, aumentando significativamente a resistência à exposição infecciosa. Este prebiótico tem função de prevenir a colonização de patógenos por intensificar a ativação de macrófagos, proporcionando benefícios ao trato gastrointestinal e resultando em melhor desempenho e resistência a doenças. Este estudo teve a finalidade de avaliar os efeitos do β - glucano adicionado às rações peletizadas e extrusadas sobre o desempenho produtivo, indicadores de estresse, perfil hematológico e sobrevivência do pacu. Este experimento foi conduzido no Laboratório de peixes ornamentais, do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), em Jaboticabal, São Paulo. Foram utilizados 640 juvenis de pacu, com $24,7 \pm 2,0$ g, distribuídos em 32 aquários de vidro (130L). Os parâmetros físico – químicos da água foram mensurados quinzenalmente. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, uma pela manhã e outra ao fim do dia. Os experimentos apresentaram um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×4 , utilizando níveis de inclusão do β – glucano de: 0 (controle), 0,1%, 0,2% e 0,3% por kg/ ração. Os níveis de β -glucano avaliados neste estudo, não proporcionaram ganhos significativos no desempenho produtivo de juvenis de pacu, porém o tratamento 0,3% apresentou melhores resultados no GP, PF e TCE. A administração do β - glucano na dieta, durante todo período experimental, provocou alterações nos parâmetros hematológicos e indicadores de estresse do pacu. Os peixes alimentados com o β -glucano apresentaram maior resistência à infecção da bactéria *A. hydrophila*. Sendo assim, o tratamento 0,1% apresenta um custo/kg inferior e garante eficácia na saúde de juvenis de pacu.

Palavras-chave: pacu, β - glucano, imunestimulante, estresse, infecção bacteriana.

Abstract:

In fish, glucano has shown a potent immunostimulant function. The use of glucano is increasing significantly the resistance to diseases after infectious exposition. This prebiotic may prevent the bacterial colonization, and activated macrophages, been beneficial to the digestive tract, resulting in better performance and disease resistance. This study will evaluate the glucano effects added in palletized and extruded diets of fish, analyzing fish performance, stress indicators, hematological profile and survival of pacu. This study was driven in Laboratory of ornamental fish, on Centro de Aqüicultura of UNESP (CAUNESP), in Jaboticabal, São Paulo. Were used 640 pacu juveniles, with $24,7 \pm 2,0$ g, distributed in 32 aquarium (130 L). The physical and chemical water parameters were measured every two weeks. Fish were fed twice a day, in the morning and another at the end of the day. In this trial were used 640 pacu juveniles (24.7 ± 2.0 g) distributed in 32 aquariums (20 fish/aquarium). Throughout the experimental period, water remained at 26.5°C and the others limnological parameters (dissolved oxygen, pH, alkalinity, ammonia and conductivity) stayed within normal values for the specie. The experimental trial design was entirely casualized in factorial scheme 2×4 , evaluating two proceeding of diets (extruded and pelletized) and four β - glucan levels in diets: 0 (control), 0.1%, 0.2% and 0.3% with four repetitions. In this study, β - glucan levels do not provide significant gains on pacu juveniles performance, but treatment with 0,3% β - glucan showed better results of weight gain, weight final and specific growth rate. The administration of glucan in the diet, caused changes in hematological parameters and stress indicators in pacu. The fishes fed with glucan showed greater resistance to infection with *A. hydrophila*. Thus, treatment with 0,1% of glucan presented a lower cost/kg and shows efficiency in health of pacu juveniles.

Palavras-chave: pacu, β - glucan, immunostimulant, stress, bacterial disease.

CAPÍTULO I.

AÇÃO DO β - GLUCANO NA NUTRIÇÃO DE PEIXES

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Saúde dos peixes

Manter boas práticas de manejo para controlar a saúde dos peixes é de vital importância para o sucesso na criação de peixes. Para isso é fundamental se ter um conhecimento das causas de doenças que são responsáveis pelas mortalidades dos peixes.

A ocorrência de doenças em piscicultura é conseqüência de diversos fatores envolvidos nos métodos zootécnicos de criação e de variações nas condições ambientais. Mudanças das condições adequadas da concentração de oxigênio dissolvido, pH, temperatura, salinidade, elevadas concentrações de amônia e de CO₂, bem como a presença de poluentes na água, manejo zootécnico, captura e transporte, fazem parte de ampla variedade de situações capazes de induzir o estresse em peixes (WEDEMEYER, 1969; YADAV & AKELA, 1993; ALKAHEM, 1994).

As variações são conseqüências do tipo, intensidade e o tempo de duração do efeito estressante e a espécie de peixe considerada. Além disso, peixes alimentados com rações desbalanceadas ou mal nutridos são susceptíveis às bactérias patogênicas e oportunistas (STOSKOPF, 1993; WOO & BRUNO, 1998).

Como os peixes estão constantemente expostos a uma diversidade de agentes biológicos muitas vezes nocivos como bactérias, vírus, fungos e parasitas (IWAMA & NAKANISHI, 1996). O sistema imune dos peixes apresenta-se bastante intrigante e complexo em relação às doenças e previne a propagação de infecções. Esta imunidade na maioria das espécies de peixes é parecida (ZELIKOFF *et al.*, 2000), e assemelha-se ao sistema imune dos mamíferos (ZELIKOFF, 1998; BEAMAN *et al.*, 1999), o sistema imunológico não-específico consiste em componentes que suprem a proteção inata contra infecções, indiferente do tipo do patógeno (SUNYER & LAMBRIS, 1998). O sistema complementar é composto por um enorme número de proteínas, e todas elas geram o fator C3, que já foi descrito e isolado em espécies de peixes teleósteos

(NAKAO & YANO, 1998). O sistema complementar dos peixes pode ser comparado ao de mamíferos, mas com algumas diferenças já descritas. Em geral, o sistema complementar das vias alternativas é mais ativo em peixes do que em mamíferos. Este sistema possui um elemento importante tanto no sistema inato quanto no sistema imunológico adaptativo, e em peixes são descritos como vias alternativas, líticas e clássicas (SAKAI, 1992; MATSUSHITA *et al.*, 1998; SUNYER & LAMBRIS, 1998). As vias alternativas e líticas são mecanismos imunológicos hereditários antigos, presentes em invertebrados e vertebrados. A via alternativa é acionada por vários microorganismos não-específicos; já a via lítica não foi ainda estudada em teleósteos (MATSUSHITA *et al.*, 1998), mas sabe-se que pode ser ativada pela ligação da manose na superfície de microorganismos. Estas vias se convergem a um meio lítico, que conduzem a um processo de fagocitose de um microorganismo.

A promoção de respostas imunes efetivas contra agentes infecciosos pelo uso de componentes imunoestimulantes na dieta, foi recentemente demonstrada com diversas espécies de peixes (VOLPATTI *et al.*, 1998) e é uma consequência do reforço humoral e das respostas imunes por células mediadoras (YANO *et al.*, 1991; CHEN & AINSWORTH, 1992; SIWICKI *et al.*, 1993; VERLHAC *et al.*, 1996). Contudo, as informações sobre os efeitos da maioria dos imunoestimulantes e a ativação das respostas imunes no sistema não – específico ainda é limitado, particularmente na medida em que os lisozimas são mediadas por atividades hemolíticas devido a alguma causa (HARDIE *et al.*, 1990; RAA *et al.*, 1992; VOLPATTI *et al.*, 1998). A atividade plasmática complementar foi identificada como um mecanismo não – específico de defesa poderoso contra bactérias, fungos, vírus e (MULLER-EBERHARD, 1988; SUNYER & TORT, 1995; TORT *et al.*, 1996).

Para maior realce, a saúde dos peixes é otimizada pela defesa imune com pró - nutrientes. Imuno - moduladores promovem desempenho quando utilizados para reduzir a mortalidade devido a doenças, e para aumentar a resistência de espécies de cultivo (RAA, 2000). Componentes imuno - modulatórios podem

reduzir os efeitos negativos causados pelo estresse, no sistema imune dos peixes em sistemas de produção intensiva (KLESIUS *et al.*, 2000; SIWICKI *et al.*, 1998).

Sabe-se que vários grupos de substâncias possuem efeito imuno - modulatório em animais terrestres; porém, somente alguns apresentaram eficiência em peixes (RAA *et al.*, 1992; SIWICKI *et al.*, 1998; VOLPATTI *et al.*, 1998). Peptidoglicanos, β - glucanos e mananas apresentaram efeitos imunomodulatórios no sistema não-específico de diversas espécies animais, incluindo dos peixes (MATSUO & MIYAZONO, 1993; YOSHIDA *et al.*, 1995). A alimentação com β -1, 3/ 1, 6-glucano pode aumentar a produção de anticorpos contra patógenos presentes no ambiente, assim como aumentar a defesa celular não-específica (RAA *et al.*, 1992; RAA, 1996).

Os glucanos (elementos estruturais da parede celular de fungos) são capazes de reforçar a imunidade inata, aumentando as lisozimas plasmáticas e complementos, além de estimular a atividade fagocitária dos macrófagos nas diversas espécie de peixes (YANO *et al.*, 1991; CHEN & AINSWORTH, 1992; JORGENSEN *et al.*, 1993; GALEOTTI, 1998). O aumento da resistência contra infecções por patógenos oportunistas foi observada após a administração de glucanos no salmão do Atlântico (ROBERTSEN *et al.*, 1990; RAA *et al.*, 1992) e em truta arco-íris (JENEY & ANDERSEN, 1993).

1.2. Imunoestimulantes

Na indústria de rações, nos últimos 50 anos, os antibióticos têm sido usados na produção animal em diferentes espécies de interesse zootécnico, tanto no tratamento de infecções bacterianas do trato gastrointestinal, como no papel de agentes promotores do crescimento. A utilização de antibióticos com o objetivo de melhorar o ganho de peso e a conversão alimentar ocorreu inicialmente de forma discreta, evoluindo posteriormente para o uso amplo e generalizado na indústria de alimentação animal (FLEMMING, 2005).

O uso de promotores de crescimento (antibióticos) como moduladores de microorganismos no trato gastrointestinal ocorreu inicialmente em doses baixas,

com resultados significativos sobre os parâmetros produtivos e, posteriormente, com uso continuado, houve necessidade de doses crescentes até exaurir-se a droga com poucos efeitos significativos (FLEMMING, 2005). Este fato determinou o aparecimento de microorganismos resistentes a diferentes drogas utilizadas com intuito de promover o crescimento e a produção dos animais (LANCINI, 1994).

A utilização de antibióticos promotores de crescimento pertencentes aos mesmos grupos de drogas empregadas em terapêutica determinou o aparecimento de formas microbianas resistentes e prejudiciais à saúde animal e humana, despertando a atenção das autoridades governamentais envolvidas com a saúde pública (BOLDUAN, 1999; EDENS, 2003).

No entanto, é fato crescente a restrição, em todo o mundo, ao uso de antibióticos em doses sub - terapêuticas como aditivos na nutrição animal, devido à possibilidade do desenvolvimento de resistência bacteriana (FURLAN *et al.*, 2004). Neste contexto, ingredientes de origem microbiana como probióticos e prebióticos merecem especial atenção como uma alternativa ao uso dos antibióticos.

Em junho de 1999, a Comunidade Econômica Européia (CEE) banuiu o uso de alguns antibióticos promotores de crescimento na alimentação de animais em função do aparecimento de resistência infecciosa às várias drogas usadas em terapia na medicina humana (FLEMMING, 2005). A busca pela eficiência alimentar de animais de produção, é um ponto crítico a ser considerado nas criações comerciais. Muitos aditivos, dentre eles os antibióticos, são rotineiramente utilizados em rações para controlar agentes patogênicos, promovendo melhora nos índices zootécnicos e maximizando a produção.

Os probióticos são produtos cultivados ou suplementos alimentares vivos de origem microbiana, que possuem efeitos benéficos a saúde do hospedeiro melhorando seu equilíbrio intestinal. O primeiro probiótico descoberto, já há algum tempo, foi o *Lactobacillus* sp., bactéria responsável em produzir ácido lático. Sua função é prevenir a colonização de bactérias nocivas no intestino, um processo conhecido como exclusão competitiva (ABIDI, 2003).

Os recursos característicos dos micróbios probióticos são a sua capacidade de colonização do trato gastrintestinal; porém a microflora intestinal de animais aquáticos muda rapidamente devido ao constante afluxo de micróbios vindos da água e do alimento. A comunidade microbiana do intestino pode ser considerada transitória na natureza (ABIDI, 2003). Probióticos também apresentam efeitos antagônicos de organismos através da competição com outras espécies, antagonismos específicos contra outras espécies e antagonismos não-específicos. Algumas das bactérias antagonistas que atuam contra patógenos de peixes e mariscos são os esporos do *Bacillus*, *Roseobacter* sp., *Cornobacterium divergens*, *Pseudomonas* sp., *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio harveyi*, *V. anguillarum*, *Edwardasiella*, *Aeromonas*, e *Pastrella* (BRIGHT-SINGH *et al*, 2001).

O papel dos probióticos na saúde dos peixes já foi bastante estudado (BAIRD (1977), ROBERTSEN *et al.* (1990), METAILLIER & HOLLOCOU (1993), GOPALANNAN *et al.* (2001), MOHAMMAD (2001) e KARUNASAGAR (2001)). A maioria destes probióticos foi isolada do mar, extraídas de algas unicelulares marinhas chamadas de *Tetraselmis suecica* e *Ulva fasciata*. Várias bactérias foram examinadas com potencial probiótico para peixes. Enquanto se utiliza os probióticos efetivo para um controle de doenças, é necessário o cuidado em sua escolha, pois alguns deles podem potencializar o efeito patogênico em animais aquáticos (ABIDI, 2003).

Os prebióticos são compostos não digeridos por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo animal, mas seletivamente fermentados pelos microorganismos do trato gastrintestinal (TGI) que podem estar presentes nos ingredientes da dieta ou adicionados a ela através de fontes exógenas concentradas (GIBSON & ROBERFROID, 1995; ROY & GIBSON, 1998).

Atualmente estes compostos vêm sendo utilizados como alternativa aos promotores de crescimento com o objetivo de manter o equilíbrio benéfico da microbiota intestinal, especialmente em animais jovens ou em eminente condição de estresse (SILVA & NÖRNBERG, 2003). Sendo assim, indiretamente os prebióticos também podem atuar no sistema imune e enzimático por promover o crescimento das populações de bactérias benéficas (*Lactobacillus* e

Bifidubacterium), que tem a capacidade de produzir substâncias com propriedades imunoestimulatórias e interagir com o sistema imune em vários níveis, incluindo a proliferação de células mononucleares, a fagocitose macrofágica, a eliminação e a indução de síntese de grandes quantidades de imunoglobulinas (SILVA & NÖRNBERG, 2003).

Uma vez que os prebióticos estimulam o crescimento e a ativação de bactérias benéficas - que atuam positivamente no sistema imune e promovem melhorias no ambiente e no epitélio intestinal - espera-se que o uso desses compostos também se reflita de forma desejável no desempenho animal. Mas é muito importante observar que a maior parte das dietas animais são compostas por ingredientes derivados de grãos de cereais (milho, trigo) e oleaginosas (grão de soja, farelo de soja) os quais apresentam níveis variados de polissacarídeos não amiláceos (PNA) e oligossacarídeos não-digestíveis (OND) em sua composição química. Considerando que ambos os grupos são formados por compostos indigestíveis e potencialmente fermentáveis pela microbióta intestinal, supõe-se que a falta de resposta em relação à adição de um determinado prebiótico pode estar vinculada a um efeito “diluídor” dos PNA e OND derivados dos próprios ingredientes (AMARAL, 2002). Ainda segundo este autor, muitas vezes, os níveis destes compostos nos grãos e subprodutos são mais elevados que os adicionados na dieta como prebiótico (0,05 a 3%).

Entre os prebióticos mais estudados como aditivos na alimentação animal estão os frutoligossacarídeos (FOS), glucoligossacarídeos (GOS) e mananoligossacarídeos (MOS). Os FOS são polímeros de frutose de cadeia curta, não-digestíveis, resistentes a hidrólise, alcançando o cólon intacto e fornecendo substrato para a microbióta (ROBERFROID, 1996). GOS e MOS são obtidos a partir de parede celular de leveduras. A parede celular de leveduras consiste principalmente de proteína e carboidrato, e contém os dois principais açúcares (glucose e manose) em proporções semelhantes e N-acetilglucosamina. Estudos de metilação indicam que a manose é ligada por ligações alfa 1 – 6, 1 – 2, 1 - 3 e é representada principalmente por mananoligossacarídeos (BALLOU, 1977). Durante processos de proliferação microbiana, as bactérias aderem-se as

células epiteliais, ligando-se a estas através de uma fimbria em sítios de ligação específicos ricos em resíduos de manose (MILES, 1993). Os prebióticos têm a capacidade de usar esta semelhança entre os sítios de ligação dos enterócitos ricos em manose com os mananoligossacarídeos adicionados à dieta, diminuindo a fixação de patógenos na mucosa e facilitando a sua expulsão juntamente com o quimo alimentar através do trato gastrintestinal por mecanismos fisiológicos normais (FLEMMING, 2005). Os MOS apresentam uma alta afinidade ligante, oferecendo um sítio ligante competitivo para bactérias patogênicas Gram negativas, que apresentam a fimbria tipo 1 específica para oligossacarídeos (FLEMMING, 2005). Leslie (1996) verificou que a microbiota benéfica pode utilizar os mananoligossacarídeos como fonte de energia, ao contrário da maioria dos patógenos.

Dentre vários imunostimulantes, o glucano apresenta-se a parte pelo seu modo de ação que já foi claramente estabelecido. Quando administrado internamente no organismo do animal, o glucano é imediatamente identificado, e pronto para agir assim que o animal necessitar, causando respostas de reações imunes (KUMAR *et al.*, 2005).

Em mamíferos, o polissacarídeo insolúvel β - glucano, demonstrou potente efeito no sistema imunológico não-específico e defesa anti -bacteriana (DI LUZIO, 1985;). Injeções intraperitoniais com glucano em peixes demonstraram respostas imunes na atividade dos macrófagos (JENEY & ANDERSON, 1993; JORGENSEN *et al.*, 1993a; JORGENSEN *et al.*, 1993b), ativação complementar e nível de lisozimas (ENGSTAD *et al.*, 1992). Além disso, alguns estudos mostraram a influência das injeções com glucanos na defesa anti- bactericida e eficiência das vacinas (YANO & MANGINDAAN, 1989; ROBERTSEN *et al.*, 1990; NIKL *et al.*, 1991; YANO *et al.*, 1991; AAKRE *et al.*, 1994). Quando administrados oralmente, os glucanos são capazes de estimular as respostas imunes e a resistência a doenças nos peixes (RAA *et al.*, 1992; NIKL *et al.*, 1993; SIWICKI *et al.*, 1994).

1.3. A utilização do β - glucano pelos peixes

Os custos com alimentação são bastante altos em um sistema de criação intensivo e, por isso, torna-se necessária a preocupação com a formulação de rações balanceadas que permitam melhor assimilação de nutrientes pelos peixes, conferindo uma carcaça com maior teor de proteína e menor teor de gordura.

Os imunostimulantes compreendem um grupo de compostos biológicos ou sintéticos que aumentam a eficiência dos mecanismos de defesa específicos e não específicos. São considerados imunostimulantes combinações vitamínicas, traços minerais e produtos derivados de plantas ou animais que se mostram efetivos na prevenção de doenças. Embora o modo de ação de tais substâncias não seja bem caracterizado, elas podem ser injetadas ou incorporadas ao alimento. Os resultados podem ser testados por meio de modelos experimentais com animais adequados para tal fim, com a determinação de parâmetros imunes ou por meio de desafio com patógenos (SIWICKI *et al.*, 1994).

Na aquicultura a utilização de alimentos para promover a saúde é um assunto em crescente desenvolvimento. O crescimento saudável dos peixes requer o desenvolvimento de resistência contra a invasão de agentes patogênicos. Vários estudos sobre efeito de imunostimulantes já foram realizados com diversas espécies de peixes, mostrando aumento da defesa imunológica (VERLHAC & GABAUDAN, 1994). O uso de imunostimulantes (prebióticos) está começando a ser introduzido na criação de peixes, como medida profilática.

Os β - glucanos consistem de ligações de glucose com ligações glucosídicas β -1,3 e β - 1, 6, sendo uma das estruturas mais importantes de polissacarídeos provenientes da parede celular de bactérias, fungos e plantas (ROBERTSEN *et al.*, 1990). Alguns estudos avaliaram os efeitos de glucano na imunidade dos peixes, primeiramente com cultura *in vitro* de macrófagos (COOK *et al.*, 2001; DALMO *et al.*, 1995), mas o foco maior é com estudo *in vivo* (ROBERTSEN *et al.*, 1990; AACRE *et al.*, 1994; SAHOO & MUKHERJEE, 2001; ORTUÑO *et al.*, 2003).

Grande parte destes autores realizaram estes estudos utilizando injeções intraperitoniais, devido a eficiência e rapidez do método (ROBERTSEN *et al.*, 1990; CHEN & AINSWORTH, 1992; MATSUYAMA *et al.*, 1992; JØRGENSEN *et al.*, 1993); o consumo de tempo e mão-de-obra é impraticável para a aqüicultura. A administração oral apresentou maior eficiência na administração de glucano (SIWIKI *et al.*, 1994; SAKAI, 1999), mostrando em estudos, aumento das respostas não-específicas e resistência a doenças nos peixes (EFTHIMIOU, 1996; SAHOO & MUKHERJEE, 2001; ORTUÑO *et al.*, 2003). De qualquer modo, o β - glucano tem seu efeito variado conforme as dosagens utilizadas, o período do regime alimentar e o tipo de glucano.

Inicialmente, o β - glucano demonstrou estimular mecanismos “antitumor” e aumentando a resistência dos hospedeiros contra microorganismos patogênicos no milho (DI LUZIO, 1985). Recentemente os glucanos vêm provando sua efetiva capacidade imunoestimulante na imunidade e resistência a doenças nos peixes (CHEN & AINSWORTH, 1992; BAGNI *et al.*, 2005).

O β - glucano é um polissacarídeo obtido através da parede celular de leveduras e fungos. Normalmente, a fonte mais utilizada para a obtenção do β -glucano é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Estas leveduras são unicelulares e suas células apresentam-se alongadas e ovaladas. São abundantemente encontradas em frutas cítricas, cereais e vegetais (FLEMMING, 2005). São espécies de valor econômico, pois algumas de suas cepas são utilizadas em processos industriais na elaboração de produtos fermentados. As leveduras sofreram modificações genéticas e seleções ao longo do tempo a fim de se adaptarem a processos específicos, com maior grau de viabilidade técnica e econômica.

Kumar *et. al.* (2005) sustentam a hipótese que o β -glucano derivado de leveduras causa benefícios, como aumento superior da imunidade, em relação à β – glucanos derivados de cevada, bactérias e fungos. Ainda segundo estes autores, isso se atribui às diferenças na estrutura molecular e suas formas, que resultam em baixo rendimento de β - glucano, na forma com propriedades imunomodulatórias.

Ortuño *et al.* (2003) observaram que a administração oral desta levedura, a qual se apresenta rica em níveis de glucano, aumentou as respostas imunes inatas do *Sparus aurata*. Quando administrado oralmente, o glucano provou sua proteção efetiva em grande parte de espécies de peixes contra uma variedade de bactérias patogênicas como *Aeromonas hydrophila* (KWAK *et al.*, 2003; SELVARAJ *et al.*, 1998), *Edwardsiella tarda* (SAHOO & MUKHERJEE, 2002), *Vibrio salmonicida* (RAA *et al.*, 1992).

É cada vez maior o uso de glucano na alimentação dos peixes, aumentando significativamente a resistência à exposição infecciosa (JENEY & ANDERSON, 1993). Este prebiótico tem função de prevenir a colonização de patógenos por intensificar a ativação de macrófagos, proporcionando benefícios ao trato gastrointestinal e resultando em melhor desempenho e resistência a doenças.

É comprovado que o glucano funciona como um potente imunostimulante em mamíferos e peixes (ROBERTSEN *et al.*, 1990; ROBERTSEN, 1999). Em peixes eles podem ativar os macrófagos, aumentando sua capacidade de fagocitar patógenos (JORGENSEN *et al.*, 1993b; JORGENSEN & ROBERTSEN, 1995; COOK *et al.*, 2003). Estes autores citam que o β - glucano mostrou participar em alguns fatores imunes não-específicos, como lisozimas e atividades complementares (ENGSTAD *et al.*, 1992; PAULSEN *et al.*, 2001).

Os mecanismos pelo qual o glucano reforça a imunidade dos peixes até o momento não é muito esclarecida. Em mamíferos, a existência de receptores de glucano nos macrófagos e neutrófilos já foram reveladas, e o primeiro passo para interação entre o glucano e os fagócitos envolvem uma ligação entre o glucano para os receptores (WILLIAMS, 1993; WILLIAMS *et al.*, 1996). Em peixes, os receptores de glucano também relataram sua existência em macrófagos (ENGSTAD & ROBERTSEN, 1993; AINSWORTH, 1999).

Alguns estudos mostraram que o glucano reforça a imunidade não-específica através da ativação direta dos macrófagos (SAKAI, 1999; ROBERTSEN, 1999). O reforço na porcentagem de fagocitose e atividade respiratória celular dos macrófagos renais, após alimentação com dosagens baixas do β - glucano, apresentaram influência na ativação dos macrófagos, e conseqüentemente a

imunidade dos peixes. Entretanto, os mecanismos exatos dos efeitos do glucano na imunidade de peixes necessitam de maiores pesquisas neste assunto (AI *et al.*, 2007).

Segundo Ai *et al.* (2007) a alimentação com dosagens altas do β – glucano apresentaram imunossupressão ou alterações na regulação do feedback, resultados semelhantes perante outros estudos (ROBERTSEN *et al.*, 1994; CASTRO *et al.*, 1999). Pode se afirmar que dosagens altas do β – glucano induzem diretamente a respiração celular, que após certo período podem causar um esgotamento na atividade celular (AI *et al.*, 2007). Contudo, a atividade das lisozimas em peixes alimentados com altas dosagens de glucano foi maior, sugerindo diferentes respostas dos parâmetros imunológicos para cada dosagem do β – glucano.

Para obter melhores efeitos do glucano na imunidade dos peixes deve se levar em consideração de como será realizada sua administração, a dosagem e o regime alimentar para cada espécie (SAKAI, 1999).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- AAKRE, R.; WERGELAND, H.I.; AASIORD, P.M.; ENDRESEN, C. Enhanced antibody in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacteria containing β - 1,3 - M - Glucan as adjuvant. **Fish & Shellfish Immunology**. V. 4, p. 47 – 61, 1994.
- ABIDI, R. Use of probiotics in larval rearing of new candidate species. **Aquaculture Asia**, v.8, n.2, p.15-16, 2003.
- AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, L. TAN., B., ZHANG, W.; XU, W., LI, H. Effects of dietary β -1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker *Pseudosciana crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 394 – 402, 2007
- ALKAHEM, H.F. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. **Journal of University Kuwait Science**, v.21, p.243-252, 1994.
- Education** 33 (pp. 131–152,1999.
- ALKAHEM, M. F. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on hematological parameters and behavior of the fish, *O. niloticus*. **Journal of the University of Kuwait**, v. 21, p. 243 – 252, 1994.
- AMARAL, C. M. C. Extrusão e peletização de ração completa: Efeito no desempenho, na digestibilidade e no desenvolvimento das câmaras gástricas de cabritos saanen. **Dissertação de Mestrado**. Jaboticabal, SP. p. 73, 2002.
- BAIRD, D.M. Probiotics help boost feed efficiency. **Feedstuffs**, 49: 11-12, 1977.
- BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOIA, M.G.; ABELLI, L.; SCAPIGLIATI, G.; TISCAR, P.G.; SARTI, M.; MARINO, G. Short- and long term effects of a dietary yeast β – glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 18, p. 311 – 325, 2005.
- BALLOU, C. E. A study of the immunochemistry of three yeast mannans. **Journal of Biological Chemistry**, Illibois, n. 245, p. 1197 – 1203, 1977.
- BEAMAN, J.R.; GARDNER, H.; HOFFMAN, F.; ROSENCRANCE, A.; ZELIKOFF, J.T.. 1999. Mammalian immunoassays for predicting the toxicity of malathion in a laboratory fish model. **J. Toxicol. Environ. Hlth.**, v. 56, p. 523-542, 1999.
- BOLDUAN, G. Feeding weaner pigs without feedantibiotics. In:**Biotechnology in the feed industry**. Nottingham: Nottingham University Press,. p. 223-230, 1999.
- CASTRO, R.S., LEITE, R.C., RESENDE, M. et al. A labelled avidin-biotin ELISA to detect antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goats' sera. **Vet. Res. Commun.**, 1999.
- CHEN, D., AINSWORTH, A.J. Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel catfish. *Ictalurus punctatus* Rafinesque. **J. Fish Disease**. v. 15, p. 295-304, 1992.
- COOK, M. T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.; HAYBALL, J.D. The efficacy of a commercial β – glucan preparation EcoActiva™, on stimulating respiratory burst activity of head – kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, p. 661 – 672, 2001.

- COOK, M. T.; HAYBALL, P. J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.F.; HAYBALL, J.D. Administration as a commercial immunostimulant preparation EcoActiva™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory bursts and the growth rate of snapper (*Pagrus aurata*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 14, p. 333 – 345, 2003.
- DALMO, R.A.; INGEBRIGTSEN, K.; BOGWALD, J.; HORSBERG, T.E.; SELDJELID, R. Accumulation of immunomodulatory laminaran B - (1.3) - D-glucan] in the spleen and kidney of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 18(6), 545-553, 1995.
- DI LUZIO, N.R. Update on the immunomodulating activities of glucans. *Springer Semin. Immunopathol.* v. 8, p. 387-400, 1985.
- EDENS, F. W. An alternative for antibiotics use in poultry: probiotics. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 75 – 97, 2003.
- EFTHIMIOU, S. Dietary intake of 1, 3/1, 6 glucans in juvenile dentex (Dentex dentex). Sparidae: effect on growth performance, mortalities and non-specific defense mechanisms. **J Appl Ichthyol.**, v. 12, p. 1 – 7, 1996.
- ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. recognition of yeast cell wall glucan by atlantic salmon (*Salmon salar* L.) macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**. v.17, p.319, 1993.
- ENGSTAD R, ROBERTSEN B, FRIVOLD E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 2, p. 287 – 297, 1992.
- FLEMMING, J. S. Utilização de levedura, probiótico e mananoglicosacarídeo (MOS) na alimentação de frangos de corte. **Tese de Doutorado**. Curitiba, PR. p.111, 2005.
- FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. **5º Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição**. Balneário Camburiú, SC. p. 23, 2004.
- GALEOTTI, M., Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. **J. Appl. Ichthyol.** 14, 189±199, 1998.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, p. 401-412, 1995.
- GOPALAKANNAN, A., NOWSHEEN, J., RAMYA S. AND ARUL, V. Biocontrol of *Aeromonas hydrophila* using lactic acid bacteria. *Nat. Work. Aquaculture Medicine, School of Environmental Studies*, Cochin University of Science and Technology, Cochin, Kerala, Jan., 18-20, 2001(Abs.) : 68-69.
- HARDIE LJ, FLETCHER TC, SECOMBES CJ. The effect of dietary vitamin C on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 87(1):1e13, 1990.
- IWAMA, K.; NAKANISHI, T. The fish immune system:organism, pathogen and environment. San Diego, **Academic Press**, ISBN: 0123504392, 1996.
- JENEY, G.; ANDERSON, D. P. Immunoestimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam,v. 34, p. 379-389, 1993.

- JORGENSEN, J.B., LUNDE, H., ROBERTSEN, B. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **J. Fish Dis.** 16, 313– 325, 1993a.
- JORGENSEN, J.B.; SHARP, G.J.E.; SECOMBES, C.J.; ROBERTSEN, B. Effect of yeast cell wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages, **Fish Shellfish Immunol.** 3 (1993), pp. 267–277, 1993b.
- JORGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. Yeast b-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. **Developmental and Comparative Immunology.** v. 9, p. 43–57.
- KARUNASAGAR, I. Probiotics and bioremediators in Aquaculture. Nat. Work. **Aquaculture Medicine**, School of Environmental Studies Cochin University of Science and Technology, Cochin, Kerala, Jan., 18-20, 2001(Abs.): 52-53.
- KLESIUS, P.H.; EVANS, J.J.; SHOEMAKER, C.A. Communicable bacterial diseases in fish farming: Prevention by vaccination and immunostimulation. **Panamerican Congress of Veterinarian Science**, 2000.
- KUMAR, V.; SAURABH, S.; SAHU, N. P.; PAL, A. K. B – Glucan, a feed Additive to Manage Aquatic Animal Health. **Aqua Feeds: Formulation & Beyond**, v. 2, issue 3, 2005.
- KWAK, J. K.; PARK, S. W.; KOO, J. G.; CHO, M. G.; BUCHHOLZ, R.; GOETZ, P. Enhancement of the Non – Specific Defence Activities in carp (*Cyprinus carpio*) and flounderedr (*Paralichthys olivcaces*) by Oral Administration of Schizophyllan. **Acta Biotechnol.** V. 23, p. 359 – 371, 2003.
- LANCINI, J.B. Fatores exógenos na função gastrointestinal, aditivos. In: **FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA.** Fisiologia da digestão e absorção das aves. Campinas, 1994. p.99- 126.
- MATSUO, K.; MIYAZONO, I. The influence of long - term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 59, p.1377-1379, 1993.
- MATSUYAMA H, MANGINDAAN E.P., YANO T. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). **Aquaculture**, v.101, p. 197 – 203, 1992.
- 1992;
- MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; NONAKA, M.; FUJITA, T. Complement-related serine proteases in tunicates and vertebrates. **Current Opin. Immunol.**, v. 10, p. 29-35, 1998.
- METAILLIER, R; HOLLOCOU, Y. Feeding of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles on the diets containing probiotics. In : **Fish Nutrition in Practice.** S. J. Kanshik and P. Luquet (eds.) (ASFA 1: 24 (5): 279.Institut De la Recherche Agronomique, Paris. France : 429-432,1993.
- MOHAMED, K.S. K. Use of *Lactobacillus* sp. as gut probiotics in aquaculture. Nat. Work. **Aquaculture Medicine**, School of Environmental Studies Cochin University of Science and Technology, Cochin, Kerala, Jan., 18-20, 2001(Abs.)
- MULLER-EBERHARD H.J., Molecular organization and function of the complement system. **A. Rev. Biochem.** 57 pp. 321–347,1988.
- NAKAO, M.; YANO T. Structural and functional identification of complement components of the bony fish, carp (*Cyprinus carpio*). **Immunol. Rev.** v. 166, p.27- 38, 1998.

- NIKL, L., ALBRIGHT, L.J., EVELYN, T.P.T., 1993. Trials with an orally and immersion-administered β -1,3 glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. **Dis. Aquat. Org.**, v.17, p. 191-196, 1993.
- NIKL, L., ALBRIGHT, L.J., EVELYN, T.P.T. Influence of seven immunostimulants on the immune response of coho salmon to *Aeromonas salmonicida*. **Dis. Aquat. Org.**, v. 12, p. 7-12, 1991.
- ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish Shellfish Immunol.**, v. 14, p. 145– 156, 2003.
- PAULSEN, S.M.; ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish & Shellfish Immunol.**, v. 11(1), p. 23-37, 2001.
- RAA, J., RORSTAD, G., ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: Diseases in Asian Aquaculture I (ed. by M. Shariff, R.P. Subasinghe & J.R. Arthur), pp. 39–50. Proceedings of the First Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 26–29 November 1990. **Asian Fisheries Society**, Manila, Philippines, 1992.
- RAA, J. The Use of Immunostimulatory Substances in Fish and Shellfish Farming. **Reviews in Fisheries Science**, v. 4(3), p. 229-288, 1996.
- RAA, J. The use of immune – stimulants in fish and shellfish feeds. **Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola**. Mérida, Yucatán, México. p. 19 – 22, 2000.
- ROBERFROID, M.B. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: Chicory fructooligosaccharides. **Nutr. Rev.**, Washington, DC., v.54, p.S38-S42, 1996.
- ROBERTSEN, B., RORSTAD, G., ENGSTAD R., RAA, J. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Journal of Fish Diseases.**, v. 13, p. 391–400, 1990.
- ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 9:269 – 290, 1999.
- ROY, M.; GIBSON, G.R. Probiotics and prebiotics – microbial in menu. **C-H-O Carbohydrates**, v.9, n.3, 6p., 1998.
- SAKAI, D.K. Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. **Ann. Rev. Fish Dis.**, p. 223-247, 1992.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 172, p. 63-92, 1999.
- SAHOO, P.K. & MUKHERJEE, S.C. Effect of dietary β -1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, p. 683–695, 2001.
- SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. Effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian

- major carp (*Labeo rohita*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 12, p. 1–16, 2002.
- SAS-STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE, Inc. **SAS user's guide: Statistics**. Cary: SAS Inst., Inc. 1998, 956p.
- SELVARAJ, G. et al. Incidence of disabilities among multi-bacillary cases after initiation of multidrug therapy and factors associated with the risk of developing disabilities. **Indian Journal Leprosy**, v. 70, p.11-16, 1998. Supplement.
- SILVA DA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 983-990, 2003.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. **Limnologia aplicada à Aqüicultura**. Jaboticabal: FUNEP, 1995.
- SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 41, p. 125- 139, 1994.
- SIWICKI, A.K., MORAND, M., KLEIN, P.; STUDNICKA, M.; TERECH-MAJEWSKA, E. Modulation of nonspecific defence mechanisms and protection against diseases in fish. **Acta Vet. Brno.**, v. 67, p. 323-328, 1998.
- STOSKOPF, M. Anaesthesia. *In*: Brown, L. (ed.). **Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine**. Pergamon Veterinary Handbook Series. London. p.161-168, 1993.
- SUNYER, J.O., LAMBRIS, J.D. Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. **Immunol. Rev.** 166, 39–57, 1998.
- SUNYER, J.O.; TORT, L. Natural haemolytic and bactericidal activities of sea bream (*Sparus aurata*) are affected by the alternative complement pathway. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 45, pp. 333–345, 1995.
- TORT L, GOMEZ E, MONTERO D, SUNYER JO. Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: their suitability in stress and dietary studies. *Aquaculture International*;4:31e 41, 1996.
- VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; OBACH, A.; SCHÜEP, W.; HOLE, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, 143: 123-133, 1996.
- VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. **Aquaculture and Fisheries Management**, v.25, p.21-36, 1994.
- VOLPATTI, D., L. D'ANGELO, G. JENEY, Z. JENEY, D. P. ANDERSON, AND M. GALEOTTI. Non specific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. *J. Appl. Ichthyol.* **14**, 201±206, 1998..
- YADAV, J. e AKELA, B.P. 1993 Aldrin induced haematological changes on the common Indian catfish, *Clarias batrachus* (Linn). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 18(4): 156-159.
- YANO, T.; MANGINDAAN, R.E.P.; MATSUYAMA, H., 1989. Enhancement of t resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some beta 1-3 glucans. **Nippon Suisan Gakkaishi.**, v. 55, p. 1815-1819, 1989.
- YANO, T., MATSUYAMA, H.; MANGINDAAN, R.E.P. Polysaccharide- induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. **Journal of Fish Diseases**, v. 14, p. 577–582, 1991.

- YOSHIDA, T.; KRUGER, R.; INGLIS, V. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. **Journal of Fish Diseases**, v. 18, p. 195–198, 1995.
- WEDEMEYER, G. Stress-induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology** 29: 1247-1251, 1969.
- WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W. **Fish disease and Disorders**. Vol. 3, 626 – 633, 1998.63. ZELIKOFF, J. T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals. **Toxicology**, v. 129, p. 63- 71, 1998.
- ZELIKOFF, J.T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non – mammalian sentinel species: predictive value for mammals? **Toxicology**, 129 (1): 63 – 71, 1998.
- ZELIKOFF, J.T.; RAYMOND, A.; CARLSON, E.; LI, Y.; BEAMAN, J.R.; ANDERSON, M. Biomarkers of immunotoxicity in fish: from lab to ocean. **Toxicol. Lett.**, 112-113:325-331, 2000.

CAPÍTULO II.

INFLUÊNCIA DO DESEMPENHO PRODUTIVO
DO PACU, *Piaractus mesopotamicus* ATRAVÉS
DE DIETAS SUPLEMENTADAS COM β –
GLUCANO

Resumo

O emprego do β – glucano na alimentação de peixes, é cada vez maior, graças ao aumento da resistência a doenças e por promover benefícios ao trato gastrointestinal, resultando em melhor desempenho produtivo. Este trabalho teve como objetivo avaliar a utilização do prebiótico β -glucano em rações peletizadas e extrusadas no desempenho produtivo de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Foram utilizados 640 juvenis de pacu ($24,7 \pm 2,0$ g) distribuídos em 32 aquários de vidro com capacidade volumétrica de 130L (20 peixes/caixa). Durante todo período experimental, a água permaneceu a uma temperatura de $26,5^{\circ}\text{C}$ e os outros parâmetros limnológicos (oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade e amônia) permaneceram dentro dos níveis adequados para a espécie. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×4 , avaliando dois processamentos das dietas (extrusadas e peletizadas) com quatro níveis de inclusão do β - glucano nas rações: 0 (controle), 0,1%, 0,2% e 0,3% com quatro repetições. Neste primeiro estudo os dados de ganho de peso, peso final, taxa de crescimento específico, consumo e conversão alimentar foram coletados e avaliados aos 15, 30, 60 e 90 dias. Os resultados obtidos mostraram que os níveis de β - glucano avaliados neste estudo não proporcionaram melhoras na performance do desempenho produtivo de juvenis de pacu. Apesar de não significativo, os peixes alimentados com o nível de 0,3% de β – glucano apresentaram melhor ganho de peso, taxa de crescimento específico e peso final.

Palavras–chave: pacu, imunoestimulante, processamento de ração.

Abstract

The employment of glucan in fish feeding is increasing significantly since improves resistance to diseases and provides benefit to the gastrointestinal tract, resulting in better productive performance. The objective of this study was to determinate the efficiency of the prebiotic β -glucan in pelletized and extruded diet, in the productive performance of pacu juveniles *Piaractus mesopotamicus*. In this trial were used 640 pacu juveniles (24.7 ± 2.0 g) distributed in 32 aquariums (20 fish/aquarium). Throughout the experimental period, water remained at 26.5°C and the others limnological parameters (dissolved oxygen, pH, alkalinity, ammonia and conductivity) stayed within normal values for the specie. The experimental trial design was entirely casualized in factorial scheme 2×4 , evaluating two proceeding of diets (extruded and pelletized) and four β - glucan levels in diets: 0 (control), 0.1%, 0.2% and 0.3% with four repetitions. In this first trial, datum of gain weight, final weight, specific growth rate and consumption and food conversion were collected and assessed 90 days. The results submitted that β -glucan levels analyzed in this study didn't provide significant gains on productive performance in pacu juveniles. Although not significant, the fish fed with dietary of β -glucan (0.3%) presented better weight gain, specific growth rate and final weight.

Key - words: pacu, immunostimulant, feed processing

1. Introdução

Atualmente as atividades agropecuárias têm tido grande destaque na economia mundial entre elas a produção de peixes, que apresenta índices de crescimento superiores às demais atividades rurais. Em conseqüência, há um maior interesse em se investir na nutrição dos animais, visando uma melhor performance produtiva e econômica na criação.

A produção de peixes no Brasil ainda apresenta resultados modestos de desenvolvimento devido aos processos de produção adotados e a falta de informação sobre espécies nativas com potencial zootécnico (PRIETO *et al.*, 2005).

As perdas de nutrientes para o meio aquático influenciam diretamente o desempenho animal pela redução no aproveitamento dos nutrientes que serão perdidos por lixiviação ou por deteriorização na qualidade da água (FURUYA *et al.*, 1997).

Segundo Vielma *et al.* (2000), os custos de produção com ração para o salmão do Atlântico produzido em tanque-rede representam em torno de 50% para a indústria. Daí a importância da integridade estrutural do pelete, durante o manejo e transporte para assegurar menores custos de produção e menores perdas para o meio ambiente. Contudo, apesar dessa importância dada pela indústria aquícola, o insucesso com as partículas extrusadas acabou recebendo uma maior atenção.

O processo de aquecimento controlado propicia aumento da disponibilidade nutrientes contidos nos ingredientes da ração, otimizando a eficiência alimentar, aumentando a digestibilidade, diminuindo a produção de resíduos e reduzindo a carga de efluentes que comprometem a qualidade da água (ALBERNAZ *et al.*, 2000).

Em função disso, dietas peletizadas e extrusadas são amplamente preconizadas na alimentação de peixes principalmente durante os períodos de crescimento e terminação.

Avanços em estudos genéticos de peixes vêm aumentando nos últimos anos, e a nutrição ganha maiores entraves e limitações para obter uma produção

eficiente no crescimento e propagação de novas espécies na aquicultura. Para obter uma maximização da performance, a dieta deve atender as necessidades dos nutrientes essenciais na forma de concentração correta, assim como pró-nutrientes para maximizar a saúde e desempenho dos peixes. Uma nutrição equilibrada pode ajudar o peixe a demonstrar todo seu potencial genético no desempenho produtivo e melhor resistência a doenças.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG 1887) é uma espécie largamente distribuída na bacia dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (GODOY, 1975), onde a espécie tem grande importância na pesca comercial, sendo cultivado principalmente nas regiões Sul e Sudeste e, nos últimos anos, em outros estados do Brasil (VALENTI *et al.*, 2001; URBINATI & GONÇALVES, 2005).

Não existem estudos comparando a eficiência de dietas extrusadas e peletizadas testando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dietas de peixes, foco deste estudo. Porém, AARSETH *et al.* (2006), testaram um tipo de levedura vermelha, *X. dendrorhous*, em dietas de salmão, e observou sua capacidade de fermentar açúcares produzindo altas quantidades de astaxantina como fator pigmentante de sua carne (JOHNSON *et al.*, 1980). A parede celular da *X. dendrorhous* possui uma estrutura composta por polissacarídeos estruturais e proteínas, a qual se assemelha a estrutura da levedura a qual se extrai o β – glucano. Segundo estes autores não houve diferenças na eficiência desta levedura em relação às temperaturas de extrusão, que foram de 100° e 140°C.

Este estudo teve por finalidade testar a eficácia do prebiótico β -glucano em rações peletizadas e extrusadas no desempenho produtivo de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

2. Materiais e Métodos

2.1. Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Peixes Ornamentais, do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), em Jaboticabal, São Paulo. A análise bromatológica das dietas foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), do Departamento de Zootecnia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP.

2.2. Material Biológico e Condições Ambientais

Foram utilizados 640 juvenis de pacus, *Piaractus mesopotamicus*, com peso inicial de $24,7 \pm 2,0$ g, distribuídos em 32 aquários de vidro (130L) (20 peixes/caixa). A água foi proveniente de poço artesiano, a qual foi sifonada e renovada diariamente. O sistema foi provido de aeração contínua e controle de temperatura ($26,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$).

2.3. Avaliações físico-químicas da água

A temperatura média dos aquários foi aferida diariamente com um termômetro de máxima e mínima. As determinações de alcalinidade total (mg de CaCO_3/L) e amônia ($\mu\text{g}/\text{L}$) foram realizadas no Laboratório Central do Caunesp. O oxigênio dissolvido (mg O_2/L) e potencial hidrogênionico (pH) foram realizadas quinzenalmente utilizando oxímetro e pHâmetro digital.

2.4. Manejo Alimentar, Dietas Experimentais e Delineamento Experimental.

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, uma pela manhã (9:00 hrs.) e outra ao final do dia (17:00 hrs), e o consumo foi medido e registrado. A distribuição de ração foi realizada até não haver mais procura pelos peixes, para evitar sobras. A formulação e a composição das dietas experimentais são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Formulação e composição percentual e calculada das dietas experimentais
 Table 1 – Percentual and calculated composition of experimental diets

Ingredientes <i>Ingredients</i>	Controle (0%)	T1 (0,3%)	T2 (0,2%)	T3 (0,1%)
Farelo de Soja <i>Soybean meal</i>	45,5	45,5	45,5	45,5
Milho <i>Corn</i>	22	22	22	22
Farelo de Trigo <i>Wheat bran</i>	15	15	15	15
Farinha de peixe <i>Fish meal</i>	13	13	13	13
Bagaço de cana <i>Cane sugar bagasse</i>	1,5	1,4	1,3	1,2
Óleo de Soja <i>Soybean oil</i>	1,5	1,5	1,5	1,5
Sup. vitamínico mineral ² <i>Viatmin ans Mineral premix</i>	1,5	1,5	1,5	1,5
β - glucano ¹ <i>β - glucan</i>	0	0,1	0,2	0,3
Total	100	100	100	100

Tabela 2 – Percentual calculado das dietas experimentais
 Table 2 – Percentual calculated of experimental diets

Composição química <i>Chemical composition</i>	% de inclusão <i>% inclusion</i>
Matéria Seca <i>Dry matter</i>	89,91
Proteína bruta <i>Crude protein</i>	32,06
Energia bruta (kcal/kg) <i>Gross energy</i>	4096,03
Extrato etéreo <i>Ether extract</i>	3,18
Fibra bruta <i>Crude fiber</i>	4,48
Matéria mineral <i>Ashes</i>	7,34
Extrato não nitrogenado ³ <i>Nitrogen free extract</i>	38,53

¹ Nos níveis 0,0, 0,1, 0,2 e 0,3% as diferenças foram preenchidas com elemento inerte.

² Suplemento vitamínico mineral Rovimix peixe: vit. A: 5000.000 UI; vit. D3: 200.000 UI; vit. E: 5.000 UI; vit. K3: 1000 mg; vit. B1: 1500 mg; vit. B2: 1500 mg; vit. B6: 1500 mg; vit. B12: 4000 mg; vit. C: 15000 mg; ácido fólico: 500 mg; ácido pentotênico: 4000 mg; B.H.T.: 12,25 g; biotina: 50 mg; inositol: 1000 mg; nicotinamida: 7000 mg; colina: 40 g; cobalto: 10 mg; cobre: 500 mg; ferro: 5000 mg; iodo 50 mg; manganês: 1500 mg; selênio: 10 mg; zinco: 5000 mg; veículo q. s. q. : 1000 mg.

³ ENN (%) = MS (%) - (PB (%) + EE (%) + FB (%) + MM (%)).

As rações peletizadas foram produzidas na Unidade de Preparação de Rações do Centro de Aqüicultura da Unesp e na Fábrica de Rações da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – Campus de Jaboticabal e as rações extrusadas na em uma fábrica de ração comercial.

O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4, avaliando-se dois processamentos das dietas (extrusadas e peletizadas) com quatro níveis de inclusão do β - glucano nas rações sendo: controle, 0,1%, 0,2% e 0,3%. Cada tratamento constou de quatro repetições. O aditivo β - glucano utilizado é um prebiótico rico em beta-glucanos, extraídos da levedura *Saccaromyces cerevisiae* de cepas selecionadas. Esse ingrediente se encontra em forma de pó fino, bege ou marrom claro, seco em spray dryer (Tabela 3). Como a percentagem de pureza do glucano é de 85 %, foi realizado um cálculo de regra de três para que as rações tivessem uma inclusão de 100% do produto.

Tabela 3 - Características físicas e químicas do β – glucano (g/ 100g do produto)
 Table2 – Physical and chemical characteristics of β – glucan (g/ 100 g of product)

Ingredientes <i>Ingredients</i>	% de inclusão <i>% of inclusion</i>
Totais de β - glucano <i>β - glucano total</i>	Min. 85,0
Proteínas totais (N x 6,25) <i>total protein</i>	Máx. 4,0
Umidade total (105 +/- 2°C) <i>total moistness</i>	Máx. 10,0
pH (solução 10%) <i>ph (10% solution)</i>	4,6 - 6,0
Capacidade de absorção da água (ml/g) <i>water absorption capacity</i>	6,6
Metais pesados ppm <i>heavy metals</i>	< 2

2.5. Avaliação dos parâmetros Zootécnicos

Para avaliar o desempenho dos peixes, estes foram pesados no início do experimento e aos 30, 60 e 90 dias. Após a punção caudal, para retirada de sangue, os peixes foram pesados e foi medido o comprimento.

O ganho de peso dos peixes (GP) foi calculado por:

- $$GP (g) = \frac{\text{peso médio final} - \text{peso médio inicial}}{\text{tempo de experimento (dias)}}$$

Para determinação da taxa de crescimento específico (TCE) foi empregada a seguinte equação:

- $$TCE (\%/dia) = \frac{(\ln) \text{ peso total final} - (\ln) \text{ peso total inicial} \times 100}{\text{tempo de experimento (dias)}}$$

O consumo total de ração foi determinado por:

- $$\text{Consumo} = \frac{\text{ração pesada no início} - \text{sobras do final}}{\text{tempo de experimento (dias)}}$$

A conversão alimentar aparente (CA) foi obtida a partir da seguinte equação:

- $$CA = \frac{\text{consumo total de ração (g)}}{(\text{ganho de peso dos peixes (g)} \times (\text{no de peixes na parcela}))}$$

2.6. Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (teste F) e, quando detectadas diferenças, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5% de confiabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS 9.0.

3. Resultados

3.1 Parâmetros físico –químicos da água

Os parâmetros físicos e químicos foram mensurados aleatoriamente por aquário e descritos na tabela 3.

Tabela 4 – Valores médios \pm desvio padrão e coeficiente de variação dos parâmetros físicos e químicos da água dos aquários de juvenis de pacu.

Table 4 – Means values \pm standard variation of physical and chemical parameters of aquarium water of pacu juveniles.

	Tratamentos <i>Treatments</i>	CV% <i>Variance coefficient</i>
Temperatura ($^{\circ}$ C) <i>Temperature</i>	26,25 \pm 0,92	1,02
Alcalinidade (mg/L) <i>Alcalinity</i>	82,4 \pm 4,25	3,33
Amônia (μ /L) <i>Ammonia</i>	8,87 \pm 1,34	2,57
Oxigênio dissolvido (mg/L) <i>Dissolved oxygen</i>	3,52 \pm 1,68	5,87
pH <i>pH</i>	7,74 \pm 0,27	3,66

3.2. Desempenho Zootécnico

De acordo com os resultados apresentados na tabela 5, não foram observadas diferenças significativas em relação ao ganho de peso pelos processamentos com a ração extrusada e peletizada. O peso final também não foi influenciado pelos processamentos. O nível 0,3% de inclusão do prebiótico proporcionou, no último período experimental um ganho de peso 7,3% superior ao grupo controle. Em uma produção de larga escala de peixes este índice pode representar um impacto econômico significativo na atividade produtiva. Apesar de não haver diferenças significativas entre os resultados de ganho de peso entre os processamentos das rações, a ração extrusada mostrou melhores resultados de desempenho produtivo que a ração peletizada.

A mesma tendência ocorreu com o peso final onde o maior nível de inclusão do β – glucano induziu a um crescimento 5% superior dos peixes que não

receberam o prebiótico na dieta, porém estatisticamente não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Não ocorreram diferenças significativas na taxa de crescimento específico dos peixes em relação ao processamento das rações e aos níveis de inclusão do β - glucano nas dietas. Pode se observar que apesar de não significativo, que as maiores taxas de crescimento específico, para o tratamento com 0,3%.

No presente estudo os peixes não apresentaram diferença de consumo entre as rações peletizada e extrusada. Entretanto o consumo da ração extrusada foi superior em relação à ração peletizada. O nível 0,3% de β -glucano na dieta proporcionou maior consumo.

Os processamentos das rações avaliadas proporcionaram diferenças na conversão alimentar dos peixes, apesar de não significativo. Entretanto a ração extrusada apresentou maior conversão em relação à ração peletizada.

Tabela 5 – Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para ganho de peso (G.P.), peso final (P.F.), taxa de crescimento específico (T.C.E.), consumo e conversão alimentar (C.A.) para juvenis de pacu.

Table 5 - F values, coefficient of variance (C.V.) and means gotten for body weight (B.W.), final body weight (F.W.), specific growth rate (S.G.R.), consumption and food conversion (F.C.) for pacu juveniles.

Estatísticas Statistics		Período Experimental (0 - 90 dias) Experimental period (0 - 90 days)				
		G.P. B.W.	P.F. F.W.	T.C.E. S.G.R.	CONS CONSUMPTION	C.A. F.C.
Valores para F F values	Processamento (P) Processment	0,86ns	0,79ns	0,30ns	0,05ns	0,41ns
	Níveis (N) Levels	0,72ns	0,1ns	0,13ns	0,07ns	0,1ns
	Interação (P x N) Interactions	0,32ns	1,71ns	0,59ns	0,54ns	0,39ns
	CV	21,58	0,14	17,76	22,83	23,7
Médias Processamento Processment Means	Ração Extrusada Extruded diet	42,79	51,0	1,95	141,77	3,02
	Ração Peletizada Pelletized diet	43,36	52,03	1,82	120,68	2,82
Médias Níveis Levels Means	Controle (0%) Control	41,05	52,0	1,85	113,64	2,43
	0,30%	45,87	54,7	2,14	153,2	3,18
	0,20%	41,68	48,33	1,76	135,32	3,23
	0,10%	43,7	52,75	1,8	122,75	2,84

ns – não significativo

* (p < 0,05)

CV – coeficiente de variância (%)

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (p<0,05).

4. Discussão

4.1 Parâmetros físicos e químicos da água

Os resultados demonstraram que a qualidade da água dos aquários não foi alterada, sendo que os parâmetros avaliados permaneceram de acordo com os padrões recomendados por SIPAÚBA-TAVARES (1995) e KUBITZA (2000). Em relação ao oxigênio dissolvido a tolerância para muitas espécies de peixes é de 1 a 9 mg/L, sendo que a faixa ideal requerida pelas espécies está relacionada com a fase de crescimento e reprodução, embora a maior parte das espécies tenham uma exigência acima de 5 mg/L (BOYD 1982).

4.2. Desempenho Zootécnico

Apesar de não haver diferenças significativas entre os resultados de ganho de peso entre os processamentos das rações, a ração extrusada mostrou-se mais eficiente em relação à ração peletizada. Este fato pode ser explicado por que, segundo ANDRIGUETO *et al.* (1981), as rações e matérias-primas extrusadas melhoram a eficiência alimentar e em alguns casos, melhoraram significativamente a palatabilidade dos ingredientes ou rações, proporcionando melhor desempenho dos animais.

EFTHIMIOU (1996) em dietas com β - glucano para o “sea bass” não observou diferenças significativas no ganho de peso. HARDIE *et al.* (1990) e HARDIE *et al.*, (1991), administrou oralmente este imunostimulante em “Dentex”, *Dentex dentex*, e Salmão do Atlântico, *Salmo salar*, também não observaram diferença no ganho de peso dos peixes alimentados com diferentes níveis de β - glucano em relação ao grupo controle. Resultados contraditórios foram obtidos por estudos realizados por AI *et al.* (2007) onde o aumento no ganho de peso do “Yellow croaker” (*Pseudosciaena crocea*) foi atribuído ao uso de dosagens baixas de glucano (0,09%/ kg de ração) durante 8 semanas. Contudo, o crescimento não foi favorecido quando estes autores utilizaram dosagem maior (0,18%) de β -

glucano, sugerindo que o uso baixas dosagens fornecem uma suplementação adequada para otimizar o ganho de peso desta espécie.

Autores como WIGGLESWORTH & GRIFFITH (1994) observaram em camarões (*Penaeus monodon*) uma alta capacidade de digestão do β - glucano, sugerindo que o ganho de peso aumentou pelos benefícios energéticos através deste prebiótico. Para peixes não existem evidências a respeito, portanto os mecanismos que promovem o crescimento pela ação do β - glucano ainda não foram completamente identificados nos peixes (Al *et al.*, 2007). Porém segundo LOPÉZ *et al.*, (2003) este aumento no ganho de peso pode estar relacionado com a provável degradação do β -glucano pela glucanase produzindo energia, permitindo o uso de mais proteínas favorecendo o crescimento.

Avaliando diferentes processamentos de ração para o acará – bandeira (*Pterophilum scalare*), RODRIGUES & FENANDES (2006) obtiveram resultados semelhantes aos desse experimento, onde as melhores médias de crescimento específico foram apresentadas pelos peixes alimentados com a dieta extrusada, porém não se diferindo estatisticamente das obtidas com a ração peletizada.

MISRA *et al.*, (2006) avaliando o β - glucano no *Labeo rohita* observaram aumento da taxa de crescimento específico (TCE) nos tratamentos com inclusão de 0,25 e 0,5% kg^{-1} . Contraditoriamente, Al *et al.* (2007) testando níveis de β - glucano na dieta do “yellow croaker”, *Pseudosciana crocea*, observaram uma TCE significativamente maior nos peixes do tratamento com 0,09% de inclusão deste prebiótico em comparação com o tratamento controle. Porém ao nível de 0,18% de β - glucano a TCE não se diferenciou do grupo controle. COOK *et al.* (2003), em estudos com o “snapper” (*Pagrus auratus*, Sparidae) e HIDALGO *et al.* (2006), alimentando juvenis de dentex (*Dentex dentex*), não notaram diferenças significativas na TCE dos animais alimentados com prebiótico quando comparado ao grupo controle. Resultados semelhantes são observados com o “Atlantic salmon” onde não houve efeito do prebiótico no crescimento (GILDBERG *et al.*, 1995).

O emprego do β – glucano não proporcionou aumento no consumo dos peixes alimentados com rações contendo o prebiótico na sua composição,

provavelmente pela razão dos níveis de inclusão serem modestos não alterando, de forma significativa as características do alimento de todos os tratamentos.

Diferindo-se aos resultados deste estudo, PEZZATO *et al.* (2002) avaliando processamento de dietas para tilápias-do-Nilo observaram uma melhor conversão alimentar nos tratamentos com a ração extrusada, além de melhor desempenho produtivo, quando comparado à ração peletizada. De acordo com a literatura as partículas que compõem o pelete extrusado apresentam melhores respostas de digestibilidade, o que indica uma tendência de melhora na disponibilidade dos nutrientes contidos nas dietas, onde a adição de calor e umidade altera os componentes da mistura com o amido e a proteína (THOMAS & VAN DER POEL, 1996), melhorando a biodisponibilidade dos ingredientes (HILTON *et al.*, 1981). Em estudos com diferentes processamentos de ração com o acará-bandeira (*Pterophilum scalare*), RODRIGUES & FERNANDES (2006) não observaram diferenças significativas entre as dietas peletizadas e extrusadas, embora os peixes alimentados com as dietas extrusadas apresentaram melhores médias de conversão alimentar. FURUYA *et al.* (1997) também não encontraram diferenças significativas entre os processamentos, mas concluiu que a ração peletizada proporciona melhores resultados econômicos para a tilápia-do-Nilo na fase de terminação.

MISRA *et al.* (2006), testando níveis de β - glucano de 0,1%, 0,25% e 0,5% para juvenis de *Labeo rohita* não observamos diferença significativa entre os níveis do imunostimulante, porém o tratamento com o nível superior apresentou melhor conversão alimentar em relação aos outros tratamentos num período de 56 dias.

BAGNI *et al.* (2005) observaram conversões alimentares que variaram de 0,7 a 5,0 no bagre – do -canal, *Dicentrarchus labrax*. MISRA *et al.* (2006) administrando oralmente o β -glucano na alimentação do *Labeo rohita*, obtiveram valores de conversão alimentar de 2,0 a 3,5.

Devido aos resultados deste experimento, sugere-se um tempo maior de experimentação (120 ou 150 dias), podendo apresentar resultados significativos positivos para o desempenho zootécnico dos peixes que receberam a dieta com o

maior nível de inclusão de prebiótico uma vez que somente aos três meses tenderam a expressar maiores ganhos.

5. Conclusão

Os resultados obtidos mostraram que o desempenho produtivo de juvenis de pacu não foi afetada pelos níveis de β - glucano estudados. Entretanto, apesar de não significativo, os peixes que foram alimentados com o nível de 0,3% de inclusão do β - glucano apresentaram aos 90 dias de experimento, maior ganho de peso, maior taxa de crescimento específico e maior peso final.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARSETH, K.A.; SORENSEN, M.; STOREBAKKEN, T. Effects of red yeast inclusion in diets for salmonids and extrusion temperature on pellet tensile strength: Weibull analysis. **Animal Feed Science and Technology**, 126, p. 75 –91, 2006.
- AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, L. TAN., B., ZHANG, W.; XU, W., LI, H. Effects of dietary β -1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker *Pseudosciana crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, p. 394 – 402, 2007.
- ALBERNAZ, N. S., LOGATO, P. V. R., FIALHO, E. T., FREITAS, R. T. F. Efeito do processamento da ração sobre os valores de digestibilidade dos nutrientes para piau verdadeiro (*Leporinus elongatus*). (Prelo) In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2000, Viçosa. **XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Viçosa: Gráfica Viçosa, 2000.
- ANDRIGUETO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J. S.; SOUZA, G. A.; BONA FILHO, A. **Nutrição animal: as bases e os fundamentos da nutrição animal- os alimentos**. 4. ed. São Paulo : Nobel, 1981. v.1, p.23-6.
- BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOIA, M.G.; ABELLI, L.; SCAPIGLIATI, G.; TISCAR, P.G.; SARTI, M.; MARINO, G. Short- and long term effects of a dietary yeast β – glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 18, p. 311 – 325, 2005.
- BOYD, C.E. Water quality management for pond fish culture. **Developments in aquaculture and fisheries science**, v. 9, p. 318. 1982
- CARNEIRO, D.J. *et al.* Efeito do processamento das dietas comerciais sobre o desenvolvimento produtivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA**, 7., 1995, Peruíbe. *Anais...* Peruíbe: Simbraq, 1992. p. 44-51.
- COOK, M. T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOVAK, B. F.; HAYBALL, J. D. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva™ as a feed supplement enhances macrophages respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish and Shellfish immunology**, v. 14, p. 333 -345, 2003.
- EFTHIMIOU, S. Dietary intake of 1, 3/1, 6 glucans in juvenile dentex (*Dentex dentex*). Sparidae: effect on growth performance, mortalities and non-specific defense mechanisms. **J Appl Ichthyol.**, v. 12, p. 1 – 7, 1996.
- FURUYA, V.R.B. *et al.* Farelo de canola na alimentação de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.), durante o período de reversão de sexo. **Rev. Bras. Zootec.** Viçosa, v.26, n.6, p.1067-1073, 1997.
- GILDBERG, A., A. JOHANSEN & J. BØGWALD. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate

- and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. **Aquaculture**, 138: 2334, 1995.
- GODOY, M. P. **Peixes do Brasil**. Piracicaba: Ed. Franciscana, 1975.
- GONÇALVES, F. D. ; URBINATI, E. C. . Growth and metabolic stores of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg), as affected by fasting and type of diet.. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, 2005.
- HARDIE, L.J. *et al.* The effect of vitamin E on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.87, p.01-13, 1990.
- HARDIE LA, WILSON EM, GOLDHAMMER RK. Cyclostratigraphy and dolomitization of the Middle Triassic Latemar buildup, the Dolomites, northern Italy. **Dolomieu Conference on Carbonate Platforms and Dolomitization**, 16–21 September, St. Ulrich/ Grfden, Guidebook Excursion F; 56 pp, 1991.
- HIDALGO, A., LEARTE, A.R., MCQUILTON, P., PENNACK, J., AND ZHU, B. **Brain Behav. Evol.** 68, 173-180, 2006.
- HILTON, J.W. *et al.* Effect of extrusion processing and steam pelleting diets on pellet durability, pellet water absorption, and the physiological response of rainbow trout (*Salmo gairdneri* r.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 25, p. 185–194, 1981.
- JOHNSON, E.A., VILLA, T.G., LEWIS, M.J. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. **Aquaculture**, 20, 123–134, 1980.
- KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: F.Kubtiza, 289p., 2000.
- LIN, S., HSIEH, F., HUFF, H.E. Effects of lipids and processing conditions on lipid oxidation of extruded dry pet food during storage. **Anim. Feed Sci. Technol.** 71, 283–294, 1998.
- LOPÉZ, N., CUZON, G., GAXIOLA, G., TABOADA, G., VALENZUELA, M., PASCUAL, C., SÁNCHEZ, A., ROSAS, C. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary beta 1-3 glucan and ascorbic acid-2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquaculture**, v. 224, issues 1 - 4, p. 223 - 243, 2003.
- MISRA, K. M.; DAS B. K.; MUKHERJEE, S. C.; PATNAIK, P. Effect of long term administration of dietary β – glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture**, 255, p. 84 – 94, 2006.
- PEZZATO, L. E.; MIRANDA, E. C.; FURUYA, W. M.; PINTO, G. Q.; BARROS, M. M.; MAGALHÃES, G.J. Diâmetro do ingrediente e a digestibilidade aparente de rações de duas espécies de peixes tropicais. **Animal Science**, v. 24, n. 4, p. 901 – 907, 2002.
- PRIETO, M. J.; LOGATO, P. V. R.; MORAES, G. F.; OKAMURA, D. ARAUJO, F. G. Tipo de alevino, sobrevivência e desempenho inicial de pós – larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Ciência Agrotec.**, v. 30, n. 5, p. 1002 – 1007, set/ out, 2006.
- RODRÍGUES, L. A.; FERNANDES, J. B. K. Influencia do processamento da dieta no desempenho produtivo do acará – bandeira (*Pterophyllum scalare*). **Acta Scientiarum**, v. 28, n. 1, p. 113 – 119, jan/ mar, 2006.
- SAS-STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE, Inc. **SAS user's guide: Statistics**. Cary: SAS Inst., Inc. 1998, 956p

- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. **Limnologia aplicada à Aqüicultura**. Jaboticabal: FUNEP, 1995.
- THOMAS, N.; VAN DER POEL, A.F.B. Physical quality of pelleted animal feed 1. Criteria for pellet quality. **Anim. Feed Sci. Technol.**, Shannon, v. 61, p. 89–112, 1996.
- VALENTI, L. M. P.; FACONNEAU, B.; GORNES, E. F. S.; et al. Feed intake and growth of fast and slow growing strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed by automatic feeders or by self-feeders. **Aquaculture**, v.195, p.121-131, 2001.
- VIELMA, J.; MÄKINEN, T., EKHOLM, P., KOSKELA, J. Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. **Aquaculture**, 183, 349–362, 2000.
- WIGGLESWORTH, J.M., GRIFFITH, D.R.W. Carbohydrate digestion in *Peaneus monodon*. **Mari. Biology**, 120:571, 1994.

CAPÍTULO III.

NÍVEIS DE INCLUSÃO DO β – GLUCANO EM DIETAS PARA O PACU SOBRE OS PARÂMETROS FISIOPATOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS

Resumo:

Este estudo teve por finalidade avaliar os efeitos da suplementação com β -glucano em dietas para pacu, *Piaractus mesopotamicus*, nos indicadores hematológicos e de estresse. Não houve diferenças nos níveis de glicose plasmática durante todo período experimental. Em relação às proteínas totais, os valores oscilaram durante todo período onde, além dos tratamentos ocorreram diferenciações entre os processamentos. Aos 15 dias as dietas contendo β -glucano apresentaram valores inferiores quando comparado ao grupo controle, sendo que o tratamento 0,1% foi o que obteve menor valor. Pode se observar do início ao final das amostragens houve oscilações no hematócrito, tendo este apresentado valores mais altos aos 45 e 60 dias. Aos 15 dias pode-se observar diferença entre do grupo controle, o qual apresentou maior número eritrocitário em relação aos tratamentos, além disso, estes valores apresentaram-se crescentes até os 60 dias e aos 90 voltaram aos valores semelhantes aos 30 dias. Somente aos 45 dias houve um aumento na contagem de hemoglobina para o tratamento 0,3% em relação ao grupo controle. Observou-se que aos 30 dias houve uma queda em relação ao volume corpuscular apresentando um pico aos 45 dias em todos os tratamentos. Em relação aos íons, os valores de Na neste experimento oscilaram de 134,55 a 148,76 mEq/ L, apresentando-se dentro dos parâmetros da literatura, já o potássio, aos 15 dias apresentou uma diferença significativa nas concentrações, onde o grupo controle apresentou nível relativamente baixo em comparação aos tratamentos com glucano 0,2% e 0,3%. Os níveis de cloretos no plasma sanguíneo dos peixes não foram modificados pelos processamentos da dieta até os 60 dias, apresentando uma diferença significativa aos 90 dias, onde a ração peletizada apresentou valores inferiores de cloretos em relação à ração extrusada. Como não houve nenhum aumento dos níveis fisiológicos deste estudo, em relação aos encontrados na literatura, infere-se que a administração do β -glucano, mesmo por um longo período não proporcionaram alterações nos parâmetros fisiológicos e indicadores de estresse para juvenis de pacus.

Palavras-chave: pacu, parâmetros sanguíneos, imunoestimulante.

Abstract:

The objective of this study was determining the effect of β -glucan on hematological indicators and stress of pacu juveniles, *Piaractus mesopotamicus*. During experimental period (90days), water remained at 26.5 °C and the others limnological parameters (dissolved oxygen, pH, alkalinity, ammonia and conductivity) showed values within the normal for the specie. The experimental design was entirely randomized in factorial scheme 2 x 4 evaluating two proceeding of diets (extruded and pelletized) and four levels of β - glucan: 0 (control), 0.1%, 0.2% and 0.3% with four repetitions. This study doesn't show differences of levels of plasmatic glucose (means of 57.73 mg/dL) throughout period. At the 15th day, the blood of fish fed with pelletized diets containing β -glucan presented lower plasma protein levels when compared with extruded diets. In this period the control group presented the highest value of plasmatic protein. In the end of trial the hematocrit of fish fed with 0.1% prebiotic presented lower values (21.77%). At 15th day the control group shows a higher number of erythrocytes ($2.10 \times 10^6/\text{mm}^3$) among glucan treatments. In all treatments number of erythrocytes submitted increasing values until 60 days. On hemoglobin, only at 45th day increased in counting of 0.3% (9.0 g/dL) when compared with control group (7.76 g/dL). The corpuscular volume average was lower ($126.04 \mu\text{m}^3$) was lower in control group at 60 days. Nevertheless at 90th day of trial the lowest values ($116.67 \mu\text{m}^3$) were observed in fish fed 0.1% of β - glucan. The values of blood sodium have showed oscillations (134.55 a 148.76 mEq/ L), not significantly during the first 15 days the potassium was lower on control group (1.63 mEq/L) when compared with 0.2% and 0.3% levels (2.90 and 2.61 mEq/L, respectively). The plasma chlorides levels were not modify by processing until 60 days. The fish fed pelletized diet presented lower chlorides levels, when compared with fish fed extruded diets in the end of experimental period. The prebiotic inclusion with 0.3% in the first 45 days provided higher values of blood chlorides when compared with 0.1%. Despite of some values presented significative differences; all were within the baseline for the specie. As there were been no increased levels of physiological parameters in this trial, it is suggested that the administration of β - glucan, even for a long period, doesn't shows stressful effects for pacu.

Key - words: pacu, blood parameters, immunostimulant

1. Introdução

Os peixes respondem ao estresse de forma a refletir a severidade e a duração do agente estressor (BARTON, 1997). Estas respostas preparam o organismo para a chamada luta e fuga, ou seja, a tentativa de escapar da adversidade, e podem variar de acordo com a intensidade e duração do agente estressor (MORGAN & IWAMA, 1997; URBINATI *et al.*, 2004).

Foi definido por SELYE (1973) que o estresse é “a resposta não – específica do organismo a qualquer ameaça a ele próprio”. Ela é considerada como um mecanismo adaptativo que permite que o peixe conviva com estressores reais ou perceptíveis mantendo estável sua condição homeostática. O estresse pode ser considerado como um estado de ameaça para manutenção da homeostase, que é restabelecida por respostas adaptativas (CHROUSOS, 1998).

Os agentes estressores podem ser de natureza química, como por exemplo, a redução do nível de oxigênio dissolvido, elevadas concentrações de amônia (MORAES *et al.*, 2004) e nitrito (COSTA *et al.*, 2004), decorrentes da degradação da matéria orgânica, poluentes orgânicos e inorgânicos (JORGENSEN *et al.*, 2002) ou podem ser de natureza física como a alta densidade populacional, confinamento, captura ou mudanças no ambiente físico (COLOMBO *et al.*, 1990), como a redução do nível de água dos corpos d’água que caracterizam os períodos de estiagem em regiões tropicais e subtropicais (CADAVID GARCIA, 1984).

O cortisol é o principal corticosteróide em peixes, considerado um bom indicador para avaliação de estresse primário (MOMMSEN *et al.*, 1999). Em peixes o cortisol atua via dois tipos de receptores intracelulares, os mineralocorticóides e glicocorticóides. Em função mineralocorticóide, o cortisol atua na regulação osmótica e iônica estimulando a diferenciação de células cloreto nas brânquias e aumentando a atividade da enzima sódio-potássio adenosinotri-fosfatase (Na^+/K^+ - ATPase) que participam no transporte ativo dos íons sódio e cloreto. Em sua função glicocorticóide, o cortisol estimula a glicogenólise no fígado, ocasionando uma hiperglicemia, além de estimular também a gliconeogênese neste mesmo órgão (PIECKERING, 1981;

WENDELAAR BONGA, 1997). Os resultados de cortisol podem ser facilmente comparados com outras espécies, uma vez que existe vasta literatura sobre este indicador.

Outro bom indicador para resposta secundária é a glicose do sangue ou plasma, pois esta avaliação pode ser realizada na criação, com medidores de glicose de simples utilização e facilmente encontrados no mercado (WELLS & PANKHURST, 1999). O aumento da concentração plasmática de cortisol também é uma importante resposta secundária ao estresse (MOMMSEN *et al.*, 1999). Os efeitos metabólicos provocados pelas respostas primárias alteram a glicemia, ocorrendo acúmulo do ácido láctico muscular, de glicogênio hepático, além de alterações no hematócrito e no número de linfócitos. Também são descritos na literatura efeitos hidrominerais, como alterações nas concentrações plasmáticas de cloro, sódio, potássio, proteínas e osmolaridade do plasma. Alterações nos níveis de glicogênio, lipídeos e proteínas, em alguns tecidos, são efeitos secundários característicos (MORATA *et al.*, 1982; HEMRE & KROGDAHL, 1996).

Por fim, a resposta terciária é a redução no desempenho produtivo e reprodutivo e a baixa resistência a doenças (WENDELAAR BONGA, 1997).

A análise dos padrões sanguíneos fornece subsídios importantes para o auxílio do diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas em populações de peixes ou animais em geral (HINES & YASHOUV, 1970; ANDERSON, 1974; ACHUTAN NAIR & BALAKKRISHNAN NAIR, 1983; RANZANI-PAIVA, 1991; MOISEENKO, 1998; PRAVDA, 1998; RANZANI-PAIVA *et al.*, 1998/1999). Uma das maiores dificuldades é saber exatamente qual o estado de saúde normal. Muitos fisiologistas desta área têm se dedicado a estudos hematológicos, já que em humanos estes valores são utilizados como ferramentas de diagnósticos de doenças. A hematologia de peixes continua a oferecer um grande potencial, progredindo em estabelecer valores normais aos parâmetros sanguíneos e enriquecer a literatura que ainda se apresenta (MAWDESLEY - THOMAS, 1971). Somente alguns parâmetros hematológicos foram estabelecidos para alguns teleósteos, mas estes valores variam severamente, devido as diferentes metodologias de coleta e técnicas de avaliação (BLAXHALL, 1972). Estudos

hematológicos com peixes apresentam grande significância devido ao aumento na ênfase na área da piscicultura. Estes estudos são de fundamental importância para monitorar as mudanças fisiológicas e patológicas dos peixes (IWAMA et al., 1976; CHEKRABARTY & BANERJEE, 1988).

Uma das áreas em desenvolvimento para a fortificação das defesas imunológicas dos peixes é a administração de adjuvantes como o glucano ou imunoestimulantes (YANO *et al.*, 1989; RAA *et al.*, 1992). Inicialmente, achava-se que os mecanismos de ação estimulavam a hematopoiese. Atualmente existem evidências que os glucanos possuem células receptoras muito semelhantes aos macrófagos (EGSTAD & ROBERTSON, 1993). Os receptores têm especificidade para os β -glucanos, presentes nas paredes celulares de fungos e leveduras.

Este estudo teve por finalidade avaliar os efeitos da adição do prebiótico β -glucano em dietas para o pacu sobre indicadores hematológicos e de estresse.

2. Materiais e Métodos

2.1. Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Peixes Ornamentais, do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), em Jaboticabal, São Paulo. A análise bromatológica das dietas foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP de Jaboticabal, enquanto os parâmetros metabólicos foram avaliados no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e no Hospital Veterinário da FCAV/ UNESP.

2.2. Material Biológico e Condições Ambientais

Foram utilizados 640 juvenis de pacus, *Piaractus mesopotamicus*, com peso inicial de $24,7 \pm 2,0$ g, distribuídos em 32 aquários de vidro (130L) (20 peixes/caixa). A água foi proveniente de poço artesiano, a qual foi sifonada e renovada diariamente. O sistema foi provido de aeração contínua e controle de temperatura ($26,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$).

2.3. Avaliações físico-químicas da água

A temperatura média dos aquários foi aferida diariamente com um termômetro de máxima e mínima. As determinações de alcalinidade total (mg de CaCO_3/L) e amônia ($\mu\text{g}/\text{L}$) foram realizadas no Laboratório Central do Caunesp. O oxigênio dissolvido ($\text{mg O}_2/\text{L}$) e potencial hidrogênionico (pH) foram realizadas quinzenalmente utilizando oxímetro e pHmetro digital.

2.4. Manejo Alimentar, Dietas Experimentais e Delineamento Experimental

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, uma pela manhã (9:00 hrs.) e outra ao final do dia (17:00 hrs), e o consumo foi medido e registrado. A distribuição de ração foi realizada até não haver mais procura pelos peixes, para evitar sobras. A formulação e a composição das dietas experimentais são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Formulação e composição percentual e calculada das dietas experimentais
 Table 1 – Percentual and calculated composition of experimental diets

Ingredientes <i>Ingredients</i>	Controle (0%)	T1 (0,3%)	T2 (0,2%)	T3 (0,1%)
Farelo de Soja <i>Soybean meal</i>	45,5	45,5	45,5	45,5
Milho <i>Corn</i>	22	22	22	22
Farelo de Trigo <i>Wheat bran</i>	15	15	15	15
Farinha de peixe <i>Fish meal</i>	13	13	13	13
Bagaço de cana <i>Cane sugar bagasse</i>	1,5	1,4	1,3	1,2
Óleo de Soja <i>Soybean oil</i>	1,5	1,5	1,5	1,5
Sup. vitamínico mineral ² <i>Viatmin ans Mineral premix</i>	1,5	1,5	1,5	1,5
β - glucano ¹ <i>β - glucan</i>	0	0,1	0,2	0,3
Total	100	100	100	100

Tabela 2 – Percentual calculado das dietas experimentais
 Table 2 – Percentual calculated of experimental diets

Composição química <i>Chemical composition</i>	% de inclusão <i>% inclusion</i>
Matéria Seca <i>Dry matter</i>	89,91
Proteína bruta <i>Crude protein</i>	32,06
Energia bruta (kcal/kg) <i>Gross energy</i>	4096,03
Extrato etéreo <i>Ether extract</i>	3,18
Fibra bruta <i>Crude fiber</i>	4,48
Matéria mineral <i>Ashes</i>	7,34
Extrato não nitrogenado ³ <i>Nitrogen free extract</i>	38,53

¹ Nos níveis 0,0, 0,1, 0,2 e 0,3% as diferenças foram preenchidas com elemento inerte.

² Suplemento vitamínico mineral Rovimix peixe: vit. A: 5000.000 UI; vit. D3: 200.000 UI; vit. E: 5.000 UI; vit. K3: 1000 mg; vit. B1: 1500 mg; vit. B2: 1500 mg; vit. B6: 1500 mg; vit. B12: 4000 mg; vit. C: 15000 mg; ácido fólico: 500 mg; ácido pentotênico: 4000 mg; B.H.T.: 12,25 g; biotina: 50 mg; inositol: 1000 mg; nicotinamida: 7000 mg; colina: 40 g; cobalto: 10 mg; cobre: 500 mg; ferro: 5000 mg; iodo 50 mg; manganês: 1500 mg; selênio: 10 mg; zinco: 5000 mg; veículo q. s. q. : 1000 mg.

³ ENN (%) = MS (%) - (PB (%) + EE (%) + FB (%) + MM (%)).

As rações peletizadas foram produzidas na Unidade de Preparação de Rações do Centro de Aqüicultura da Unesp e na Fábrica de Rações da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – Campus de Jaboticabal e as rações extrusadas na em uma fábrica de ração comercial.

O experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4, avaliando-se dois processamentos das dietas (extrusadas e peletizadas) com quatro níveis de inclusão do β - glucano nas rações sendo: 0 (controle), 0,3%, 0,2% e 0,1%. O aditivo β - glucano utilizado é um prebiótico rico em β -glucanos, extraídos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de cepas selecionadas. Esse ingrediente se encontra em forma de pó fino, bege ou marrom claro, seco em spray dryer (Tabela 3).

Tabela 3 - Características físicas e químicas do β – glucano (g/ 100g do produto)
 Table3 – Physical and chemical characteristics of β – glucan (g/ 100 g of product)

Ingredientes <i>Ingredients</i>	% de inclusão <i>% of inclusion</i>
Totais de β - glucano <i>β- glucano total</i>	Min. 85,0
Proteínas totais (N x 6,25) <i>total protein</i>	Máx. 4,0
Umidade total (105 +/- 2°C) <i>total moistness</i>	Máx. 10,0
pH (solução 10%) <i>ph (10% solution)</i>	4,6 - 6,0
Capacidade de absorção da água (ml/g) <i>water absorption capacity</i>	6,6
Metais pesados ppm <i>heavy metals</i>	< 2

2.5. Avaliação dos Parâmetros Biométricos, Metabólicos e Hematológicos

Para a determinação do perfil hematológico foram utilizados seis peixes por tratamento. Os pacus foram anestesiados com benzocaína (0,8 g/L) e o sangue coletado com auxílio de seringa de 10,0 ml contendo glibstap (EDTA fluoretado) por meio de punção caudal. Do sangue coletado, uma alíquota de soro foi utilizada para determinação da glicose e proteínas totais (Labtest Kit) e outra centrifugada a 3.000 rpm, por 10 minutos, para separação do plasma, mantido a uma temperatura de -20°C para posterior análise de cortisol (radioimunoensaio), íons sódio e potássio (Labtest kit) e cloretos (Labtest Kit). Em seguida, foram determinados o peso corporal e o comprimento padrão (distância do início da cabeça até a inserção caudal) de cada peixe.

O hematócrito, hemoglobina, número total de eritrócitos e volume corpuscular médio foram determinados através de contador automático de células (Celm - CC 550).

2.6. Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e de acordo com este resultado, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de confiabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SAS 9.0.

3. Resultados

3.1. Parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físicos e químicos foram mensurados aleatoriamente por aquário e podem ser observados na tabela 3.

Tabela 4 – Valores médios \pm desvio padrão e coeficiente de variação dos parâmetros físicos e químicos da água dos aquários de juvenis de pacu.

Table 4 – Means values \pm standard variation of physical and chemical parameters of aquarium water of pacu juveniles.

	Tratamentos <i>Treatments</i>	CV% <i>Variance coefficient</i>
Temperatura ($^{\circ}$ C) <i>Temperature</i>	26,25 \pm 0,92	1,02
Alcalinidade (mg/L) <i>Alcalinity</i>	82,4 \pm 4,25	3,33
Amônia (μ /L) <i>Ammonia</i>	8,87 \pm 1,34	2,57
Oxigênio dissolvido (mg/L) <i>Dissolved oxygen</i>	3,52 \pm 1,68	5,87
pH <i>pH</i>	7,74 \pm 0,27	3,66

3.2. Cortisol

Os resultados das concentrações de cortisol no sangue dos peixes aos 15, 45 e 90 dias de experimentação estão apresentados na Tabela 5 e em todos os períodos os peixes que receberam na alimentação níveis de β – glucano apresentaram diferenças significativas na concentração de cortisol. Aos 45 e 90 dias houve diferença nos processamentos, onde os peixes que receberam a ração peletizada apresentaram maior concentração de cortisol em relação aos peixes que receberam a ração extrusada. Ao final do experimento, 90 dias, novamente os peixes que receberam a ração extrusada apresentaram menor concentração de cortisol plasmático. Em relação aos níveis de inclusão do β – glucano, aos 15 dias o tratamento com maior inclusão do prebiótico (0,3%) apresentou maiores concentrações do cortisol plasmático, diferenciando-se significativamente do tratamento 0,2%. Ainda neste período novamente o tratamento com 0,2% apresentou nível inferior de cortisol plasmático, principalmente em relação ao

tratamento com 0,1% de inclusão do prebiótico. Aos 90 dias todos os tratamentos com β – glucano apresentaram concentrações mais baixas de cortisol plasmático em relação ao grupo controle, como pode se observar na tabela 5.

Tabela 5 – Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para cortisol (ng/mL) de juvenis de pacu.

Table 5 – F values, coefficient of variance (CV) and means of cortisol (ng/mL) of pacu fingerlings

	Estatísticas <i>Statistics</i>	Intervalos Experimentais (dias) Experimental intervals (days)		
		15	45	90
Valores para F <i>F values</i>	Processamento (P) <i>Processment</i>	0,17ns	0,005*	0,01*
	Níveis (N) <i>Levels</i>	0,05*	0,03*	0,006*
	Interação (P x N) <i>Interactions</i>	0,17ns	0,1ns	0,08ns
	CV	45,26	49,16	48,82
Médias Processamento <i>Processment Means</i>	Ração Extrusada <i>Extruded diet</i>	25,40a	26,98b	40,06b
	Ração Peletizada <i>Pelletized diet</i>	32,29a	47,38a	62,65a
Médias Níveis <i>Levels Means</i>	Controle (0%) <i>Control</i>	31,45ab	36,84ab	77,41a
	0,30%	37,37a	35,52ab	55,60ab
	0,20%	21,86b	26,12b	35,66b
	0,10%	24,79ab	48,32a	43,94b

ns – não significativo

* (p < 0,05)

CV – Coeficiente de variação (%)

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

3.3. Glicemia

A concentração de glicose plasmática nos peixes não foi modificada pelos processamentos da dieta, assim como para os níveis de inclusão do β – glucano nas rações. Porém, aos 15 e 45 dias foi encontrada diferença em relação aos níveis da suplementação com o β -glucano, entre os tratamentos onde o tratamento com 0,2% e 0,1%, os quais apresentaram concentrações de glicose plasmática superior ao grupo controle e o tratamento com 0,3% respectivamente.

Tabela 6 – Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para glicemia plasmática de juvenis de pacu.

Table 6 – F values, coefficient of variance (CV) and means of plasmatic glucose of pacu fingerlings

	Estatísticas <i>Statistics</i>	Intervalos Experimentais (dias) <i>Experimental intervals (days)</i>				
		15	30	45	60	90
Valores para F <i>F values</i>	Processamento (P) <i>Processment</i>	0,04ns	2,13ns	0,23ns	0,23ns	0,85ns
	Níveis (N) <i>Levels</i>	3,99*	2,95ns	5,95*	1,78ns	0,94ns
	Interação (P x N) <i>Interactions</i>	2,98ns	0,55ns	2,22ns	2,75ns	2,58ns
	CV	14,22	20,68	13,86	31,31	15,37
Médias Processamento <i>Processment Means</i>	Ração Extrusada <i>Extruded diet</i>	70,7a	55,87a	54,41a	62,72a	67,41a
	Ração Peletizada <i>Pelletized diet</i>	70,1a	51,55a	53,36a	65,51a	65,07a
Médias Níveis <i>Levels Means</i>	Controle (0%) <i>Control</i>	61,83b	66,40a	51,02bc	70,59a	53,80a
	0,30%	72,10ab	69,40a	48,10c	52,90a	45,39a
	0,20%	73,79a	62,44a	56,69ab	66,04a	56,54a
	0,10%	73,87a	65,81a	59,69a	66,92a	58,22a

ns – não significativo

* (p < 0,05)

CV – coeficiente de variação (%)

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

3.4. Proteínas Totais

Após 15 dias de alimentação, houve interação entre os níveis de inclusão de β - glucano, e os tipos de processamentos da ração (Tabela 7). Neste período o grupo suplementado com 0,1% de glucano da ração peletizada apresentou maior concentração de proteínas totais em relação ao tratamento 0,3% da ração peletizada. Aos 30 e 45, os processamentos não apresentaram diferenças entre si e os valores não apresentaram interação. Após 60 dias pôde se observar interação, onde o tratamento 0,2% da ração peletizada apresentou maior concentração em relação aos tratamentos controle e 0,1%. Aos 90 dias também com interação, os grupos 0,3% e 0,1% da ração extrusada apresentaram concentrações significativamente inferiores em relação ao tratamento 0,2% da ração extrusada.

Tabela 7 – Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias \pm desvio padrão para proteínas totais de juvenis de pacu.

Table 7 – F values, coefficient of variance (CV) and means of total protein of pacu fingerlings.

	Estatísticas Statistics	Intervalos Experimentais (dias) Experimental intervals (days)				
		15	30	45	60	90
Valores para F F values	Processamento (P) Processment	5,62*	1,14ns	0,44ns	0,05ns	0,05
	Níveis (N) Levels	1,10ns	1,22ns	0,93ns	3,43ns	2,04*
	Interação (P x N) Interactions	3,37*	0,7ns	0,95ns	1,31*	3,27*
	CV	8,52	9,97	8,87	8,48	5,53
Médias Processamento Processment Means	Ração Extrusada Extruded diet	2,13 \pm 0,14a	2,93 \pm 0,12a	3,06 \pm 0,13a	3,06 \pm 0,14a	2,76 \pm 0,15a
	Ração Peletizada Pelletized diet	2,02 \pm 0,14b	2,84 \pm 0,14a	3,00 \pm 0,13a	3,05 \pm 0,13a	2,75 \pm 0,14a
Médias Níveis Levels Means	Controle (0%) - Ração Extrusada Control - Extruded diet	2,30 \pm 0,15Aa	2,91 \pm 0,17Aa	2,99 \pm 0,15Aa	3,15 \pm 0,09Aa	2,87 \pm 0,07ABa
	Controle (0%) - Ração Peletizada Control - Pelletized diet	1,95 \pm 0,12ABb	3,01 \pm 0,15Aa	2,92 \pm 0,16Aa	2,85 \pm 0,18Ba	2,85 \pm 0,04Aa
	0,3% - Ração Extrusada Extruded diet	2,10 \pm 0,15Aa	2,84 \pm 0,18Aa	3,00 \pm 0,13Aa	2,99 \pm 0,18Aa	2,57 \pm 0,18Ba
	0,3% - Ração Peletizada Pelletized diet	1,90 \pm 0,13Ba	2,68 \pm 0,2Aa	3,22 \pm 0,16Aa	3,07 \pm 0,7ABa	2,77 \pm 0,08Aa
	0,2% - Ração Extrusada Extruded diet	2,10 \pm 0,14Aa	2,99 \pm 0,13Aa	3,01 \pm 0,11Aa	3,03 \pm 0,11Aa	2,97 \pm 0,15Aa
	0,2% - Ração Peletizada Pelletized diet	2,08 \pm 0,12ABa	2,91 \pm 0,15Aa	3,10 \pm 0,12Aa	3,25 \pm 0,05Aa	2,79 \pm 0,06Aa
	0,1% - Ração Extrusada Extruded diet	2,05 \pm 0,15Aa	2,96 \pm 0,14Aa	2,92 \pm 0,14Aa	3,02 \pm 0,14Aa	2,60 \pm 0,06Ba
	0,1% - Ração Peletizada Pelletized diet	2,15 \pm 0,15Aa	2,75 \pm 0,16Aa	2,94 \pm 0,14Aa	2,93 \pm 0,11Ba	2,66 \pm 0,09Aa

ns – não significativo

* (p < 0,05)

CV – coeficiente de variação (%)

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

3.5. Hematócrito

Os tipos de processamentos realizados não inferiram diferenças significativas para o percentual de hematócrito dos peixes durante todo período experimental. Aos 15 dias as dietas contendo β - glucano apresentaram valores inferiores quando comparado ao grupo controle, sendo que o tratamento 0,1% foi o que obteve menor valor.

Pode se observar na Tabela 8 variações no hematócrito durante todo o período experimental, tendo este apresentado valores elevados aos 45 e 60 dias quando comparados aos outros períodos. Estas oscilações podem ter ocorrido provavelmente em relação ao manejo ou até mesmo pela quantidade elevada de proteína na ração. É interessante esta observação, pois na Tabela 10 aos 45 e 60

dias se apresentam os maiores valores na concentração de hemoglobina em todo período experimental.

Tabela 8 – Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para o hematócrito de juvenis de pacu.

Table 8 – F values, coefficient of variance (CV) and means of hematocrit of pacu fingerlings

	Estatísticas Statistics	Intervalos Experimentais (dias) Experimental intervals (days)				
		15	30	45	60	90
Valores para F F values	Processamento (P) Processment	2,1ns	0,53ns	0,73ns	2,23ns	0,04ns
	Níveis (N) Levels	9,16*	0,41ns	0,96ns	0,71ns	7,17*
	Interação (P x N) Interactions	2,48ns	1,05ns	0,86ns	1,05ns	0,71ns
	CV	7,07	20,39	13,31	33,21	7,62
Médias Processamento Processment Means	Ração Extrusada Extruded diet	27,05a	20,93a	37,82a	30,12a	23,81a
	Ração Peletizada Pelletized diet	26,26a	20,05a	36,60a	26,09a	23,71a
Médias Níveis Levels Means	Controle (0%) Control	28,98a	20,78a	35,32a	31,36a	24,97a
	0,30%	26,08b	19,50a	38,70a	27,69a	23,85a
	0,20%	26,45b	20,35a	37,52a	26,08a	24,45a
	0,10%	25,11b	21,33a	37,30a	27,30a	21,77b

ns – não significativo

* (p < 0,05)

CV – coeficiente de variação

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05)

3.6. Eritrócitos

Após 15 dias de alimentação pode-se observar na Tabela – 9, diferenças nos valores de eritrócitos entre o grupo controle, o qual apresentou maior número eritrocitário, em relação aos tratamentos onde houve o uso do β – glucano. Em alguns tratamentos os valores de eritrócitos apresentaram-se crescentes até os 60 dias e aos 90 voltaram a valores semelhantes aos 30 dias.

Tabela 9 – Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para eritrócitos (10^6 mm^{-3}) de juvenis de pacu).

Table 9 – F values, coefficient of variance (CV) and means of Erythrocytes (10^6 mm^{-3}) of pacu fingerlings.

	Estatísticas Statistics	Intervalos Experimentais (dias) Experimental intervals (days)				
		15	30	45	60	90
Valores para F F values	Processamento (P) Processment	2,57ns	0,15ns	0,28ns	1,39ns	0,38ns
	Níveis (N) Levels	16,76*	0,29ns	1,93ns	1,05ns	2,87ns
	Interação (P x N) Interactions	0,88ns	0,96ns	1,67ns	0,98ns	1,17ns
	CV	6,09	21,01	12,41	34,18	6,58
Médias Processamento Processment Means	Ração Extrusada Extruded diet	1,96a	2,00a	2,21a	2,30a	1,93a
	Ração Peletizada Pelletized diet	1,90a	1,96a	2,17a	2,04a	1,90a
Médias Níveis Levels Means	Controle (0%) Control	2,10a	1,97a	2,03a	2,49a	1,97a
	0,30%	1,95b	1,91a	2,29a	2,06a	1,88a
	0,20%	1,91b	1,96a	2,22a	2,00a	1,96a
	0,10%	1,76c	2,06a	2,21a	2,13a	1,84a

ns – não significativo

* ($p < 0,05$)

CV - coeficiente de variação(%)

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.7. Hemoglobina

Os diferentes tipos de processamentos realizados nas dietas não ocasionaram alterações nos níveis de hemoglobina durante todo período experimental. Somente após 45 dias houve um aumento na contagem de hemoglobina para o tratamento 0,3% em relação ao grupo controle (Tabela 10).

Neste estudo as concentrações da hemoglobina variaram de 7,61 a 9,00 g/dL.

Tabela 10 – Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para hemoglobina (g/dL) de juvenis de pacu.

Table 10 – F values, coefficient of variance (CV) and means of total hemoglobin (g/dL) of pacu fingerlings.

	Estatísticas <i>Statistics</i>	Intervalos Experimentais (dias) Experimental intervals (days)				
		15	30	45	60	90
Valores para F <i>F values</i>	Processamento (P) <i>Processment</i>	2,6ns	0,16ns	3,42ns	0,79ns	0,04ns
	Níveis (N) <i>Levels</i>	1,57ns	0,15ns	3,24*	0,08ns	1,53ns
	Interação (P x N) <i>Interactions</i>	0,87ns	0,7ns	0,17ns	0,69ns	0,46ns
	CV	8,23	24,58	11,94	9,2	10,14ns
Médias Processamento <i>Processment Means</i>	Ração Extrusada <i>Extruded diet</i>	8,15a	7,95a	8,22a	8,37a	7,99a
	Ração Peletizada <i>Pelletized diet</i>	7,84a	7,73a	8,76a	8,17a	8,03a
Médias Níveis <i>Levels Means</i>	Controle (0%) <i>Control</i>	8,14a	7,85a	7,76b	8,25a	8,20a
	0,30%	8,18a	7,73a	9,00a	8,29a	7,61a
	0,20%	8,00a	7,64a	8,57ab	8,20a	7,61a
	0,10%	7,65a	8,14a	8,64ab	8,35a	7,98a

ns – não significativo

* (p < 0,05)

CV – coeficiente de variação (%)

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

3.8. Volume Corpuscular Médio (VCM)

O VCM não sofreu alterações pelos diferentes processamentos das dietas durante todo período experimental. É importante ressaltar que neste estudo, aos 15 dias, o VCM do grupo 0,1% apresentou contagem de eritrócitos de $1,7 \cdot 10^6 \text{ mm}^{-3}$, porém com VCM igual 141,8 fL. O grupo controle apresentou uma contagem eritrocitária significativamente superior em relação ao tratamento 0,1% (Tabela – 9), porém o volume corpuscular não apresentou diferenças entre si. Observar-se que aos 30 dias houve uma queda em relação ao volume corpuscular apresentando um pico aos 45 dias. Neste período observam-se as menores e maiores contagens eritrocitárias, respectivamente (Tabela – 9).

A VCM apresentou diferença significativa nos 60 e 90 dias, como observado na Tabela - 11. O grupo controle apresentou menor VCM (126,04 fL) em relação ao grupo 0,3% (136,18 fL) aos 60 dias e aos 90 dias o grupo controle apresentou maior VCM (125,78 fL) em relação ao grupo 0,1% (116,67 fL).

Tabela 11 – Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para o volume corpuscular médio (VCM) (fL) de juvenis de pacu.

Table 11 – F values, coefficient of variance (CV) and means of mean corpuscular volume (MCV) of erythrocytes (fL) of pacu fingerlings.

	Estatísticas <i>Statistics</i>	Intervalos Experimentais (dias) <i>Experimental intervals (days)</i>				
		15	30	45	60	90
Valores para F <i>F values</i>	Processamento (P) <i>Processment</i>	0,1ns	2,15ns	0,47ns	1,24ns	0,63ns
	Níveis (N) <i>Levels</i>	2,07ns	0,63ns	1,17ns	2,94*	3,91*
	Interação (P x N) <i>Interactions</i>	2,29ns	3,86ns	1,79ns	3,46ns	0,67ns
	CV	5,84	2,29	4,11	6,88	6,05
Médias Processamento <i>Processment Means</i>	Ração Extrusada <i>Extruded diet</i>	137,79a	104,46a	170,49a	131,67a	124,36a
	Ração Peletizada <i>Pelletized diet</i>	137,75a	103,45a	169,10a	128,78a	122,52a
Médias Níveis <i>Levels Means</i>	Controle (0%) <i>Control</i>	137,90a	103,67a	173,05a	126,04b	125,78a
	0,30%	133,61a	104,05a	168,49a	136,18a	126,63a
	0,20%	137,76a	104,68a	168,70a	130,85ab	124,70ab
	0,10%	141,80a	103,43a	168,93a	127,84ab	116,67b

ns – não significativo

* ($p < 0,05$)

CV – coeficiente de variação (%)

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.9. Íons

3.9.1. Sódio – Na

Ao longo de todo período experimental não houve alterações significativas do nível de sódio sangüíneo entre os tratamentos com β - glucano e o grupo controle, sendo que os níveis deste íon permaneceram estáveis por todo período experimental como pode ser observado na Tabela 12. Os valores de Na neste experimento oscilaram entre 134,55 a 148,76 mEq/ L, apresentando-se dentro dos valores encontrados na literatura.

Tabela 12 – Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para íon sódio (mEq/L) de juvenis de pacu.

Table 12 – F values, coefficient of variance (CV) and means ion sodium (mEq/L) of pacu fingerlings

	Estatísticas Statistics	Intervalos Experimentais (dias) Experimental intervals (days)				
		15	30	45	60	90
Valores para F F values	Processamento (P) Processment	0,02ns	2,15ns	0,48ns	1,67ns	0,38ns
	Níveis (N) Levels	1,91ns	0,14ns	0,35ns	1,45ns	0,67ns
	Interação (P x N) Interactions	0,33ns	2,18ns	0,22ns	1,15ns	1,66ns
	CV	4,75	7,44	6,34	2,33	5,04
Médias Processamento Processment Means	Ração Extrusada Extruded diet	138,63	139,95	144,16	144,34	145,58
	Ração Peletizada Pelletized diet	138,27	144,78	141,13	142,85	147,0
Médias Níveis Levels Means	Controle (0%) Control	140,58	142,0	142,25	144,1	144,37
	0,30%	134,55	143,9	146,25	142,75	146,41
	0,20%	137,52	141,08	142,9	144,16	145,5
	0,10%	141,1	142,75	141,23	143,75	148,76

ns – não significativo

* (p < 0,05)

CV – coeficiente de variação (%)

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

3.9.2. Potássio – K

Os níveis de potássio plasmático dos peixes não foram modificados pelos processamentos da dieta, também não apresentando interação. Aos 15 dias pode-se observar uma diferença significativa nas concentrações de potássio, onde o grupo controle apresentou nível relativamente baixo em comparação aos tratamentos 0,2% e 0,3%. Ao longo do período experimental o grupo controle apresentou valores de potássio semelhantes aos dos tratamentos com β -glucano não diferindo estatisticamente.

Tabela 13 – Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para íon potássio (mEq/L) de juvenis de pacu.

Table 13 – F values, coefficient of variance (CV) and means ion potassium (mEq/L) of pacu fingerlings

	Estatísticas Statistics	Intervalos Experimentais (dias) Experimental intervals (days)				
		15	30	45	60	90
Valores para F F values	Processamento (P) Processment	5,0ns	0,2ns	0,34ns	0,82ns	0,48ns
	Níveis (N) Levels	3,91*	0,65ns	0,12ns	0,39ns	1,77ns
	Interação (P x N) Interactions	3,0ns	0,25ns	0,27ns	2,07ns	2,24ns
	CV	35,3	40,72	36,28	27,59	28,01
Médias Processamento Processment Means	Ração Extrusada Extruded diet	2,57a	2,29a	2,47a	2,66a	2,14a
	Ração Peletizada Pelletized diet	2,11a	2,15a	2,32a	2,46a	2,02a
Médias Níveis Levels Means	Controle (0%) Control	1,63b	2,42a	2,35a	2,75a	1,85a
	0,30%	2,90a	1,99a	2,24a	2,45a	2,06a
	0,20%	2,61a	2,06a	2,51a	2,49a	1,99a
	0,10%	2,34ab	2,37a	2,44a	2,57a	2,39a

ns – não significativo

* (p < 0,05)

CV – coeficiente de variância (%)

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

3.10. Cloretos

Até 30 dias de alimentação todos os níveis de prebióticos avaliados apresentaram-se semelhantes estatisticamente. Após 45 dias de tratamento os níveis 0,3% e 0,1%, se diferiram estatisticamente, apresentando valores de 131,80 e 120,68 mEq/ L, respectivamente. Após 60 dias esses valores apresentaram-se todos próximos, principalmente nos tratamentos que anteriormente diferiram. Ao final do período experimental todos os tratamentos apresentaram níveis mais baixos de cloretos, porém os peixes do grupo controle apresentaram valores superiores aos suplementados com β - glucano.

Tabela 14 – Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para cloretos (mEq/L) de juvenis de pacu.

Table 14 – F values, coefficient of variance (CV) and means of chlorides (mEq/L) of pacu fingerlings

	Estatísticas Statistics	Intervalos Experimentais (dias) Experimental intervals (days)				
		15	30	45	60	90
Valores para F F values	Processamento (P) Processment	1,7ns	1,12ns	0,92ns	4,21ns	8,65ns
	Níveis (N) Levels	0,35ns	0,32ns	2,56*	3,07ns	1,8*
	Interação (P x N) Interactions	0,57ns	0,92ns	0,08ns	0,92ns	4,15ns
	CV	13,62	21,94	8,18	2,12	2,44
	Médias Processamento Processment Means	Ração Extrusada Extruded diet	126,74a	133,66a	128,10a	118,95a
	Ração Peletizada Pelletized diet	119,99a	125,13a	125,75a	116,15a	96,39a
Médias Níveis Levels Means	Controle (0%) Control	123,16a	133,41a	129,58ab	119,54a	98,98a
	0,30%	121,16a	127,40a	131,80a	116,50a	97,62ab
	0,20%	127,40a	123,44a	125,05ab	117,14a	97,56ab
	0,10%	121,74a	132,82a	120,68b	117,73a	96,56b

ns – não significativo

* (p < 0,05)

CV – coeficiente de variância (%)

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05)

4. Discussão

A busca por nutrientes e técnicas de manejo que possam diminuir os efeitos nocivos do estresse é relevante e necessária na aquicultura. O uso de imunostimulantes em peixes não inclui somente promover melhor e mais eficientes respostas a agentes patogênicos, mas sim evitar os efeitos supressivos do estresse (ANDERSON, 1992). Tanto o estresse físico, quanto o social são capazes de alterar as funções imunes dos animais.

4.1 Parâmetros físico-químicos da água

Os resultados demonstraram que a qualidade da água dos aquários não foi alterada, sendo que os parâmetros avaliados permaneceram de acordo com os padrões recomendados por SIPAÚBA-TAVARES (1995) e KUBITZA (2000). Em relação ao oxigênio dissolvido a tolerância para muitas espécies de peixes é de 1 a 9 mg/L (BOYD 1982), sendo que a faixa ideal requerida pelas espécies está relacionada com a fase de crescimento e reprodução, embora a maior parte das espécies tenham uma exigência acima de 5 mg/L.

4.2. Cortisol

Em peixes, em média os níveis basais do cortisol encontram-se em torno de 30 a 40 ng/mL (WEDEMEYER *et al.*, 1990). Observa-se que aos 15 dias todos os tratamentos se apresentaram dentro dos parâmetros basais para peixes em geral. Aos 45 somente o tratamento com 0,1% de inclusão do β – glucano apresentou - se superior em relação aos outros tratamentos. Em estudos com o estresse no transporte do pacu, FUJIMOTO *et al.* (2005) apresentaram níveis de concentração de cortisol plasmático que variaram entre 46,5 a 67,4 ng/mL . Aos 90 dias somente o tratamento controle apresentou valor acima aos encontrados por estes autores. BRANDÃO *et al.* (2003) avaliando estresse no adensamento populacional do pirarucu (*Arapaema gigas*) e encontraram valores em torno de 23,8 a 90,4 ng/mL.

Em estudos com a administração do β – glucano em dietas de truta arco – íris (*Oncorhynchus mykiss*), JENEY *et al.* (1992) observaram aumento acentuado

dos níveis de cortisol em todos os tratamentos que tinham a inclusão desses prebiótico. Os peixes que receberam dosagem de 0,1% foram os que apresentaram leve aumento nas concentrações do cortisol. Ao final do período experimental (90 dias), somente o tratamento 0,1% apresentou queda na concentração do cortisol quando comparado aos outros tratamentos, esta diminuição da concentração de cortisol plasmático pode estar associado à retroalimentação negativa do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal, a qual impede a liberação contínua deste hormônio (FRYER e PETER, 1977).

Elevadas concentrações de cortisol podem causar gliconeogênese e glicogenólise no fígado (MAZEAUD *et al.*, 1977). Isto resulta em hiperglicemia, que ajuda a satisfazer este aumento de demanda de energia durante o estresse, permitindo que o organismo reaja ao agente estressor (GRONOW, 1974). Porém neste estudo os níveis glicêmicos apresentaram-se dentro dos valores basais encontrados na literatura. Diante dessas observações, deve-se considerar que pacu criado em cativeiro por várias gerações, vivendo em constante interação social de cardume, possa alcançar a fase de adaptação mais precocemente, em apoio a esses resultados, BELO (2002), utilizou o mesmo modelo experimental e a mesma espécie de peixe, em ambiente similar, verificaram aumento dos teores de cortisol plasmático nos primeiros sete dias, mas não em períodos posteriores.

4.2. Glicemia

As concentrações de glicose observadas aos 30, 60 e 90 dias apresentaram-se dentro dos valores normais para peixes, como descrito por vários autores (ROCHER e BOGÉ, 1996; BALDAN, 2004). Variações nas concentrações de glicose são encontradas conforme a espécie de peixe, como descrito por TAVARES-DIAS & SANDRIN (1998), os quais observaram concentrações de 116,7 mg/dL no *C. macropomum* enquanto que TAVARES-DIAS *et al.* (1999) para o *B. cephalus*, observaram concentrações de 60,4mg/dL. TAVARES – DIAS & MATAQUEIRO (2004) estudaram as características biológicas, bioquímicas e biométricas do pacu, encontraram valores de glicose plasmática entre 40,6 a 89,2 mg/ dL. Em estudos com o *P. obscura* os valores de glicose obtiveram médias em

torno de 67,42 mg/ dL (KORI-SIAKPERE *et al.*, 2005). Pode se constatar que os diversos fatores ambientais e não ambientais podem afetar os níveis basais de glicose em peixes teleósteos (BARTON & IWAMA, 1991).

O aumento da glicose plasmática é uma resposta comum ao estresse (MAZEAUD *et al.*, 1977; MORAES *et al.*, 2002; ACERETE *et al.*, 2004; BRACEWELL *et al.*, 2004) e constitui uma fonte extra de energia que possibilita ao animal superar os distúrbios causados pelo agente estressor (WANDELAAR BONGA, 1997). Em geral, o aumento da glicose plasmática tem sido considerado como o resultado da ação de catecolaminas no fígado (PICKERING, 1981; HOCHAKA & SOMERO, 1984; RANDALL & PERRY, 1992; WANDELAR BONGA, 1997), entretanto o aumento do cortisol também está associado ao aumento da glicose plasmática principalmente durante estresse prolongado, via glicogênese (WANDELAR BONGA, 1997). Os valores encontrados neste estudo, apesar de oscilantes, podem ser explicados devido à quantidade de proteína das dietas, a qual influencia diretamente nos processos de gliconeogênese a partir de aminoácidos, os quais apresentam aumentam no plasma e no fígado (MELO *et al.*, 2006). Segundo os autores LONE *et al.*, (1982) observaram tendências de aumento de aminoácidos e da glicose sérica com o aumento de proteína da dieta em *Oncorhynchus mykiss*.

4.3. Proteínas Totais

Neste estudo pode se observar que os valores de proteínas totais no sangue dos peixes dos tratamentos e dos processamentos das rações apresentaram se oscilantes entre si, principalmente aos 15, 60 e 90 dias, sendo que CARNEIRO & URBINATI (2001) sugerem que quando existe uma baixa no número de proteínas totais no plasma, existe um fornecimento de aminoácidos para a neoglicogênese e conseqüente glicogênese. A glicogênese é o processo bioquímico responsável em transformar a glicose em glicogênio, sendo que este é uma fonte imediata de glicose para os músculos quando há a diminuição da glicose sangüínea, ou seja, quando existe uma baixa no número de proteínas

totais no plasma, existe um fornecimento de aminoácidos para glicogênese (fonte imediata de glicose). Outro fator a uma queda de proteínas totais seria uma dieta desbalanceada, onde existe aumento ou diminuição de proteínas totais, conseqüentemente havendo falta de aminoácidos essenciais.

Outro fator oscilante observado nas concentrações de proteínas totais se deve primariamente a aumentos ou diminuições na concentração de albumina, principal constituinte das proteínas totais. A falta de aminoácidos essenciais à síntese, decorrente de uma nutrição desbalanceada, pode concorrer para a diminuição dos níveis de albumina (RAVEL, 1997).

Geralmente as proteínas totais se apresentam características e variando de acordo com as proteínas do plasma da espécie, além de diferenças referentes à cadeia produtiva. Existem situações de estresse devido à captura, manejo e amostragens que causam efeitos nos níveis de proteínas no plasma sanguíneo dos peixes (BOUCK & BALL, 1960).

Sendo assim quando existe um aumento dos níveis de proteínas totais no sangue, é porque existe uma situação de estresse, e este aumento é responsável para que haja uma maior capacidade de defesa contra patógenos, ou seja, estresse provoca um aumento no número de proteínas plasmáticas totais.

4.4. Hematócrito

Os valores percentuais do hematócrito encontrados neste estudo (19,5 a 38,7) apresentaram-se dentro dos encontrados por TAVARES – DIAS E MATAQUEIRO (2004) em estudos hematológicos com pacu, apresentaram valores com grande variância, entre 24,0 a 40,0%. Apesar do alto coeficiente de variação (CV) estes autores alegam que pode ser considerado dentro do esperado, uma vez que os valores do CV são normalmente elevados em peixes. CLARCK *et. al.* (1976), que reportaram valores de hematócritos nos peixes entre 20 – 35%, raramente apresentando valores acima de 50%. KORI – SIAKPERE *et al.* (2005) apresentaram valores do hematócrito variando entre 14 – 28%, estes autores fazem uma observação que esses valores possivelmente se apresentam desta forma por algum tipo de predisposição ao estresse no “African snakehead” (*Parachanna obscura*).

Segundo HATTINGH & VAN PLETZER (1974) as concentrações de hemoglobina e hematócrito decrescem após algum tipo de estresse, como o manejo, o que pode ser observado aos 90 dias na Tabela 7 e 9. É interessante a observação destes autores, pois na Tabela 7 aos 45 e 60 dias se apresentam os níveis mais elevados do percentual de hematócrito em todo período experimental. Outra explicação pode estar relacionada quando existe aumento do hematócrito, este pode estar relacionado à hiper atividade dos órgãos hematopoiéticos, que reagem à agressão de um modo não específico, aumentando a produção de eritrócitos, sendo o hematócrito um bom indicador de estresse (WEDEMEYER, 1972; SOIVIO & OIKARI, 1976; WILSON & TAILOR, 1993).

Os tratamentos com β – glucano, aos 15 e 90 apresentaram um percentual do hematócrito mais baixos em relação ao tratamento controle.

4.5. Eritrócitos

TAVARES - DIAS & MATAQUEIRO (2004) apresentaram valores de contagem de eritrócitos ($2,96 \pm 0,63 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$) relativamente superiores aos encontrados neste estudo ($1,76 - 2,10 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$). CAMARGO *et al.* (2005) em estudos com o jundiá (*Rhamdia quelen*) mostraram valores entre $1,45$ a $3,13 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$. Tais resultados podem se divergir já que pode - se considerar que a resposta natural dos peixes varia conforme o ambiente, como localidades distintas e características da água também distintas. Os peixes respondem fisiologicamente às alterações de oxigênio na água como forma de adaptação a esse ambiente (TAVARES-DIAS *et al.*, 2002). Outra possibilidade é a influência do stress no cultivo de peixes em ambientes fechados e/ou o efeito do stress crônico, visto que os valores de BARCELLOS *et al.* (2004) foram em torno de $2,98 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, superior quando comparado a $1,4 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, descrito como valor basal (BARCELLOS *et al.*, 2004). Trabalhos com a administração oral de imunostimulantes apresentam baixa contagem de eritrócitos em relação ao grupo controle, como é observado por JENEY & JENEY (2002), onde o grupo controle apresenta valor eritrocitário de $1,32 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, e o tratamento com maior dosagem do imunostimulante apresentam valores de $0,76 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$. Conclui-se que a contagem de eritrócitos deste presente estudo apresentou-se um pouco acima dos níveis basais, mas bastante inferiores aos níveis altos encontrados na literatura (TAVARES - DIAS & MATAQUEIRO, 2004; BARCELLOS *et al.*, 2004; CAMARGO *et al.*, 2005).

4.6. Hemoglobina

A hemoglobina é vastamente utilizada em vários estudos com peixes, mas devido as diferentes metodologias existe dificuldade na comparação dos resultados.

TAVARES – DIAS & MATAQUEIRO (2004) observaram para pacus oriundos de confinamento intensivo, valores de hemoglobina numa média de 8,9

g/dL. CAMARGO *et al.* (2005) apresentaram valores de hemoglobina em torno de 9,1 a 11,0 g/dL⁻¹. MULCHAHY (1970) em estudos hematológicos com o “pike” (*Essox lucius* (L)) obteve valores de 5,6 a 15,0 g/dL, com uma média de 8,8 g/dL. SEDDIQUI & NASEEM (1979) apresentaram valores ainda inferiores para o *Labeo rohita*, com valores de 6,0 g/dL para machos e 6,3 g/dL para fêmeas. Alguns autores obtiveram resultados inferiores utilizando imunoestimulantes, como o caso de alguns esturjões híbridos (*Acipenser ruthenus* x *A. baerii*), onde os níveis de hemoglobina apresentaram-se em torno de 3,11 a 3,90 mmol L⁻¹. HATTINGH & VAN PLETZER (1974) observaram que quando a concentração da hemoglobina dos peixes decresce após o estresse de captura e manejo. Entretanto, no sangue dos peixes, o oxigênio é carregado por uma solução física e em combinação com a hemoglobina. Portanto fisiologicamente a hemoglobina é crucial para a sobrevivência dos peixes pela sua função direta com o oxigênio na corrente sanguínea.

4.7. Volume Corpuscular Médio (VCM)

TAVARES – DIAS & MATAQUERO (2004) apresentaram uma média de 125,0 fL ($\pm 16,9$) para pacus em confinamento intensivo. O jundiá (*Rhamdia quelen*) apresentou VCM em média de 133,4 fL (CAMARGO *et al.*, 2005). Valores próximos aos encontrados para jundiá por TAVARES-DIAS *et al.* (2002) (VCM 139,0 fL), porém o VCM encontrado por estes últimos autores foi superior (241,94 fL), indicando que seus animais apresentaram um menor número de eritrócitos ($1,7 \cdot 10^6 \mu\text{L}^{-1}$), mas de maior volume. Com resultados semelhantes, JENEY & JENEY (2002) obtiveram baixa contagem eritrocitária, porém alto VCM (217,79 a 352,81 fL), que aumentou conforme maior o nível do imunoestimulante.

4.8. Íons

4.8.1. Sódio – Na

Os valores de Na neste experimento oscilaram de 134,55 a 148,76 mEq/ L, apresentando-se dentro dos parâmetros da literatura, em estudos com carpa (85 a 206 mEq/ L) (MARTEM'YANOV, 1996) , esturjão (104 – 148 mEq/ L) (KRAYUSHKINA *et al.*, 1973) e salmão *Onchorhynchus keta* (136 a 171 mEq/ L) (BOIKOV *et al.*, 1988), porém estas espécies de peixes não são nativas do Brasil. Em estudos com espécies nativas, os níveis de sódio encontrados no matrinxã (*Brycon amazonicus*) foram inferiores em relação a este estudo, com níveis de 115,31 a 131,38 mEq/ L (ABREU & URBINATI, 2006). Em estudos com *Brycon cephalus*, matrinxã, CARNEIRO & URBINATI (2001) apresentaram níveis de sódio em torno de 165 mEq/ L. Em estudos de estresse com salinidade, a carpa - capim (*Ctenopharyngodon idella*, Val. 1844) apresentou valores que oscilaram entre 135,70 a 174,74 mEq/ L (YAVUZCAN-YILDIZ & KIRKA'GAÇ-UZBILEK, 2002). Portanto sugere-se que os valores encontrados neste estudo estão próximos aos valores basais de sódio no plasma sanguíneo do pacu.

4.8.2. Potássio – K

Os eletrólitos são distribuídos em soluções por todo fluído do organismo. O equilíbrio de uma concentração constante de íons (Na e K) é essencial para uma regulação ativa da entrada de água e saída de íons em organismos aquáticos (MAYER *et al.*, 1992), sendo que qualquer desbalanço dos níveis de íons nos animais pode influenciar em várias atividades fisiológicas (BASKIN *et al.*, 1981). O potássio é o principal cátion do fluído intracelular e, portanto o mais importante constituinte do fluído extracelular. Os níveis de potássio variaram de 1,63 a 2,90 mEq/ L, valores baixos em relação aos níveis observados em carpas (*Cyprinus carpio* var. *communis*) que variaram entre 3,60 e 5,10 mEq/ L (LOGASWAMY *et al.*, 2007). A carpa-capim apresentou valores de potássio em torno de 2,26 a 5,66 mEq/L (YAVUZCAN-YILDIZ & KIRKA'GAÇ-UZBILEK, 2002), valores bastante

distantes entre si. Quando existe um aumento dos níveis de potássio pode ser resultado de maior fragilidade dos eritrócitos após o estresse, causa principalmente devido ao aumento do nível de cortisol circulante, o que pode resultar em hemólise durante a coleta e processamento do sangue e extravasamento de potássio intracelular (HATTING & VAN PLETZEN, 1974).

4.9. Cloretos

Após os uma situação de estresse, as concentrações de sódio e cloretos sangüíneos podem diminuir, desde que a elevação das catecolaminas induza um aumento da permeabilidade branquial, resultando uma alteração nos níveis dos eletrólitos no sangue (EDDY, 1981). ABREU & URBINATI (2006) observaram níveis de cloretos sangüíneos em torno de 75,25 a 88,27 mEq/ L no matrinxã (*Brycon amazonicus*), valores bem abaixo aos encontrados neste trabalho com pacu (entre 96,56 a 133,41). As alterações de mecanismo osmorregulatórios podem não ocorrer imediatamente após a presença de agentes estressores, podendo levar algumas horas, ou mesmo dias para serem observadas (EDDY, 1981).

5. Conclusão

A administração do β -glucano na dieta, durante todo período experimental provocou alterações nos parâmetros hematológicos e indicadores de estresse do pacu. O β - glucano apresentou alterações nos valores de glicemia, proteínas totais, percentual do hematócrito, eritrócitos, hemoglobina, VCM e íon potássio. Estas alterações foram significativamente boas, reduzindo o estresse, porém variando muito conforme o nível de inclusão do prebiótico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. S.; URBINATI, E. C. Physiological responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*) fed difrents levels of vitamin C and submitted to air exposure. **Acta Amazonica**, v. 36 (4), p. 519 – 524, 2006.
- ACERETE, L.; BALASCH, J.C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. **Aquaculture**, v.237, p.167-178, 2004.
- ACHUTAN NAIR, G.; BALAKKRISHNAN NAIR, N. Effests of infestation with the isopod, *Alitropus typus* M. Edwards (Crustácea: Flabellifera: Aegidae) on the haematological parameters of the host fish, *Channa striatus* (Bloch). **Aquaculture**, v.30, p.11 – 19, 1983.
- ANDERSON, D.P. **Fish immunology**. New Jersey: thf Publications, Neptune, 239p., 1974.
- ANDERSON, D.P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. **Annu. Rev. Fish Dis.**, 2: 281-307.
- BALDAN, A. P. Suplementação de cromo na dieta, utilização de carboidrato e desempenho produtivo do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Dissertação de Mestrado**. Jaboticabal, SP, p.46, 2004.
- BARCELLOS, L.J.G. et al. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, v.237, p.229-236, 2004.
- BARTON, B. A. Stress in finfish: Past, present and future—a historical perspective. In G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter, and C. B. Schreck (eds.), **Fish stress and health in aquaculture**, pp. 1–33. Soc. Exp. Biol. Sem. Ser. 62, Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K, 1997.
- BARTON, B. A.; IWAMA, G. K.. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Ann. Rev. Fish Dis.** 1:3–26, 1991.
- BASKIN, R. J ., R. L. LIEBER, T. OBA, AND Y. YEH. 1981 . Intensity of light diffraction from striated muscle as a function of incident angle. **Biophys. J.** 36:759-773.
- BELO, M. A. A., JUNIOR, J. F., SOARES, V.E., MORAES, F.R. Suplementação com DL – alfa acetato de tocoferila e parasitismo por *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) em *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae). **Acta Scietiarium**, v. 27, nº 1, p. 73 – 79, 2005.
- BLAXHALL, P.C. (1972): The haematological assessment of the health of freshwater fish. A review of selected literature. **J. Fish Biol.**,4, 593-604.
- BRACEWELL, R.H., AHMED, S. AND WALLACE, K.M. (2004), '**DRed and design folders**: a way of caputuring, storing and passing on - knowledge generated during design projects' in Design Automation Conference, ASME, Salt Lake City, Utah, USA.
- BRANDÃO, F. R., GOMES, L. C., CHAGAS, E. C. Resposta de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta amazônica**, v. 36 (3), p. 349 – 366, 2006.

- BOYD, C.E. Water quality management for pond fish culture. **Developments in aquaculture and fisheries science**, v. 9, p. 318. 1982
- BOUCK RG, BALL RC (1966). Influence of capture methods on blood characteristics and mortality in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Trans. Am. Fish Soc.** 95: 167 – 176.
- CADAVID GARCIA, E .A. **O clima do Pantanal Mato-grossense**. Corumbá: Embrapa-CPAP, 1984. 39p. (Embrapa-CPAP. Circular Técnica, 14)
- CAMARGO, S. O.; POUHEY, J. L.; MARTINS, C. Parâmetros eritrocitários do jundiá (*Rhamdia quelen*) submetido à dieta com diferentes níveis de proteína. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1406 – 1411, nov/ dez, 2005. *et al.* (2005
- CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. **Aquac. Res.**, 32: 297-304, 2001.
- CARVALHO, C. S.; FERNANDES, M. N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. **Aquaculture**, v. 251 (1), p. 109 – 117, 2006.
- CHEKRABARTHY P, BENERJEE V Effects of sublethal toxicity of three organophosphorus pesticide on the peripheral haemogram of the fish, (*Channa punctatus*). **Environ. Ecol.** 6: 151 – 158, 1988.
- CHROUSOS GP. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. **Ann N Y Acad Sci** 851:311–335, 1998.
- COLOMBO, L.; PICKERING, A. D.; BELVETERE, P.; SCHERECK, C. B. Stress inducig and stress reaction in aquaculture. In. DE PANW, N., BILLARD, R. (eds), Bredene: Aquaculture Europe 89 – business Joins Science, especial publication, v. 18, p. 93 – 121, 1990.
- COSTA, O. F. T.; FERREIRA, D. J. S.; MENDONÇA, F. L. P.; FERNANDES, M. N. Suceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalmine) to short – term exposure to nitrite. **Aquaculture**, v. 232, p. 627 – 636, 2004.
- EDDY, F.B. Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. In: Pickering A. D. (Ed). **Stress and fish**. Academic Press, London. p. 77-102, 1981.
- FUJIMOTO, R. Y., CASTRO, M. P., MORAES, F. R., GONÇALVES, F. D. Efeitos da suplementação alimentar com cromo trivalente em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, (HOLMBERG, 1887) mantido em diferentes densidades de estocagem. Parâmetros fisiológicos. **B. Instituto de Pesca**, 31 (2), p. 155 – 162, 2005.
- GRONOW, G., 1974. Uber die Anwendung des an Saugtieren erarbeiten Begriffes 'Stress' auf Knochenfische. **Zool. Anz.** 192, 316-331.
- HATTINGH J, VAN PLETZEN AJJ. The influence of capture and transportation on some blood parameter of freshwater fish. **Comp. Biochem physcol.** 49a: 607-609, 1974.
- HINES, R.S.; YASHOUV, A. Differential leukocyte counts and total leukocyte and erythrocytes counts for same normal Israel mirror carp. **Israel J. Aquaculture Bamidgeh**, Rehovor, v.22, p. 106 – 113, 1970.
- HOCHACHKA P, SOMERO G. **Biochemical adaptation**. Prince- ton University Press, Princeton, NJ, 1984.

- IWAMA GK, GREER GL, LARKIN DA. Changes in some haematological characteristics of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in response to acute exposure to dehydroabietic acid (DHAA) at different exercise levels. **J. Fish. Res. Bd Can.** 33: 285 – 289, 1976.
- JORGENSEN J. “Coloured Petri Nets in UML-Based Software Development: Designing Middleware for Pervasive Healthcare”, **4th Workshop and Tutorial on Practical Use of Coloured Petri Nets and CPN Tools**, 2002.
- JENEY, Z., JENEY, G AND MAULE, A.G., 1992. Cortisol measurement in fish. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaatari, S.L. and Rowley, A.F. (Editors). **Techniques in Fish Immunology**. SOS Publications, Fair Haven, NJ, pp. 157.166.
- JENEY, G., JENEY, Zs. Application of immunostimulants for modulation of the non – specific defense mechanism in sturgeon hybrid: *Acipenser ruthenus x A. baerii*. **J. Appl. Ichthyology**, vol, 18, p. 416 – 419, 2002.
- KORI-SIAKPERE, O.; AKE, J. E. G.; IDOGE, E. Hematological characteristics of the African snakehead, *Parachanna obscura*. **African J. Of Biotechnology**, v. 4 (6), p. 527 – 530, 2005.
- KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: F.Kubtiza, 289p., 2000.
- LOGASWAMY, S.; RADHA, G.; SUBHASHINI, S., LOGANKUMAR, K. Alteration in the Levels of Ions in Blood and Liver of Freshwater Fish, *Cyprinus carpio* var, *communs* Exposed to Dimethoate. **Environ Monit Assess**, v. 131, p. 439 – 444, 2007.
- LONE, K.P.; INCE, B.W.; MATTY, A.J. Changes in the blood chemistry of rainbow trout, *Salmo gaidneri* fish, in relat, ethylestrenol. **Journal of fish Biology**, v.20, p. 597 – 606, 1982.
- MARTEM.YANOV, V.I., Regulation Ranges of Sodium, Potassium, Calcium, and Magnesium Ions in Plasma, Red Blood Cells, and Muscles of the Carp *Cyprinus carpio*, **Zh. Evol. Biokhim. Fisiol.**, vol. 32, pp. 38.44, 1996.
- MAWDESLEY-THOMAS, L. E. and W. N. BONNER. 1971. Uterine tumors in a gray seal (*Halichoerus grypus*). **J. Pathol.** 103: 205-208.
- MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, p.201- 212. 1977.
- MELO, J.F.B.; TAVARES-DIAS, M.; LUNDESTEDT, L.M.; MORAES, G. feito do conteúdo de proteína na dieta sobre os parâmetros hematológicos e metabólicos do bagre sul americano *Rhamdia quelen*. **Revista Ciência Agroambiental**, v. 1, n. 1, 2006.
- MOISEENKO, T.I. Hematological indices of fishes in the evaluation of their toxicoses with references to *oregonus lavaretus*. **Journal Ichthyology**, Silver Spring, v. 38, n.4, p. 315 – 324, 1998.
- MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Fish Biol. Fish.**, 9: 211-268, 1999.
- MORAES, G., AVILEZ, I. M.; ALTRAN, A. E.; BARBOSA, C. C. Biochemical and hematological responses of the banded knife fish *Gymnotus carapo* (Linnaeus,

- 1758) exposed to environmental hypoxia. **Braz. J. Biol.**, v. 62 (4A), p. 633 – 640, 2002.
- MORAES, G. CHOUDHURI, J. V.; SOUZA, R. H. S.; NETO, C. S. Metabolic effects of exercise in the goldfish *Salminus maxillosus*, “dourado” (Valenciennes, 1849). **Braz. J. Biol.**, v. 64 (3B), p. 655 – 660, 2004.
- MORAES, F.R.; MARTINS, M. L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSI, D. M.; CASTAGNOLI, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. **Sociedade Bras. Aquic. E biologia Aquat.**. Editora Tecart, São Paulo, p. 343 – 386, 2004.
- MORGAN, J.D.; IWAMA, G.K.. Measurements of stressed states in the field. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, New York, NY. p. 247-270, 1997.
- MULCHAHY KF Blood values in the pike, *Esox lucius* (L). **J. Fish Biol.** 2: 203 – 209, 1970.
- PICKERING, A. D. Introduction: The concept of biological stress. In **Stress and Fish**, ed. A. D. Pickering. Academic Press, London, pp. 1-8, 1981.
- PRAVDA, D. The present European ichthyopathology and perspectives towards the 21st century. **Acta Vet. Brno.**, Tchecoslováquia, v. 67, p. 205 – 206, 1998.
- RAA, J., RORSTAD, G., ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: Diseases in Asian Aquaculture I (ed. by M. Shariff, R.P. Subasinghe & J.R. Arthur), pp. 39–50. Proceedings of the First Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, 26–29 November 1990. **Asian Fisheries Society**, Manila, Philippines, 1992.
- RANDALL, D. J.; PERRY, S. F. Catecholamines. In W. S. Hoar and D. J. Randall (eds.), **Fish physiology**, Vol. 12B, pp. 255– 300. Academic Press, New York, 1992.
- RANZANI – PAIVA, M.J.T. Características sanguíneas da pirapitinga do sul, *Brycon* sp, sob condições experimentais de criação intensiva. **Brazilian J. Vet. Anim. Sci.**, v. 28, n. 2, p. 141 – 153, 1991.
- RANZANI – PAIVA, M.J.T.; SALLES, F.A.; EIRAS, J.C. Análise hematológica de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v.25, p. 77 – 83, 1998/1999.
- ROCHER, H.; BOGÉ, G. Fish Blood Parameters as a Potential Tool for Identification of Stress Caused by Environmental factors and Chemical Intoxication. **Marine Environmental Research**, v. 41, n. 1, p. 27 – 43, 1996.
- RAVEL, R. **Laboratório clínico – aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.616, 1997.
- SAS-STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE, Inc. **SAS user’s guide: Statistics**. Cary: SAS Inst., Inc. 1998, 956p
- SEDDIQUI AK, MISHRA S. Blood dyscrasia in a teleost *Colisa fasciatus* after acute exposure to sublethal concentrations of lead, **J. Fish Biol.** 14: 199 – 204, 1979.

- SELYE, H. The evolution of the stress concept. **Am. Sci.** 61: 692–699, 1973.
- SELYE, H. **Stress without distress**. McClelland Stewart, Toronto, 1974.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. **Limnologia aplicada à Aqüicultura**. Jaboticabal: FUNEP, 1995.
- SOIVIO, A.; OIKARI, A.; Hematological effects of stress on a teleost, *Esox lucius*. **Journal of fish biology**, London, v.8, n.5, p. 397 – 411, 1976.
- TAVARES-DIAS, M.; FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; CAMPOS-FILHO, E.; MORAES, F.R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Parâmetros eritroleucométricos, trombométricos e glicemia do matrinxã *Brycon cephalus* Günther, 1869 (Osteichthyes: characidae). **ARS Vet.**, 15 (3): 149-153, 1999.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; SHALSCH, S. H. C.; ONAKA, E. M.; QUINTANA, C. I. F.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae), tratado com sulfato de cobre (CuSO₄). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 547 – 554, 2002.
- TAVARES – DIAS, M.; MATAQUEIRO, M. I. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 157 – 162, 2004.
- URBINATI, E.C.; ABREU, J.S.; CAMARGO, A.C.S.; LANDINES, M.A.P. 2004. Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture*, 229: 389-400, 2004.
- WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiol. Rev.**, 77 (3): 591-625, 1997.
- WELLS, R.M.G.; PANKHURST, N.W. Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein as stress indicators in fish. **Journal of World Aquaculture Society** 30: 276–284, 1999.
- WEDEMEYER, G.A., BARTON, B.A.; MCLEAY, D.J. Stress and acclimation. In: C.B. Schreck, P.B. Moyle (Editors). *Methods for Fish biology*. Am. Fish. Sot. Bethesda, MD, pp. 451-489, 1990.
- WEDEMEYER, G.A. Some physiological consequences of handling stress in the juvenile com salmon (*Oncorhynchus kisuth*) and steelhead trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of fisheries Research Board of Canada**, Toronto, v.29, p. 1780 – 2783, 1993.
- WILSON, R.W.; TAYLOR, E.W. the physiological responses of freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mikiis*) during acutely lethal cooper exposure. **Journal of Comparative Physiology**, Berlinv. 163, p. 38 – 47, 1993.
- YANO, T.; LINEHAN, M.; ANGLARD, P.; LERMAN, M. I.; DANIEL, L. N.; STEIN, C. A.; ROBERTSON, C. N.; LAROCCA, R.; ZBAR, B. Genetic changes in human adrenocortical carcinomas. **J Natl Cancer Inst**, v.81, p.518-523, 1989.
- YAVUZCAN-YILDIZ, H.; KIRKAĞAÇ-UZBILEK, M. The evaluation of secondary stress response of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*, Val. 1844) after exposing to the saline water. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 25, p. 287 – 290, 2002.

CAPÍTULO IV.

**Efeitos da administração oral do β - glucano, através da dieta,
na sobrevivência de juvenis de pacu, *Piaractus*
mesopotamicus, após o desafio com a bactéria *Aeromonas*
*hydrophila***

Resumo:

O β – glucano é o imunoestimulante mais utilizado no controle de doenças e sua aplicação pode ser eficiente nos processos produtivos. Já é estabelecido em peixes, que as células que envolvem respostas imunes por um amplo grupo de animais apresentam receptores específicos onde o β – glucano se liga, conduzindo a uma cascata de eventos que resultam em um aumento da imunidade no animal. O objetivo deste estudo foi observar a eficácia da administração oral do β - glucano na resistência de juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus* após inoculação da bactéria *Aeromonas hydrophila*, sendo continuamente alimentados durante 10 dias de desafio. Foram utilizados 48 juvenis de pacu ($24,7 \pm 2,0$ g) distribuídos em 8 aquários de vidro com capacidade volumétrica de 100 L (6 peixes/caixa). Para diferenciar os peixes conforme a repetição, estes foram marcados com miçangas na nadadeira dorsal. Pode-se observar que as rações peletizadas apresentaram uma sobrevivência significativamente maior em relação às rações extrusadas aos 15, 30 e 90 dias. As mortalidades ocorreram 24 horas após a inoculação da bactéria por injeção intraperitoneal, sendo que até o fim dos 10 dias a sobrevivência foi registrada diariamente. Estes resultados mostram a importância da dose de inclusão oral do glucano além do período correto a ser administrado, já que somente aos 30 dias pôde-se observar eficiência do β -glucano após inoculação da bactéria *A. hydrophilla*.

Palavras-chave: pacu, desafio, β - glucano, sobrevivência.

Abstract:

The immunostimulant β -glucan is the most used in control of diseases and their application can be effective in productive processes. β -glucan proves contain valuable substances that control disease in fish, and its application can be fruitful in control of disease in fish culture. Fish is already established, that the cells involving immune responses by a broad group of animals have specific receptors which connects glucan, leading a cascade of events resulting in an increase in animal's immunity. This trial purpose observes the efficiency of β - glucan administration on survival of pacu juveniles, *Piaractus mesopotamicus* after *Aeromonas hydrophila* bacterial inoculation. In this trial were used 48 pacu juveniles ($24,7 \pm 2,0$ g) distributed in 8 aquariums (6 fish/aquarium). It was shown that pelletized diets submitted a significantly high survival when compared with extruded diets for 15, 30 and 90 days. The mortalities occurred after 24 hours after intraperitoneal application, by the end of 10 days, survival was daily registered. This result shows the importance of the inclusion of the dose, the oral administration and the period of administration. In this study only on 30 days it could be observed the efficiency of β -glucan after bacterial inoculation.

Palavras-chave: pacu, bacterial, β - glucan, survival.

1. Introdução

O interesse no uso de substâncias imunoestimulantes em rações é profilático. A maioria dos microorganismos, que causam doenças em peixes usando problemas, é descrita como oportunista, causando problemas quando os animais estão fracos e/ou estressados por condições adversas. Desta forma tais compostos devem ser utilizados no período de produção, previamente a situações de manejo, mudança de temperatura e de ambiente, alta densidade de estocagem dentre outras.

O β -glucano provou ser uma substâncias valiosas no controle de doenças em peixes, e sua aplicação pode ser proveitosa nos processos produtivos. As propriedades imunomodulatórias dessas substâncias foram demonstradas inicialmente em mamíferos, onde os resultados demonstraram a indução da hematopoiese, aumentando a imunidade em consequência a resistência a agentes patogênicos (DILUZIO, 1985). Quando administrados oralmente, os glucanos são capazes de estimular as respostas imunes e resistência dos peixes às doenças (RAA *et al.*, 1992; NIKL *et al.*, 1993; SIWICKI *et al.*, 1994).

Já é estabelecido que células que envolvem respostas imunes por um amplo grupo de animais apresentam receptores específicos onde o β – glucano se liga, conduzindo a uma cascata de eventos que resultam em um aumento da imunidade no animal (KUMAR *et al.*, 2005). Os receptores são identificados e caracterizados nas células brancas do sangue dos peixes, nos camarões os receptores são os hemócitos. A primeira resposta do β – glucano no organismo dos peixes é a ativação dos mecanismos de defesa do sistema não – específico quando existe invasão por um patógeno. Porém o mecanismo de defesa específico, quando responde contra um patógeno, obtém o auxílio do β - glucano (KUMAR *et al.*, 2005), na fagocitose.

O grupo das *Aeromonas* é responsável por grande mortalidade dos peixes, apresentando uma vasta distribuição mundial, isso por sua enorme adaptação em diferentes ambientes aquáticos (MATEOS *et al.*, 1993). A infecção por *Aeromonas* pode ser observada em várias espécies de peixes de água tropicais e eventualmente em espécies marinhas, répteis, bovinos e até mesmo o homem

(BULLOCK *et al.*, 1971; KHARDORI & FAINSTEIN, 1988). Desta forma, os efeitos cumulativos de quimioterápicos no ambiente e na ictiologia dos peixes cultivados está recebendo especial atenção (DEPAOLA *et al.*, 1995).

Um dos maiores problemas envolvendo o tratamento com antibióticos contra *Aeromonas hydrophila* isolada de peixes confinados é a rápida resistência ao antibiótico desenvolvida pela bactéria. A resistência múltipla a antibióticos (RMA) registrada para *Aeromonas hydrophila* isolada de peixes de águas tropicais em cultivo intensivo está associado a grande variedade de drogas, comumente utilizadas como aditivos alimentares (AOKI *et al.*, 1971; PETTIBONE *et al.*, 1996; VIVEKANANDHAN *et al.*, 2002).

O objetivo deste estudo foi observar a eficácia da administração oral do β - glucano na resistência de juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus* após a inoculação com a bactéria *Aeromonas hydrophila*.

2. Material e Métodos

2.1. Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução de Peixes, do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), em Jaboticabal, São Paulo.

2.2. Material Biológico e Condições Ambientais

Foram utilizados 48 juvenis de pacu ($24,7 \pm 2,0$ g) a cada 15 dias distribuídos em 8 caixas plásticas (100L) (total de 192 peixes). Em cada peixe foi suturada uma miçanga colorida conforme a repetição do tratamento, já que estes durante o desafio permaneceram juntos. A água foi proveniente de poço artesiano e o sistema foi provido de aeração contínua e controle de temperatura ($26 - 28^{\circ}\text{C}$).

2.3. Avaliação dos Parâmetros físico-químicos da água

A temperatura média dos aquários foi aferida diariamente com um termômetro de máxima e mínima. As determinações de alcalinidade total (mg de CaCO_3/L), amônia ($\mu\text{g}/\text{L}$), oxigênio dissolvido (mg O_2/L) e potencial hidrogênionico (pH) foram realizadas ao início e ao fim do desafio.

2.4. Manejo Alimentar, Dietas Experimentais e Delineamento Experimental

Após a aplicação intraperitoneal da *Aeromonas hydrophila* os peixes foram alimentados duas vezes ao dia sendo uma pela manhã e outra ao final do dia. A distribuição de ração foi realizada até não haver mais procura pelos peixes, para evitar sobras. A formulação e a composição da dieta experimental são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Formulação e composição percentual e calculada das dietas experimentais
 Table 1 – Percentual and calculated composition of experimental diets

Ingredientes <i>Ingredients</i>	Controle (0%)	T1 (0,3%)	T2 (0,2%)	T3 (0,1%)
Farelo de Soja <i>Soybean meal</i>	45,5	45,5	45,5	45,5
Milho <i>Corn</i>	22	22	22	22
Farelo de Trigo <i>Wheat bran</i>	15	15	15	15
Farinha de peixe <i>Fish meal</i>	13	13	13	13
Bagaço de cana <i>Cane sugar bagasse</i>	1,5	1,4	1,3	1,2
Óleo de Soja <i>Soybean oil</i>	1,5	1,5	1,5	1,5
Sup. vitamínico mineral ² <i>Viatmin ans Mineral premix</i>	1,5	1,5	1,5	1,5
β - glucano ¹ <i>β - glucan</i>	0	0,1	0,2	0,3
Total	100	100	100	100
Composição química <i>Chemical composition</i>				% de inclusão <i>% inclusion</i>
Matéria Seca <i>Dry matter</i>				89,91
Proteína bruta <i>Crude protein</i>				32,06
Energia bruta (kcal/kg) <i>Gross energy</i>				4096,03
Extrato etéreo <i>Ether extract</i>				3,18
Fibra bruta <i>Crude fiber</i>				4,48
Matéria mineral <i>Ashes</i>				7,34
Extrato não nitrogenado ³ <i>Nitrogen free extract</i>				38,53

¹ Nos níveis 0,0, 0,1, 0,2 e 0,3% as diferenças foram preenchidas com elemento inerte.

² Suplemento vitamínico mineral Rovimix peixe: vit. A: 5000.000 UI; vit. D3: 200.000 UI; vit. E: 5.000 UI; vit. K3: 1000 mg; vit. B1: 1500 mg; vit. B2: 1500 mg; vit. B6: 1500 mg; vit. B12: 4000 mg; vit. C: 15000 mg; ácido fólico: 500 mg; ácido pentotênico: 4000 mg; B.H.T.: 12,25 g; biotina: 50 mg; inositol: 1000 mg; nicotinamida: 7000 mg; colina: 40 g; cobalto: 10 mg; cobre: 500 mg; ferro: 5000 mg; iodo 50 mg; manganês: 1500 mg; selênio: 10 mg; zinco: 5000 mg; veículo q. s. q. : 1000 mg.

³ ENN (%) = MS (%) - (PB (%) + EE (%) + FB (%) + MM (%)).

As rações peletizadas foram produzidas na Unidade de Preparação de Rações do Centro de Aqüicultura da Unesp e na Fábrica de Rações da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp – Campus de Jaboticabal e as dietas extrusadas em uma fábrica de ração comercial.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado fatorial 2 x 4, com 3 repetições, avaliando-se dois processamentos das dietas experimentais (extrusadas e peletizadas) contendo o β - glucano nas seguintes concentrações: 0 (controle), 0,3%, 0,2% e 0,1%. A composição do β – glucano empregado neste estudo encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Características físicas e químicas do β – glucano (g/ 100g do produto)
 Table2 – Physical and chemical characteristics of β – glucan (g/ 100 g of product)

Ingredientes <i>Ingredients</i>	% de inclusão <i>% of inclusion</i>
Totais de β - glucano <i>β - glucano total</i>	Min. 85,0
Proteínas totais (N x 6,25) <i>total protein</i>	Máx. 4,0
Umidade total (105 +/- 2°C) <i>total moistness</i>	Máx. 10,0
pH (solução 10%) <i>ph (10% solution)</i>	4,6 - 6,0
Capacidade de absorção da água (ml/g) <i>water absorption capacity</i>	6,6
Metais pesados ppm <i>heavy metals</i>	< 2

2.5. Desafio com a bactéria *A. hydrophila*

A cepa bacteriana utilizada foi fornecida pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do CAUNESP, Campus de Jaboticabal.

Determinada a DL_{50} para a espécie, os peixes foram inoculados com a *A. hydrophila* por meio de inoculação intraperitoneal com a concentração determinada de 10^7 UFC ml^{-1} contido em 0,1 ml de tampão fosfato (PBS). A avaliação da mortalidade foi efetuada diariamente, juntamente com a alimentação durante 10 dias.

Para avaliação do sistema imune, 6 peixes de cada tratamento foram submetidos a um desafio com *Aeromonas hydrophila*. Os peixes foram coletados aos 15, 30, 60 e 90 dias experimentais, onde permaneceram durante 10 dias em caixas plásticas.

Após o início do desafio, a mortalidade e a ocorrência de sinais clínicos foram observadas. É importante ressaltar que as mortalidades ocorreram 24 horas após a inoculação da bactéria por injeção intraperitoneal, sendo que até o fim dos 10 dias a sobrevivência foi registrada diariamente.

2.6. Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as diferenças ($P < 0,05$) entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. As taxas percentuais de sobrevivência sofreram transformação arco seno $\sqrt{\%/100}$. A análise estatística dos resultados foi realizada com a utilização do programa estatístico SAS 9.0.

3. Resultados

Os parâmetros físicos e químicos foram mensurados aleatoriamente por aquário e podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3 – Valores médios \pm desvio padrão e coeficiente de variação dos parâmetros físicos e químicos da água dos aquários de juvenis de pacu.

Table 3 – Means values \pm standard variation of physical and chemical parameters of aquarium water of pacu juveniles.

	Tratamentos <i>Treatments</i>	CV% <i>Variance coefficient</i>
Temperatura ($^{\circ}$ C) <i>Temperature</i>	26,28 \pm 0,32	1,52
Alcalinidade (mg/L) <i>Alcalinity</i>	82,7 \pm 3,96	2,87
Amônia (μ /L) <i>Ammonia</i>	6,87 \pm 1,39	2,34
Oxigênio dissolvido (mg/L) <i>Dissolved oxygen</i>	6,04 \pm 1,87	3,05
pH <i>pH</i>	7,56 \pm 0,22	3,04

Os tipos de processamentos das dietas proporcionaram diferenças nas taxas de sobrevivência dos peixes, o que pode ser observado na Tabela 4. Os peixes que receberam as rações peletizadas apresentaram uma sobrevivência significativamente maior em relação aos que receberam as rações extrusadas aos 15, 30 e 90 dias.

Aos 15 dias o grupo controle apresentou maior sobrevivência (51,39%) em relação aos tratamentos 0,3% e 0,2%. O tratamento com menor inclusão de β -glucano foi o que mais se assemelhou ao grupo controle, provavelmente neste período o imunoestimulante não apresentou efeito ao desafio com *A. hydrophilla*.

Após 30 dias o β -glucano influenciou positivamente na porcentagem de sobrevivência ao nível de 0,1% de inclusão de β -glucano apresentado uma sobrevivência maior (93,06%) em relação ao tratamento controle (58,34%) 10 dias após a inoculação da bactéria. Além disso, o nível com 0,2% de inclusão apresentou-se semelhante ao tratamento com 0,1% de inclusão de glucano.

Após 60 dias de experimentação, os peixes expostos ao desafio apresentaram baixa sobrevivência após 10 dias da inoculação, para os tratamentos controle (16,67%), 0,3% (16,67%) e 0,2% (16,67%). O tratamento 0,1% apresentou maior sobrevivência (37,5%), porém diferindo-se dos tratamentos citados acima.

No último desafio, aos 90 dias, houve um aumento significativo da sobrevivência entre o grupo controle (65,28% de sobrevivência) e os tratamentos com β - glucano (todos os tratamentos apresentaram 72,23% de sobrevivência), sendo que estes últimos apresentaram maior sobrevivência à bactéria.

Em todos os períodos deste estudo, após a inoculação com a bactéria, foi possível observar os sinais clínicos típicos de septicemia hemorrágica, como hemorragias subcutâneas, protuberância das escamas e exoftalmia.

Tabela 4 – Valores de F, coeficiente de variação (CV) e médias obtidas para sobrevivência (%) de juvenis de pacu.

Table 4 – F values, coefficient of variance (CV) and means survival (%) of pacu juveniles.

	Estatísticas <i>Statistics</i>	Intervalos Experimentais (dias) Experimental intervals (days)			
		15	30	60	90
Valores para F <i>F values</i>	Processamento (P) <i>Processment</i>	1,9*	36,82*	0,96ns	34,32*
	Níveis (N) <i>Levels</i>	2,8*	8,94*	0,86ns	0,42ns
	Interação (P x N) <i>Interactions</i>	0,93ns	11,36	0,86ns	13,98
	CV	50,67	68,5	49,74	62,6
Médias Processamento <i>Processment Means</i>	Ração Extrusada <i>Extruded diet</i>	26,61b	53,34b	16,67a	54,87b
	Ração Peletizada <i>Pelletized diet</i>	37,5a	89,59a	27,08a	86,12a
Médias Níveis <i>Levels Means</i>	Controle (0%) <i>Control</i>	51,39a	58,34c	16,67a	65,28a
	0,30%	16,67b	65,28bc	16,67a	72,23a
	0,20%	16,67b	79,17ab	16,67a	72,23a
	0,10%	37,50ab	93,06a	37,50a	72,23a

ns – não significativo

* (p < 0,05)

CV - coeficiente de variância (%)

Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05)

4. Discussão

A qualidade da água dos tanques não foi alterada, sendo que os parâmetros avaliados permaneceram de acordo com os padrões recomendados por SIPAÚBA-TAVARES (1995) e KUBITZA (2000).

Alguns autores preconizam que as rações peletizadas têm uma melhor eficiência alimentar, pois faz a destruição parcial de alguns fatores antinutricionais (KUBITZA, 1998; PEZZATO, 1997), além disso, em relação à energia, a peletização proporciona um aumento do valor energético dos nutrientes (ANDREWS, 1991). Sendo assim pode se afirmar que animais mais bem nutridos apresentam maior resistência a infecções bacterianas.

MISRA *et al.* (2006) após 28 dias de administração oral de β -glucano observaram que o *L. rohita* apresentou maior resistência neste período à infecção com *A. hydrophila* e *E. tarda*, porém com uma concentração de 250 mg Kg⁻¹ (0,25%). MATSUO & MIYAZANO (1993) em estudos com truta arco-íris também mostraram eficácia do β -glucano em torno dos 28 dias de administração oral.

Segundo CHEN & AINSWORTH (1992) o β -glucano em um pequeno período molda-se no sistema imunológico, potencializando-o, sendo que sua administração contínua pode ser necessária para manter as populações celulares ativadas em peixes durante períodos críticos de algumas doenças.

Existe uma forte evidência experimental de que a administração do glucano na dieta pode modificar a atividade de alguns componentes do sistema imune inato aumentando a resistência dos peixes à bacterioses (GALEOTTI, 1998; ROBERTSEN, 1999; SAKAI, 1999). O aumento da resistência a bactérias nocivas observadas em peixes teleósteos após a administração do glucano pode acrescentar um reforço para o aumento da eficácia do sistema imune inato nos aspectos celulares e humorais (CRUMLISH & INGLIS, 1999). O β - glucano obtido da parede celular de leveduras está sendo bastante utilizado em pesquisas recentes, porém vem apresentando resultados contraditórios. Em trutas arco-íris a administração oral de β - glucano mostrou eficiência na resistência contra furunculose (SIWICKI *et al.*, 1994) e no salmão do Atlântico contra *Vibrio*

salmonicida e *Vibrio angillarum* (RAA *et al.*, 1992). COUSO *et al.* (2003) administrando oralmente o glucano no “gilthead seabream” também apresentou melhor resistência à infecção contra a pasteurelose após a ingestão do imunoestimulante. Contraditoriamente o β - glucano não apresentou eficácia contra *Enterococcus* sp. no “turbot” (*Scophthalmus maximus*) (TORANZO & BARJA., 1995) ou contra *Vibrio angillarum* (OGIER DE BAULNY *et al.*, 1996). DUNCAN & KLESIUS (1996) também não apresentaram resultados satisfatórios na eficiência do glucano no bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) contra *Edwardsiella ictaluri*.

Em peixes, o principal aspecto da patogênese em todas as infecções causadas por esta bactéria é a disseminação generalizada na forma de septicemia, seguida da elaboração de toxinas, necrose de tecidos e septicemia hemorrágica (DEAN & TOST, 1967; KETOVER *et al.*, 1973; JOSEPH *et al.*, 1979). Os peixes doentes e infectados por *A. hydrophila* apresentam hemorragias cutâneas nas nadadeiras e na superfície do corpo, sendo tal condição normalmente referida como “red fin disease” (HOSHINA, 1962).

Aos 90 dias, apesar de não haver diferenças estatísticas a inclusão do β -glucano na ração apresentou maior sobrevivência, sendo assim uma dose menor acaba por diminuir o custo do quilo da ração, que obtenha a inclusão de um imunoestimulante eficaz a saúde da produção. Estes resultados mostram a importância da dose de inclusão oral do glucano além do período correto a ser administrado, já que somente aos 30 dias pôde-se observar eficiência do β -glucano após inoculação da bactéria *A. hydrophila*.

Sendo assim, é importante o planejamento de um protocolo alimentar (período de administração, tipo e dose de β - glucano) já que a eficiência do glucano nas diferentes espécies de peixes e patógenos variam tanto (ROBERTSEN, 1999). Por essa razão, a dose efetiva e o período de administração devem ser investigados caso a caso, já que a comparação entre outros estudos é dificultada.

5. Conclusão

A suplementação de 0,1% kg⁻¹ de β – glucano em rações peletizadas resultou em maior sobrevivência dos pacus submetidos ao desafio com a bactéria *A. hydrophila*.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, G. Concurrent Programming: **Principles and Practice**. Benjamin Cummings, 1991
- AOKI, T.; EGUSA, S.; OGATA, Y.; WATANABE, T. Detection of resistance factors in fish pathogen *Aeromonas liquefaciens*. **Journal of General Microbiology**, v.65, p.343-349, 1971.
- BULLOCK, G.L.; CONROY, D.A.; SNIESKO, S.F. Septicemic diseases caused by motile aeromonads and pseudomonads. In: SNIESKO, S.F.; AXELROD, H.R. (Ed.) **Diseases of fishes**. Neptune:T.F.H. Publ., 1971. v.2A, p.21-41: Bacterial diseases of fishes.
- CHEN, D.; AINSWORTH, A.J. Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel catfish *Ictalurus punctatus* Rafinesque. **J. Fish Dis.** 15 (1992), pp. 295–304.
- COUSO H.; FREIRE-SANTOS, F.; MARTÍNEZ-URTAZA, J.; GARCÍA-MARTÍN, O.; ARES-MAZÁS, M.E. Contamination of bivalve molluscs by *Cryptosporidium* oocysts: the need for new quality control standards. **International Journal of Food Microbiology** 87, p. 97–105, 2003.
- CRUMLISH, M.; INGLIS, v.; Improved Disease Resistance in *Rana rugulosa* Following Glucan Administration. **Aquaculture Research**, 1999.
- DEAN, H.M.; TOST, R.M.; fatal infection with *Aeromonas hydrophila* in a patient with acute myelogenous leukaemia. **Annals Internal Medicine**, v. 66, p. 1117 – 1179, 1967.
- DePAOLA, A.; PEELER, J.T.; RODRICK, G.E. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of Gramnegative bacteria in catfish ponds. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.2335-2340, 1995.
- DI LUZIO, N.R. Update on the immunomodulating activities of glucans. Springer **Semin. Immunopathol.** v. 8, p. 387-400, 1985.
- DUNCAN & KLESZIUS, 1996
- GALEOTTI, S.; What happened to small benthic foraminifera at the Cretaceous/Tertiary boundary. **Bull. Soc. Ge'ol. Fr.**, 169, 271–279, 1998.
- HOSHINA, T. Studies on Red-fin Disease of Eel [in Japanese]. **Special Research Report of Tokyo University of Fisheries**, No. 6. Tokyo, Japa, p. 105, 1962.
- JOSEPH, S.W., DAILY, O.P., HUNT, W.S., SEIDLER, R.J., ALLEN, D.A. AND COLWELL, R.R. *Aeromonas* primary wound infection of a diver in a polluted waters. **J. Clin. Microbiol.** 10, pp. 46–49, 1979.
- KETOVER, B.P.; YOUNG, L.S., ARMSTRONG, D. Septicemia due to *Aeromonas hydrophila*: Clinical and immunological aspects. **J. Infect. Dis.**, 127: 284 – 290, 1973.
- KHARDORI, N.;FAINSTEIN, V. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agentes. **Ann. Revta Microbiol.** 42:p. 395-419, 1988.
- KUMAR, V.; SAURABH, S.; SAHU, N. P.; PAL, A. K. B – Glucan, a feed Additive to Manage Aquatic Animal Health. **Aqua Feeds: Formulation & Beyond**, v. 2, issue 3, 2005.

- KUBITZA, F. **Nutrição e alimentação de peixes cultivados**. Campo Grande: Fernando Kubitza, 1998. 44p
- KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: F.Kubitza, 289p., 2000.
- MATEOS, D.; ANGUITA, J.; NAHARRO, G.; PANIAGUA, C. Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.74, p.111-118, 1993.
- MATSUO, K.; MIYAZANO, I. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, p. 1377-1379, 1993.
- MISRA, K. M.; DAS B. K.; MUKHERJEE, S. C.; PATTNAIK, P. Effect of long term administration of dietary β – glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture**, 255, p. 84 – 94, 2006.
- MITCHELL, A.J.; PLUMB, J.E. Toxicity and efficacy of Furanace on channel catfish infected experimentally with *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Fish Diseases**, v.3, p.93-100, 1980.
- NIKL, L., ALBRIGHT, L.J., EVELYN, T.P.T., 1993. Trials with an orally and immersion-administered p-1.3 glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. **Dis. Aquat. Org.**, v.17, p. 191-196, 1993.
- PETTIBONE, G.W.; MEAR, J.P.; SAMPSELL, B.M. Incidence of antibiotic and metal resistance and plasmid carriage in *Aeromonas* isolated from brown nullhead (*Ictalurus nebulosus*). **Letters in Applied Microbiology**, v.23, p.234-240, 1996.
- PEZZATO, L.E. O estabelecimento das exigências nutricionais das espécies de peixes cultivadas. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1997, Piracicaba, SP. *Anais Piracicaba*, p.45-62, 1997.
- PLUMB, J.A. **Health maintenance of cultured fishes: principal microbial disease**. New York: CRC Press, 254 p., 1994.
- RAA, J., RORSTAD, G., ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: Diseases in Asian Aquaculture I (ed. by M. Shariff, R.P. Subasinghe & J.R. Arthur), pp. 39–50. Proceedings of the First Symposium on Diseases in Asian Aquaculture. **Asian Fisheries Society**, Manila, Philippines, 1992.
- ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 9:269 – 290, 1999.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 172, p. 63-92, 1999.
- SAS-STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE, Inc. **SAS user's guide: Statistics**. Cary: SAS Inst., Inc. 1998, 956p
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. **Limnologia aplicada à Aqüicultura**. Jaboticabal: FUNEP, 1995.
- SIWICKI, A.K., ANDERSON, D.P., RUMSEY, G.L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 41, 125-139, 1994.

- TORANZO AE, BARJA JL. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum* with special reference to aquaculture in the northwest of Spain. **Dis aquat Org** 9:73-82, 1990.
- VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A.A.M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.165-168, 2002.

Nome do arquivo: Dissertação Marianne Schorer
Pasta: F:\Mari Experimento
Modelo: C:\Documents and Settings\Proprietário\Dados de aplicativos\Microsoft\Modelos\Normal.dot
Título: CAPÍTULO I
Assunto:
Autor: MICRO
Palavras-chave:
Comentários:
Data de criação: 30/7/2008 15:18
Número de alterações: 6
Última gravação: 30/7/2008 15:43
Gravado por: Hans
Tempo total de edição: 3 Minutos
Última impressão: 30/7/2008 16:05
Como a última impressão
Número de páginas: 105
Número de palavras: 23.537 (aprox.)
Número de caracteres: 134.161 (aprox.)