

**PROBIÓTICO NO DESEMPENHO PRODUTIVO, HEMATOLOGIA E MIGRAÇÃO DE
MACRÓFAGOS DO MATRINXÃ *Brycon amazonicus***

Danielle de Carla Dias
Bióloga

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
Julho de 2010

**PROBIÓTICO NO DESEMPENHO PRODUTIVO, HEMATOLOGIA E MIGRAÇÃO DE
MACRÓFAGOS DO MATRINXÃ *Brycon amazonicus***

Danielle de Carla Dias
Bióloga

Orientadora: Dra Maria José T. Ranzani de Paiva

Co-orientadora: Dra Elizabeth Romagosa

Tese apresentada ao Centro de Aquicultura da Unesp, sediado no Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
Julho de 2010

D541p Dias, Danielle de Carla
Probiótico no desempenho produtivo, hematologia e migração de macrófagos do matrinxã, *Brycon amazonicus*/ Danielle de Carla Dias. – – Jaboticabal, 2010
ii, 112 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura da UNESP - CAUNESP, 2010
Orientador: Maria José Tavares Ranzani de Paiva
Banca examinadora: Margarida Maria Barros, Fernando Corleto Maiorino Eduardo Makoto Onaka, , Sérgio Henrique Canello Schalch
Bibliografia

1. Promotor de crescimento. 2. Imunidade inespecífica. 3. Reprodução. I. Título. II. Jaboticabal - Centro de Aqüicultura da UNESP.

CDU 639.3:043

O homem não teria alcançado o possível se repetidas vezes não tivesse tentado o impossível.

(Max Weber)

Não sabendo que era impossível, foi lá e fez.

(Jean Cocteau)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com todo meu amor e carinho

*Aos meus pais Carlos Roberto Dias e Marly Ap. da Silva
Dias e meu irmão Igor Roberto Dias pelo incentivo,
ensinamentos e carinho de uma vida inteira.*

*Ao meu namorado Fabio Coelho Teixeira por estar
ao meu lado e sempre me incentivar.*

*Ao Dr. Leonardo Tachibana pois sem
sua ajuda não teria conseguido
terminar os experimentos.*

*A toda minha família, em especial, meus avós
Julião Dias, Durvalina de Moraes Dias e
Maria Flore da Silva e minhas tias Magaly e
Mara pelo carinho de uma vida inteira.*

Agradecimentos:

Quero expressar meu sincero agradecimento a todas aquelas pessoas que participaram do Projeto Probiótico Matrinxã. Como são muitas pessoas, se por um acaso esquecer alguém, espero que me perdoem.

- ✓ Primeiramente quero agradecer duas pessoas que foram os alicerces deste projeto, que são minhas orientadoras e amigas Dra. Maria José Tavares Ranzani Paiva (Mãesé) e Dra. Elizabeth Romagosa, obrigada por acreditaram em mim, devo muito a vocês e espero um dia poder retribuir....adoro vocês!!!!!!!!!!!!!!
- ✓ Ao Dr. Leonardo Tachibana, muito obrigada por me aguentar muitas vezes de mal humor e principalmente por não deixar que eu desistisse nas MUITAS vezes que pensei em fazer isso, acho que tudo isso fortaleceu nossa amizade...valeu mesmo.
- ✓ A MSc. Camila Fernandes Corrêa obrigada por toda a ajuda com as artêmias, sua experiência com larvas foi fundamental. Sei que tenho uma amiga que me diverte bastante.
- ✓ Ao Dr. Antônio Fernando Leonardo obrigado pela ajuda na reprodução e larvicultura.
- ✓ Ao Edilberto, Benedito e Lauzio nossos braços direito e esquerdo, pois sem a boa vontade deles as coisas seriam bem mais difíceis e não teríamos musica nas festas se não fosse o "Dil".
- ✓ A MSc. Marina Delbon e Nicole Pistele que passaram noites em claro comigo durante o experimento de larvicultura....é meninas quantas noites sem dormir direito. Valeu mesmo a ajuda de vocês.
- ✓ As minhas irmãs e irmãos científicas que colaboraram nas coletas, Solange, Jakeline, Patrícia Teixeira, Marina Delbon, Robson Seriani e a irmã mais nova Marina Keiko e o cunhado científico Ivan.
- ✓ Aos estagiários Fernanda Donoso e Fernando Wehby pela ajuda nas coletas iniciais.

- ✓ A querida amiga MSc. Isabella Bordon por toda ajuda nas análises estatísticas e pela amizade.
- ✓ Aos amigos do Vale do Ribeira, meu querido Erval, Elizete, Iolanda, Dr. Saes, Dr. Mauro, Nomura, Cleusa, Zoé, Batista, Vitor, Eduardo e Barba pela convivência e momentos de descontração durante todos os anos que estive lá.
- ✓ Ao querido João Batista nosso motorista exclusivo que sempre está a disposição para nos ajudar.
- ✓ Mais uma vez sou imensamente grata ao agora Dr. Antenor Aguiar Santos por mais esse desafio com a fagocitose.
- ✓ Ao Dr. Carlos M. Ishikawa pelas tentativas de microbiologia.
- ✓ À banca examinadora da qualificação e defesa, Dr^a. Margarida Barros, Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, Dr. Fernando Corleto Maiorino, Dr. Eduardo Makoto Onaka e Dr. Sérgio Henrique Canello Schalch pelas sugestões que melhoraram muito estes trabalhos.
- ✓ Ao amigo Dr. Marcio Hipólito pelas correções da tese.
- ✓ Á UNIQUIMICA Ltda em nome de Carina Nishio pela doação do probiótico e todas as análises de ração do experimento;
- ✓ A minha querida amiga Dra. Cláudia Maris Ferreira pela ajuda nas análises de cortisol e pelo desafio em fazer a padronização da metodologia. Mais uma vez conseguimos....Valeu!!!!!!!!!!
- ✓ Aos pesquisadores do Instituto de Pesca, Dr. Júlio Vicente Lombardi, Dr. Hélcio Luiz de Almeida Marques, Dr. Nilton Rojas, Dra Nelza Takahashi, Dra. Cacilda Thaiz Mercante, Dra. Cinthia Badaró Pedroso, MSc. Elaine Fender, MSc. Patrícia Paiva, Dr. Eduardo Ferraz, Dr. Paula Genova, MSc. Lydia Sumily com quem pude aprender muitas coisas durante todos estes anos de convivência.

- ✓ Ao Instituto de Pesca pela parceria neste projeto.
- ✓ Aos professores e funcionários do CAUNESP, por toda a paciência em nos transmitir um pouco dos seus conhecimentos;
- ✓ À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo (Proc. 2007/50178-0) e auxílio do projeto (2008/05823-7)
- ✓ Ao CNPq por parte do auxílio projeto Proc. Nº 470476/2008-7
- ✓ A Veralice Capatto nosso anjo da guarda na secretaria da pós pela amizade e toda ajuda.
- ✓ Aos meus pais Carlos e Marli, meu irmão Igor e meu namorado Fabio que são sem dúvida nenhuma, minha fortaleza, meu porto seguro e meus maiores incentivadores. Eu amo vocês!!!!!!
- ✓ Aos meus grandes amigos Walkiria e Tado, pelos longos anos de amizade e pelas maravilhosas viagens para Long Beach durante o estresse da pós.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Revisão de literatura.....	3
1.1.1 – Probiótico.....	3
1.1.2 – Efeitos biológicos.....	5
1.1.3 – Seleção de bactérias.....	5
1.1.4 – Imunidade.....	6
1.2 – Características hematológicas.....	8
1.2.1 – Cortisol e Glicose.....	12
1.3 – Tanque-rede.....	13
Referências.....	14
2 – OBJETIVOS.....	22
3 – CAPITULO 1.....	24
Tempo de migração dos macrófagos em matrinxãs, <i>Brycon amazonicus</i> por meio da técnica de inoculação de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
Resumo.....	25
Abstract.....	26
Introdução.....	27
Material e Métodos.....	28
Resultados e Discussão.....	30
Referências.....	36
4 – CAPÍTULO 2.....	38
Probiótico na dieta de reprodutores de matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i>	39
Resumo.....	39
Abstract.....	40
Introdução.....	41
Material e Métodos.....	42
Resultados e Discussão.....	45
Referências.....	58
5 – CAPÍTULO 3.....	63
Probiótico bioencapsulado em <i>Artemia salina</i> na dieta de larvas de matrinxã <i>Brycon amazonicus</i>	64
Resumo.....	64

Abstract.....	64
Introdução.....	65
Material e Métodos.....	66
Resultados e Discussão.....	69
Referências.....	73
6 – CAPÍTULO 4.....	75
Probiótico bioencapsulado em <i>Artemia salina</i> na dieta de larvas de matrinxã <i>Brycon amazonicus</i>	76
Resumo.....	76
Abstract.....	77
Introdução.....	78
Material e Métodos.....	80
Resultados e Discussão.....	82
Referências.....	89
7 – CAPÍTULO 5.....	93
Aspectos hematológicos e atividade fagocítica do matrinxã <i>Brycon amazonicus</i> alimentados com ração suplementada com probiótico.....	94
Resumo.....	94
Abstract.....	95
Introdução.....	95
Material e Métodos.....	98
Resultados e Discussão.....	99
Referências.....	107
8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	111

RESUMO

O objetivo deste projeto foi avaliar a influência do probiótico composto de *Bacillus subtilis* no desenvolvimento produtivo, hematologia e migração de macrófagos de matrinxã, *Brycon amazonicus*, nas fases de desenvolvimento (reprodução, larva e engorda). O experimento foi dividido em três etapas: **1) Reprodução:** dois grupos de matrizes foram alimentadas durante oito meses, constituindo o T₁ (controle - sem adição de probiótico) e T₂ (10 g de probiótico.kg⁻¹ de ração). No período reprodutivo, 10 fêmeas e 10 machos de cada tratamento foram selecionados para reprodução induzida. Para as análises hematológicas, utilizaram-se 20 peixes, que foram anestesiados e retiradas alíquotas de sangue por punção do vaso caudal. Outros 10 matrinxãs foram utilizados para a avaliação da atividade fagocítica dos macrófagos e também para as análises de lipídios. Os resultados mostraram que as matrizes que receberam a dieta suplementada com probiótico apresentaram aumento do número de ovócitos e, conseqüentemente, nas taxas de fertilização e eclosão das larvas e significativo aumento da atividade fagocítica dos macrófagos, indicando melhora no sistema imune dos reprodutores. Os parâmetros hematológicos sofreram alterações quando comparados com o momento zero e os valores de cortisol e glicose foram mais elevados em fêmeas. Os valores de lipídios totais em músculo e fígado foram inferiores nos peixes que receberam alimentação suplementada com probiótico; **2) Larvicultura:** esta fase foi constituída de seis tratamentos, T₁ - controle (sem adição de probiótico), T₂ - 2,5 g de probiótico, T₃ - 5,0 g de probiótico, T₄ - 7,5 g de probiótico, T₅ - 10,0 g de probiótico e T₆ - 12,5 g de probiótico. As doses utilizadas foram adicionadas por litro de cultivo de *Artemia salina*, que serviram como bioencapsuladores do probiótico, 4h antes da alimentação das larvas. Após o período de sete dias, as larvas começaram a se alimentar de ração comercial farelada (40%PB) e o probiótico foi adicionado nas mesmas doses na ração. Os resultados mostram heterogeneidade em relação ao crescimento entre os tratamentos, aumentando o canibalismo, indicando que na fase larval a utilização de probiótico não influenciou o desempenho e crescimento dos peixes;

3) Engorda: O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 tratamentos (controle, 5 e 10 g kg⁻¹) com quatro réplicas simultâneas. Foram calculados o ganho em peso (GP), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), biomassa final (BF) e também analisados o extrato etéreo (EE) do fígado e músculo e a composição centesimal do peixe inteiro. Os resultados mostraram que os animais do controle (T1) apresentaram, a partir da 2ª biometria, médias de peso inferiores o que foi mantido até o final do experimento. Os peixes dos tratamentos que receberam o probiótico apresentaram-se 7,17 e 9,77% maior no peso final em relação ao tratamento controle, respectivamente para 5 e 10g de probiótico kg⁻¹ de ração. O EE do músculo dos peixes alimentados com probiótico apresentou ligeira diminuição aos 42 dias de alimentação, quando comparado com o controle. Aos 84 dias de experimento, o tratamento de 5g de probiótico mostrou aumento na porcentagem de EE e nos peixes do tratamento de 10g diminuição nos valores. O probiótico *Bacillus subtilis* suplementado na dieta de matrinxã promove aumento no ganho de peso e conseqüentemente na TCE e melhora na CAA. A dose de 10g de probiótico por quilo de ração reduz a deposição de lipídios no músculo. Os resultados mostraram que o probiótico alterou os parâmetros hematológicos, o cortisol e glicose e melhorou a atividade fagocítica dos macrófagos.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate the influence of the probiotic *Bacillus subtilis* in the growth performance, hematology and macrophage migration of matrinxã, *Brycon amazonicus* at different stages (breeding, larval and growth). The experiment was presented in three stages: **1) Reproduction:** two groups of breeders were fed during 8 months: T1 (control – without probiotic) and T2 (10 g probiotic kg⁻¹ ration). During the reproductive period, 20 animals (10 females and 10 males) from each treatment, were selected and induced for breeding whit crude carp pituitary extract. For hematological

analysis, 20 fish were used, anesthetized and aliquots of blood was withdrawn by caudal vessel puncture. Another 10 fish were used to evaluate the phagocytic activity of macrophages and for lipid analysis. The results showed that the breeders, who received the supplemented diet, showed a slight increase in the number of oocytes and, consequently, the fertilization and hatching rates of larvae, a significant increase in macrophage phagocytic activity, indicating an improvement in the immune system of the breeding. Hematological parameters unchanged when compared with the zero time and the values of cortisol and glucose were higher in females. The values of total lipids in muscle and liver were lower in fish fed with probiotic supplementation, **2) Hatchery:** this phase consisted of 6 treatments, T1 - control (without probiotic), T2 - 2.5 g of probiotic T3 - 5.0 g of probiotic, T4 - 7.5 g of probiotic, T5 - 10.0 g of probiotic and T6 - 12.5 g of probiotic. The doses used were added per liter of *Artemia salina* culture, used as bioencapsulated probiotic, 4 h before the larvae feeding. After seven days, the larvae began to be fed on commercial feed (40% CP) and the probiotic was added at the same doses in the diet. The results showed heterogeneity in growth, increasing cannibalism, indicating that this process in the larval stage did not influence the performance and growth of fish, **3) Growth:** 2 doses were used. The experimental design was completely randomized with three treatments (control, 5 and 10 g kg⁻¹) with four simultaneously replicates. Weight gain (WG), feed conversion ratio (FCR), specific growth rate (SGR), final biomass (FB) were calculated and were analyzed ether extract (EE) of the liver, muscle and composition of whole fish. The results showed that animals from the control group (T1) showed, from the 2nd biometrics, below the average weight that was maintained until the end of the experiment. The fish in treatments that received the probiotic had to 7.17 and 9.77% higher final weight compared to control treatment, respectively for 5 and 10 g kg⁻¹. EE muscles of fish fed probiotic showed slight decrease in their percentage to 42 days of feeding, compared with the control. At 84 days of experiment compared with the control

treatment of 5g of probiotic it could be observed an increase in the percentage of EE and a decrease for 10g. The probiotic *Bacillus subtilis* in supplemented diet promotes an increase in weight gain and hence improves the SGR and the CAA. A 10g dose of probiotic per kg of diet reduces lipid deposition in muscle in matrinxã. The results showed that probiotics alter the hematological parameters, cortisol and glucose and improved the phagocytic activity of macrophages.

1- INTRODUÇÃO



A aquicultura, em franco desenvolvimento, vem se impondo como atividade pecuária, embora ainda seja considerada por muitos como apêndice do setor pesqueiro (Scorvo Filho, 2006). A piscicultura vem contribuindo cada vez mais na oferta de proteína para consumo humano. Dentre as inúmeras espécies de peixes nativos tropicais, o matrinxã vem destacando-se por apresentar perfil adequado para criação em cativeiro (Zaniboni-Filho e Barbosa, 1996).

O gênero *Brycon*, pertencente à família Characidae, é considerado um dos mais numerosos gêneros de caraciformes neotropicais, contando mais de 60 espécies nominais, das quais, aproximadamente 40 distribuem-se pela América Central e do Sul (Howes, 1982).

O matrinxã, *Brycon amazonicus* é uma espécie de peixe nativa da bacia amazônica que tem despertado interesse entre pesquisadores e piscicultores do Brasil (Izel *et al.*, 2004). Esta espécie possui dentição forte, carne saborosa, podendo atingir até 50 cm de comprimento. Geralmente apresentam coloração olivácea-dourada e as nadadeiras caudal e anal avermelhadas (Romagosa *et al.*, 2001).

A importância do *B. amazonicus* para a Amazônia Ocidental relaciona-se, principalmente, com o volume de desembarque e comercialização no mercado consumidor de Manaus (Merona e Bittencourt, 1988). Outro ponto de destaque está relacionado à facilidade de criação em ambientes artificiais, pois possuem hábito alimentar onívoro, alimentando-se na natureza de frutos, sementes, flores, restos vegetais, plantas herbáceas, insetos, restos de peixes, entre outros. (Pizango-Paima, 2001) e, em cativeiro, aceita rações extrusadas e peletizadas, bem como, subprodutos agroindustriais (Izel *et al.*, 2004).

Reimer (1982) constatou que o matrinxã apresenta capacidade de adaptar seu metabolismo ao tipo de nutriente presente nas dietas, aumentando a atividade das enzimas digestivas em função do substrato de alimento ofertado (proteína, carboidrato ou gordura).

Devido a esta característica, o matrinxã pode aproveitar eficientemente esses nutrientes como fonte de energia para realizar suas funções biológicas.

Determinados tipos de alimentos têm efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro tal como os alimentos denominados funcionais e seus componentes responsáveis por esse efeito. São considerados alimentos funcionais aqueles que fornecem a nutrição básica e a melhora da saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, devendo ser salientado, que esses efeitos restringem-se à melhora da saúde e não à cura de doenças (Sanders, 1998). Entretanto, o uso desses alimentos na nutrição animal tornou-se intenso apenas nos últimos anos (Oliveira *et al.*, 2002)

A produção de alimentos de origem animal, com o propósito de baixar os custos para o consumidor, tem levado os pesquisadores a estudarem diversos tipos e/ou melhores combinações de nutrientes conhecidos e de novas substâncias químicas, com o objetivo de aumentar a eficiência alimentar e a taxa de crescimento, um exemplo disso são os probióticos (Castro, 2003).

1.1 Revisão de Literatura

1.1.1 - Probiótico

Para Fuller (1989) o conceito de probiótico são suplementos alimentares compostos de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro por meio do equilíbrio da microbiota intestinal. Schrezenmeir e De Vrese (2001) consideraram que o termo probiótico deveria ser usado para designar preparações ou produtos que contêm microrganismos viáveis definidos e em quantidade adequada que alteram, por colonização, a microbiota própria das mucosas do sistema do hospedeiro, produzindo efeitos benéficos em sua saúde.

Os probióticos, em sua maioria são produtos preparados com *Lactobaccillus acidophillus*, *Streptococcus faecium*, *Bacillus subtilis* e em alguns casos leveduras (Guzmán,

1992). Verschuere *et al.* (2000) propôs a definição de que probióticos são: organismos vivos adjuntos que tem efeito benéfico sobre o hospedeiros, pela modificação do hospedeiro associado ou comunidade microbiana do ambiente, assegurando o aumento do uso alimentar ou valor nutricional, aumentando a resposta do hospedeiro sobre a doença, ou pelo aumento da qualidade do ambiente prevenindo também a interação do animal com o seu ambiente e ampliando a aplicabilidade do conceito na aquicultura. Para elaborar a definição de probióticos para organismos aquáticos esses autores necessitaram incluir os benefícios causados pelos organismos que interagem com o ambiente.

O mecanismo de ação dos probióticos ocorre pela exclusão competitiva (Ozawa *et al.*, 1978), competição por locais de adesão no aparelho digestivo (Watkins e Miller, 1983), estímulo da imunidade (Inooka *et al.*, 1986), por maior produção de ácido láctico (Fuller, 1977), diminuição da produção de aminas tóxicas, aumento da disponibilidade de aminoácidos nos locais de absorção (Kozasa, 1989), economia de energia e aumento da disponibilidade de vitaminas e enzimas (Fuller, 1989). A ação benéfica do uso de probióticos ocorre de duas formas: (1) na determinação de melhores índices zootécnicos atingindo maior produtividade, aumento no ganho de peso e melhor conversão alimentar; (2) redução da colonização intestinal por alguns patógenos, como por exemplo, as salmonelas (Castro, 2003).

O uso de probiótico na aquicultura é tema recente, mas tem-se observado resultados promissores, principalmente no cultivo de larvas de peixes e moluscos (Planas e Cunha, 1999).

1.1.2 – Efeitos Biológicos

Os mecanismos de ação dos probióticos, segundo Fuller (1989) podem ser três: (1) supressão do número de células bacterianas viáveis mediante produção de compostos com atividades antimicrobiana, competição por nutrientes e a competição por sítios de

adesão; (2) alteração do metabolismo microbiano pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática; (3) o estímulo da imunidade do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. As bactérias probióticas só apresentam efeitos biológicos no ambiente intestinal se atingirem número mínimo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Por exemplo, em humanos, o número de *Lactobacillus rhamnosus* para reduzir significativamente a ocorrência da chamada diarreia dos viajantes é de 10^9 UFC/g (Oksanen *et al.*, 1990).

1.1.3 – Seleção de Bactérias

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios: o gênero ao qual pertence a bactéria, estabilidade frente ao ácido gástrico e à bile, capacidade de aderir à mucosa intestinal, capacidade de colonizar ao menos temporariamente o trato gastrointestinal e capacidade de produzir compostos antimicrobianos a ser metabolicamente ativo no intestino (Collins *et al.*, 1998 e Saarela *et al.*, 2000).

Entre os microrganismos empregados como probióticos, destacam-se as bactérias pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. lactis*, *B. longum* e *B. thermophilum*) e *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius*) e, em menor escala, as bactérias *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus* (Collins *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 1999, Sanders e Klaenhammer, 2001).

Klein *et al.* (1998) relataram que o gênero *Bifidobacterium* também é considerado como bactérias lácticas devido a propriedades bioquímicas e fisiológicas no trato gastrointestinal, em comum com os outros gêneros de bactérias lácticas. Dentre esses microrganismos, as bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são frequentemente consideradas seguras (não oportunistas) ou reconhecidamente seguras. Por outro lado,

bactérias do gênero *Streptococcus* e *Enterococcus* são patógenos oportunistas (Collins *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 1999).

1.1.4 –Imunidade

O efeito de probióticos sobre a imunidade tem induzido pesquisas, sendo a maioria realizada em mamíferos (Coppola e Gil-Turnes, 2004), apesar de ainda não estar esclarecido seu modo de ação (Cross, 2002). Este efeito pode estar relacionado à capacidade dos microrganismos do probiótico interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando linfócitos B produtores de IgA e a migração de linfócitos T do intestino (Perdigón e Holgado, 2000). Também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares sugerindo ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (Cross, 2002). Maassen *et al.* (2000) comprovaram, no entanto, que a síntese de citocinas pela mucosa intestinal depende da cepa de *Lactobacillus* utilizada, salientando a necessidade de realizar cuidadosa seleção das cepas candidatas a probiótico. *Lactobacillus casei* apresentou efeito imunomodulador similar ao de *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), *Corynebacterium parvum* e *Streptococcus pyogenes* (Perdigón e Alvarez, 1992).

Segundo Copolla e Gil-Turnes (2004), os probióticos, além de sua atividade como promotores de crescimento e reguladores de microbiota das mucosas, tem efeito imunomodulador. Segundo os autores, as evidências acumuladas sobre os benefícios decorrentes do uso dos probióticos justificam o aprofundamento destes estudos sobre seu modo de ação, a fim de otimizar sua utilização como profiláticos, promotores de crescimento e imunoestimulante.

Em camundongos, o *Lactobacillus casei* induziu resposta celular tipo 1 aumentando a produção *in vitro* de células peritoniais e de células esplênicas (Neuman, 2000). Sua

administração imunizou camundongos contra patógenos intestinais pela indução do aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos peritoniais e da atividade das enzimas envolvidas na fagocitose (Kato *et al.*, 1983, Perdígón e Alvarez, 1992), da atividade das células *natural killer* (Kato *et al.*, 1984), da produção de fator citotóxico pelas células de Kupfer e macrófagos peritoniais (Hashimoto, 1985) e da secreção de IgA no lúmen intestinal (Perdígón *et al.*, 1991). A cepa Shirota estimulou a resposta imune celular, provocando redução nos títulos de vírus da Influenza no trato respiratório quando administrada por via nasal (Hori *et al.*, 2001) e oral (Hori *et al.*, 2002). *L. rhamnosus* reduziu à morbidade de *Escherichia coli* em camundongos infectados experimentalmente, estimulando o aumento da atividade fagocítica e dos títulos de anticorpos específicos do tipo IgA (Shu e Gill, 2002).

Em organismos aquáticos há interesse especial em aumentar a resistência às doenças e incrementar a atividade fagocítica de células de defesa. Esse aumento da atividade fagocítica é realizado por meio de antígenos bacterianos que induzem a liberação de patógenos mortos ou de seus produtos como descrito por Roitt *et al.* (1998) e pela aplicação de imunoestimuladores e adjuvantes. Esses imunoestimulantes aumentam a mobilização enzimática de neutrófilos (Siwicki *et al.*, 1998), que possuem grandes quantidades de peroxidase (Ellis, 1997), enzima lisossômica presente nas células fagocíticas e que promove a oxidação de certos compostos pelo peróxido de hidrogênio, no processo de fagocitose (Oliveira *et al.*, 1997).

Além dos efeitos na imunidade os probióticos podem atuar diminuindo a absorção de lipídios pelo organismo fazendo com que ocorra a menor deposição de gordura nos tecidos (Roos e Katian, 2000).

1.2 – Características Hematológicas

Hematologia é o estudo do sangue ou a soma dos conhecimentos sobre o sangue e, grande parte das informações, consiste em medidas de valores de parâmetros em condições orgânicas normais e ou anormais. Sua aplicação em pesquisa animal é bem aceita e considerada como procedimento de rotina em métodos de diagnósticos (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

Os parâmetros relativos à série vermelha permitem identificar os processos anemiantes, enquanto o leucograma pode ser empregado no diagnóstico dos processos infecciosos e outros estados de desequilíbrio homeostático (Mahoney e McNulty, 1992). A contagem diferencial de leucócitos é o método que permite ao pesquisador conhecer a porcentagem dos tipos de células existentes no sangue (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

O plasma, líquido amarelo, semitransparente é formado por cerca de 90% de água e 10% de substâncias sólidas, entre as quais encontram-se proteínas, sais minerais, glicose, uréia, aminoácidos, colesterol, gorduras, gases respiratórios (oxigênio e gás carbônico), hormônios, enzimas, anticorpos, etc (Junqueira e Carneiro, 2004).

Schmidt-Nielsen (1996) ressaltou que, nos mamíferos, os glóbulos vermelhos são anucleados, têm forma de disco esférico e são ligeiramente bicôncavos; nas aves, répteis, anfíbios e peixes, são nucleados e se apresentam quase que universalmente ovais. Os eritrócitos são células mais numerosas no sangue. Nos peixes são geralmente elípticas com núcleo central, variando de tamanho entre as espécies. O citoplasma dessas células são homogêneos e carrega em seu interior a hemoglobina cuja função consiste no transporte do oxigênio e do gás carbônico (Tavares-Dias e Moraes, 2004).

Os glóbulos brancos ou leucócitos apresentam-se de dois tipos: (1) agranulócitos, sem granulações visíveis no citoplasma, denominados linfócitos e monócitos; (2) granulócitos, que se classificam em neutrófilos, basófilos e eosinófilos, cujos citoplasmas apresentam granulações visíveis com diferentes afinidades pelos corantes de Romanowsky (Storer e

Ussinger, 1979). A principal função dos glóbulos brancos é a defesa do organismo contra a ação de bactérias ou corpos estranhos que penetram nos tecidos (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os linfócitos produzem anticorpos por modularem-se em plasmócitos e estão relacionados ao processo de rejeição e participam do processo inflamatório (Finn e Nielson, 1971, MacArthur *et al.*, 1984, Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

Os monócitos podem ser descritos como células com núcleo geralmente excêntrico, ocupando quase a totalidade da célula, com citoplasma levemente vacuolizado e basofílico. São considerados verdadeiras células em trânsito no sangue periférico (Lorenzi, 1999). Sob condições apropriadas, estas células deixam o sistema vascular e completam sua maturação, tornando-se macrófagos maduros, nos tecidos (Boomker, 1981, Fulop e McMillan, 1984, Matushima e Mariano, 1996, Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004). Segundo Thuvander *et al.* (1987), Dogget *et al.* (1987), os monócitos são células parcialmente diferenciadas, apresentam moderada propriedade fagocítica. Sumarizando, o critério para definir monócito e macrófago é a ávida fagocitose e suas localizações teciduais. O termo monócito, de acordo com a definição de fagócito mononuclear de Van Furth *et al.* (1972) é considerado quando está circulando no sangue e macrófago é aplicado para células teciduais.

Os neutrófilos possuem frequentemente núcleo segmentado, com cromatina nuclear compacta sem evidências de nucléolos. São chamados de polimorfonucleares, devido à grande variação de formas de seu núcleo excêntrico, que pode apresentar-se em bastonete ou com várias segmentações. Estas células representam a primeira defesa contra os microrganismos, sendo células fagocíticas com importante papel na defesa contra infecções e possuem sistema de agentes microbicidas (Thuvander *et al.*, 1987). Estudos em peixes demonstraram a capacidade fagocítica dos neutrófilos sanguíneos ou teciduais ao englobar partículas antigênicas (Jorgensen *et al.*, 1993) e bactérias (Do Vale *et al.*, 2002).

Os basófilos são células menores que os neutrófilos, com forma arredondada e contorno regular. O núcleo acompanha o formato da célula, apresenta cromatina pouco

densa e não têm nucléolos (Tavares-Dias e Moraes, 2004). O citoplasma apresenta granulações grosseiras, basofílicas, que recobrem o núcleo na maioria das vezes (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004). Ultraestruturalmente, os basófilos apresentam citoplasma irregular, com grandes projeções citoplasmáticas, granulações esféricas, discreta formação de retículo endoplasmático granular e elevada quantidade de mitocôndrias e ribossomos livres (López-Ruiz *et al.*, 1992). Embora exerçam função fagocítica não o fazem com a mesma avidéz dos neutrófilos. Nos mamíferos, são células derivadas da medula óssea e participam de processos alérgicos e resposta imunológica (Lorenzi, 1999). Em peixes são raros e Ranzani-Paiva e Silva-Souza (2004) sugerem que tal granulócito é mais frequente em portadores de parasitoses, enquanto que Roberts (1981) relaciona os mesmos a processos alérgicos, por possuírem histamina em seus grânulos.

Os eosinófilos apresentam núcleo segmentado, grânulos ovalados ou esféricos, fracamente acidófilos no citoplasma. São células menos frequentes que os neutrófilos. O núcleo tende a ser pouco lobulado e apresenta-se basofílico, com cromatina densa (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004). Suas principais funções são fagocitar e destruir complexos de antígenos com anticorpos, limitar e circunscrever o processo inflamatório, sendo as últimas a surgir durante o processo inflamatório (Suzuki, 1986).

Em contraste com as plaquetas de mamíferos que são fragmentos de células anucleadas, os trombócitos de peixes são células completas, predominantemente elípticas, arredondadas ou fusiformes, com núcleo fusiforme. Ultraestruturalmente, os trombócitos apresentam formas variadas. Raramente observa-se complexo de Golgi definido mas sem vacuolização, o que o difere dos linfócitos (Matushima e Mariano, 1996). A função e a ocorrência de trombócitos ainda permanece controvertidas. Os trombócitos têm sido geralmente considerados como responsáveis pelo processo de coagulação do sangue (Gardner e Yevich, 1969, Casillas e Smith, 1977), desempenhando papel análogo às

plaquetas. Segundo Tavares-Dias et al. (2007) os trombócitos são capazes de realizar fagocitose podendo ser considerados como verdadeiros digestores de células em peixes, pela sua capacidade de remover restos celulares por fagocitose.

Atualmente, o método do microhematócrito (Goldenfarb *et al.*, 1971) é o mais utilizado em laboratórios clínicos de medicina humana, para medir o volume dos eritrócitos sedimentados. Este teste é de simples realização, utilizando-se apenas centrífuga de alta velocidade, tubos capilares e cartão de leitura. É também bastante utilizado em organismos aquáticos por requerer pequenas quantidades de sangue e ser de fácil realização em campo. O princípio deste método é compactar os eritrócitos na parte inferior do tubo e o volume por eles ocupado em relação ao sangue total.

A determinação da taxa de hemoglobina é um dos meios mais simples e usuais como indicador de anemias. O método empregado para organismos aquáticos é o cianometahemoglobina. Este método consiste em adicionar sangue em uma solução contendo ferricianeto de potássio e cianeto de potássio (Collier, 1944).

Outra análise realizada em hematologia é a contagem de eritrócitos. Sendo utilizado o método de contagem visual na câmara hematimétrica de Neubauer (Ranzani-Paiva e Souza-Silva, 2004).

Em hematologia são utilizados dois índices hematimétricos calculados a partir do número de eritrócitos por mm^3 de sangue, da taxa de hemoglobina e da relação glóbulo-plasmático (hematócrito). São eles: Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Esses índices são utilizados na caracterização morfológica do sangue dos animais e também para detectar anemias (Wintrobe, 1934).

O VCM, que expressa o volume médio dos eritrócitos em femtolitro (fL, anteriormente usado μ^3), é maior em peixes, anfíbios, répteis e aves quando comparados aos mamíferos, devido à presença de núcleo nas células desses animais (Ranzani-Paiva e Silva-Souza,

2004). CHCM indica o valor médio da porcentagem em peso da hemoglobina por eritrócito e varia pouco entre as espécies.

1.2.1- Cortisol e Glicose

As reações fisiológicas dos peixes são usualmente divididas em primárias e secundárias e são utilizadas como indicadores de estresse (Oba, et al. 2009). O cortisol plasmático é o indicador de estresse mais utilizado em peixes, qualquer que seja o seu estágio de desenvolvimento (Weendelaar Bonga, 1997) sendo essa a resposta primária. A resposta secundária ocorre quando há elevação da glicemia.

Trabalhos mostram que a magnitude do nível de corticosteróides em resposta ao estresse pode ser variável entre peixes, mesmo dentro da mesma espécie. Assim, em uma dada população, tanto pode haver peixes que respondem com um nível consideravelmente alto de cortisol, como peixes que respondem mais discretamente, ambos apresentando desempenho similar (Pottinger *et al.*, 1992, Weil *et al.*, 2001).

1.3 – Tanque-rede

O sistema intensivo de criação em tanque-rede tem crescido nos últimos 20 anos, pois representa excelente alternativa para o aproveitamento de corpos d'água inexplorados pela piscicultura convencional (Colt e Montgomery, 1991) e de ambientes aquáticos existentes, dispensando o desmatamento de grandes áreas, o que se evita problemas de erosão e assoreamento (Cardoso e Ferreira, 2005). Atualmente, está em rápida evolução, como resposta às pressões da globalização e da crescente demanda por produtos aquáticos (Tacon e Halwart, 2007). Também contribui para tal crescimento o fácil manejo e rápido retorno do investimento (Christensen, 1989). A produção em sistemas intensivos envolve aporte tecnológico, maior número de peixes adensados,

elevada taxa de renovação de água, promovendo a remoção dos metabólitos e dejetos produzidos pelos peixes (Halwart et al., 2007).

Das espécies neotropicais com potencial para criação em tanques-rede, as do gênero *Brycon* vêm merecendo especial atenção (Borghetti et al., 1991, Carvalho et al., 1997, Brandão et al., 2005). Por sua ampla distribuição em diferentes bacias hidrográficas, é possível a criação de espécies nativas do gênero *Brycon* evitando a introdução de peixes de outras bacias (Zaniboni Filho et al., 2006). Peixes desse gênero apresentam ainda rápido crescimento, aceitação do mercado consumidor e esportividade (Zaniboni Filho et al., 2006).

Referências

- Boomker, J. 1981 The haemocytology and histology of the haemopoietic organs of south Africa freshwater fish. III. The leucocytes, plasma cells and macrophages of *Clarias gariepinus* and *Sarotherodon mossambicus*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 48 (4): 185-193.
- Borghetti, J.R., Canzi, C., Nogueira, S.V.G. 1991 A influência da proteína no crescimento do matrinchã (*Brycon orbignyanus*) criado em tanque-rede. *Revista Brasileira de Biologia*, 51 (3): 695-699.
- Brandão, F.R., Gomes, L.C., Chagas, E.C., Araujo, L.D., Silva, A.L.F. 2005 Densidade de estocagem de matrinxã (*Brycon amazonicus*) na recria em tanque-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40 (3): 299-303.
- Cardoso, E.L., Ferreira, R.M.A. 2005 *Cultivo de peixes em tanques-rede: desafios e oportunidades para um desenvolvimento sustentável*. Belo Horizonte: EPAMIG. 104 p.
- Carvalho, R.A.P.L.F., Ferraz de Lima, J.A., Silva, A.L.N. 1997 Efeito da densidade de estocagem no desempenho do matrinchã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) cultivado em tanques-rede no período do inverno. *Boletim do Instituto de Pesca*, 24 (esp.): 177-185.
- Casillas, E., Smith. L.S. 1977 Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Fish Biology*, London, 10 (5): 481-491.

- Castro, J.C. 2003 Uso de aditivos e probióticos em rações animais. In: Ferreira, C.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Teixeira, P.C., França, F.M., Dias, D.C. I Simpósio Brasileiro de Ranicultura e II Ciclo de Palestra sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 34: 12-18.
- Christensen, M.S. 1989 The intensive cultivation of freshwater fish in cages in tropical and subtropical regions. *Animal Research and Development*, 29: 7-10.
- Collier, H.B. 1944 The standardizations of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, Ottawa, 50: 550-552.
- Collins, J.K., Thornton, G., Sullivan, G.O. 1998 Selection of probiotics strains for human applications *International Dairy Journal of Amsterdam*, Amsterdam, 8: 487-490.
- Colt, J., Montgomery, J.M. 1991 Aquaculture production systems. *Journal of Animal Science*, 69: 4183- 4192.
- Coppola, M.M., Gil-Turnes, C. 2004 Efeito de probiótico na resposta imune *Ciência Rural*, Santa Maria, 34 (4): 1297-1303.
- Cross, M.L. 2002 Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Amsterdam, 34 (4): 245-253.
- Do Vale, A., Afonso, A., Silva, M.T. 2002 The Professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish Selfish Immunology*, Groton, 13 (3): 1-16.
- Doggett, T.A., Wrathmell, A.B., Harris, J.E. 1987 A cytochemical and light microscopial study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae. *Journal of Fish Biology*, London, 31(2): 147-153.
- Ellis, A.E. 1997 The leukocytes of fish: Review. *Journal of Fish Biology* London, 11: 453-491.
- Finn, J.P., Nielson, N.O. 1971 The inflammatory response of rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, London, 3: 463-478.
- Fuller, R. 1977 The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *British Poultry Science*, Abingdonv, 18: 85-94.
- Fuller, R. 1989 Probiotics in man and animals: A review. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, 66: 365-378.

- Fulop, G.M.I., McMillan, D.B. 1984 Phagocytosis in the spleen of the sunfish *Lepomis* spp. *Journal Morphology*, New York, 179: 175-195.
- Gardner, R.G., Yevich, P.P. 1969 Studies on the blood morphology of three estuarine cyprinodontiform fishes. *Journal of Fish Research*, Bangladesh, 26: 433-447.
- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosius, E. 1971 Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *American Journal of Clinical Pathology*, Hagerstawn, 56 (1): 35-39.
- Guzmán, G.A. 1992 Aplicación de probióticos en la acuicultura. In: Suárez, L. E.C., MARIE, D.R., ALFARO, R.M. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Universidade Autónoma de Nuevo León Monterrey, Noevo León, México, 332-337.
- Halwart, M., Soto, D., Arthur, J.R. (Eds.). 2007 Cage Aquaculture – Regional reviews and global overview – *FAO Fisheries Technical Paper* n.498, FAO, Roma, 241p.
- Hashimoto, S. 1985 Cytotoxic factor production by Kupfer cells elicited with *Lactobacillus casei* and *Corynebacterium parvum*. *Cancer Immunology Immunotherapy*, Heidelberg, 20 (2): 117-121.
- Hori, T., Kiyoshima, J., Shida, K., Yasui, H. 2001 Effect of intranasal administration of *Lactobacillus casei* Shirota on Influenza virus infection of upper respiratory tract in mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, New York, 8 (3): 593-597.
- Hori, T., Kiyoshima, J., Shida, K., Yasui, H. 2002 Augmentation of cellular immunity and reduction of Influenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, New York, 9 (1):105-108.
- Howes, G. 1982 Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei) *Bulletin British Museum (Natural History)*, 43 (1): 1-47.
- Inooka, S., Uehara, S., Kimura, M. 1986 The effect of *Bacillus natto* on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens. *Poultry Science*, Champaign, 65: 1217-1219.
- Izel, A.C.U., Pereira-Filho, M., Melo, L.A.S., Macêdo, J.L.V. 2004 Avaliação de níveis protéicos para a nutrição de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). *Acta Amazonica*, 34 (2): 179-184.

- Jorgensen, J.B., Lunde, H., Robertsen, B. 1993 Pheritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal Fish Disease*, 16:313-325.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 2004, 433p.
- Kato, I., Yokokura, T., Mutai, M. 1983 Macrophage activation by *Lactobacillus casei* in mice. *Microbiology Immunology*, 27(7): 611-618.
- Kato, I., Yokokura, T., Mutai, M. 1984 Argumentation of mouse *natural killer* cell activity by *Lactobacillus casei* and its surface antigens. *Microbiology Immunology*, 28 (2): 209-217.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. 1998 Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 41: 103-125.
- Kozasa, M. 1989 Probiotics for animal use in Japan. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 8 (2): 517-531.
- Lee, Y. K., Nomoto, K., Salminen, S., Gorbach, S. L. 1999 *Handbook of probiotics*. New York: Wiley, 211p.
- López-Ruiz, A., Angeles-Esteban, M., Meseguer, J. 1992 Blood cells of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): light and electron microscopic studies. *The Anatomical Record*, New York, 234: 161-171.
- Lorenzi, T.F. 1999 *Manual de hematologia propedêutica e clínica*. São Paulo, MDSI, 641p.
- Maassen, C.B.M., Holten-Neelen C., Balk, F., Bak-Glashouwer, M.J., Leer, R.J., Laman, J.D., Boersma, W.J., Claassen, E. 2000 Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine*, London, 18 (23): 2613-2623.
- MacArthur, J.I., Fletcher, T.C., Pirie, B.I.S., Davidson, R.J.L., Thomson, A.W. 1984 Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. *Journal of Fish Biology*, London, 25(1): 69-81.
- Mahoney, J.B., McNulty, J.K. 1992 Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan estuary. *Transactions of the American Fisheries Society*, Grosvenor Lane, 121: 261-268.

- Matushima, E.R., Mariano, M. 1996 Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Brazilian Journal of Veterinary Animal Science*, São Paulo, 33 (1): 5-10.
- Merona, B, Bittencourt, M.M. 1988. A pesca na Amazônia através dos desembarques no mercado de Manaus: resultados preliminares. *Memória Sociedad Ciencias Naturales La Salle*, 48 (2): 433-453.
- Neuman, E. 2000 *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20 induces type 1 responses by cells of gnotobiotic mice. In: The prospects of probiotics and therapy of diseases of young, 2000, High Tatras. Proceedings... High Tatras, Slovak Republic: Department of Gnotobiology and Diseases of Young-Research Institute of Veterinary Medicine, Kosice,. p. 85.
- Oba, E.T., Mariano, W.S., Santos, L.R.B. 2009 Estresse em peixes cultivados *In*:Tavares-Dias, M. *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*, EMBRAPA Amapá, Macapá, p. 226-246.
- Oksanen, P., Salminen, S., Saxelin, M., Hamalainen, P., Ihantola-Vormisto, A., Muurasniemi-Isoviita, L., Nikkara, S., Oksanen, T., Porsti, T., Salminen, E., Siitonen, S., Stuckey, H., Toppila, A., Vapaatalo, H. 1990 Prevention of traveler's diarrhea by *Lactobacillus* GG. *Annals of International Medicine*, 22: 53-56.
- Oliveira, L.W., Moura, W.L., Matushima, E.R., Egami, M.I. 1997 Detecção citoquímica da mieloperoxidase em eosinófilos e mononucleares azurófilos do sangue de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) Reptilia, Crocodilia. *In*: Reunião Anual da Sociedade Brasileira para Progresso da Ciência, 49, Belo Horizonte, MG. *Anais...*Belo Horizonte: SBPC, 1997. p.878.
- Oliveira, M.N., Sivieri, K., Alegro, J.H.A., Saad, S.M.I. 2002 Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, 38 (1): 1-21.
- Ozawa, K., Yabu-Uchi, K., Yamanak, K. 1978. Antagonistic effects of *Bacillus natto* and *Streptococcus faecalis* on growth of *Candida albicans*. *Microbiology Immunology*. 23 (12): 1147-1156.
- Perdigón, G., Alvarez, S. 1992 Probiotics and the immune state. In: Fuller, R. *Probiotics: the scientific basis*. London: Chapman & Hall, 145-180p.

- Perdigón, G., Alvarez, S., Holgado, A.P.R. 1991 Immuno-adjutant activity of oral *Lactobacillus casei*-influence of dose on the secretory immune-response and protective capacity in intestinal infections. *Journal of Dairy Research*, Cambridge, 58 (4): 485-496.
- Perdigón, G., Holgado, A.P.R. 2000 Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: Fuller, R., Perdigón, G. *Probiotics 3: Immunodulation by the Gut Microflora and Probiotics*. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000, 213-233p.
- Pizango-Paima, E.G. 2001 Composição corporal e alimentar do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) na Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 31 (3): 509-520.
- Planas, M., Cunha, I. 1999 Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, Amsterdam, 177: 171-190.
- Pottinger, T.G., Prunet P., Pickering A.D. 1992 The effects of confinement stress on circulating prolactin levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water. *Genetic Comparative Endocrinology*, 88: 454-460.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Silva-Souza, A. 2004 Hematologia de peixes Brasileiros In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M.A.P. *Sanidade de Organismos Aquáticos*, Varela, São Paulo, p. 89-120.
- Reimer. G. 1982 The influence of diet on the digestive enzyme of the Amazon fish matrinxã, *Brycon cf. melanopterum*. *Journal of Fish Biology*, 21: 637-642.
- Roberts, R.J. 1981 *Patologia de los peces*. Madrid: Mundi-Prensa, 366 p.
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. 1998 *Imunology*. 5ed. London: Mosby, 423 p.
- Romagosa, E., Narahara, M.Y., Borella, M.I., Fenerich-Verani, N. 2001 Seleção e caracterização de fêmeas de matrinxã, *Brycon cephalus*, induzidas a reprodução. *Boletim do Instituto de Pesca* 27 (2): 139–147.
- Roos, N.M., Katian, M.B. 2000 Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *American Society for Clinical Nutrition* 71: 405-411.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattili-Sandholm, T. 2000 Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal Biotechnology*, Amsterdam, 84: 197-215.
- Sanders, M.E. 1998 Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria *International Dairy Journal*, Amsterdam, 8: 341-347.

- Sanders, M.E., Klaenhammer, T.R. 2001 Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *Journal Dairy of Science*, Champaign, 84: 319-331.
- Schmidt-Nielsen, K. 1996 *Fisiologia animal, adaptação e meio ambiente*. 5ª ed., São Paulo, Livraria Santos. 600p.
- Schrezenmeir, J., De Vrese, M. 2001 Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, Baltimore, 73: 361–364.
- Scorvo Filho, J.D. 2006 Panorama da Aqüicultura Nacional. Disponível em http://www.pesca.sp.gov.br/arquivos/Panorama_aquicultura.doc. Acesso em 15/05/2006.
- Shu, Q., Gill, H.S. 2002 Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20ä) against *Escherichia coli* O157: H7 infection in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Amsterdam, v. 34, n. 1, p.59-64.
- Siwicki, A.K., Morand, M., Klein, P., Studnicka, M., Terech-Majewska, E. 1998 Modulation of non-specific defence mechanisms and protection against diseases in fish. *Acta Veterinaria*, 67:328.
- Storer, T.I., Usinger, R.L. *Zoologia Geral*. São Paulo Companhia Editora Nacional, 1979. 757p.
- Suzuki, K. 1986 Morphological and phagocytic characteristic of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas) and carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology*, London, 29 (3): 349-364.
- Tacon, A.G.J., Halwart, M. 2007 Cage aquaculture: a global overview. In Halwart, M. Soto, D., and Arthur, J.R. (Editors). *Cage aquaculture – Regional reviews and global overview*, pp. 1–16. FAO Fisheries Technical Paper. No. 498. Rome, FAO. 241p.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F. R. 2004 *Hematologia de Peixes Teleósteos*. Ribeirão Preto: M., Tavares-Dias, 144 p.
- Tavares-Dias, M., Ono, E.A., Pilarski, F.; Moraes, F. R. 2007 Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. *Journal Applied Ichthyology*, 1–4. doi: 10.1111/j.1439-0426.2007.00850.x

- Thuvander, A., Norrgren, L., Fossum, C. 1987 Phagocytic cells in blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by flow cytometry and electron microscopy. *Journal of Fish Biology*, London, 31: 197-208.
- Van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G., Langevoort, H.L. 1972 The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*, Geneva, 46 (6): 845-852.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000 Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4): 655-671.
- Watkins, B.A., Miller, B.F. 1983 Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. *Poultry Science*, 61: 1772-1779.
- Weil L., Barry T., Malison J. 2001 Fast growth in rainbow trout is correlated with a rapid decrease in post-stress cortisol concentrations. *Aquaculture*, 193: 373-380.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1997 The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77: 591-625.
- Wintrobe, M.M. 1934 Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, Leipzig, 51: 32-49.
- Zaniboni Filho, E., Barbosa, N.D.C. 1996 Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. *Revista Brasileira de Biologia*, 56(4), 655-659.
- Zaniboni Filho, E., Reynalte-Tataje, D., Weingartner, M. 2006 Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19 (2): 233-240.

2- Objetivos

Baseando-se no exposto o presente estudo teve como principal objetivo avaliar a influência do probiótico composto de *Bacillus subtilis* sobre o desenvolvimento produtivo, hematologia e migração de macrófagos de matrinxã, *Brycon amazonicus*, nas fases de desenvolvimento: reprodução, larval e engorda, bem como padronizar técnica para avaliação dos parâmetros imunológicos.

CAPITULO 1



Tempo de migração dos macrófagos em matrinxãs, *Brycon amazonicus* por meio da técnica de inoculação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

Resumo

Na aquicultura estão sendo utilizados testes de ativação e de incremento da migração de macrófagos, com intuito de verificar a capacidade imunológica inespecífica dos peixes frente ao desafio por meio do índice fagocítico e da capacidade fagocítica. O objetivo deste estudo foi determinar o tempo de migração dos macrófagos em matrinxã, *Brycon amazonicus* por meio da técnica de inoculação de leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e verificar as possíveis alterações dos parâmetros hematológicos. Foram utilizados 30 matrinxãs com peso médio de $101,55 \pm 24,50$ g e comprimento médio de $19,75 \pm 1,72$ cm. Os tempos de incubação utilizados foram 2, 4, 8 e 12 horas, sendo utilizados seis animais por tempo. Após estes períodos os exemplares foram anestesiados, e retirada alíquotas de sangue por punção do vaso caudal, para as determinações: número total de células, contagem diferencial e total dos leucócitos e contagem total de trombócitos, hematócrito, taxa de hemoglobina e índices hematimétricos VCM e CHCM. Os resultados mostram que a capacidade fagocítica não apresentou diferença significativa entre os tempos experimentais. Com relação ao índice fagocítico, o tempo de 2 horas apresentou maior valor do índice de células fagocitadas com diferenças significativas em relação aos outros tempos experimentais, indicando que este tempo (2 horas) de incubação foi suficiente para a migração dos macrófagos, para a espécie estudada. Houve diferença no número de eritrócitos entre os tempos. Entretanto, os demais parâmetros hematológicos não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Palavra-chave: fagocitose, inoculação, hematologia

Abstract

This study aimed to determine the time of macrophages migration in matrinxã, *Brycon amazonicus*, through the technique of yeast *Saccharomyces cerevisiae* inoculation, verifying possible changes in hematological parameters. Thirty animals with average weight of 101.55 ± 24.50 g and average length of 19.75 ± 1.72 cm were used. The experimental periods of incubation were 2, 4, 8 and 12 hour, with 6 animals per period. Thereafter, animals were anesthetized and blood samples were collected through a puncture of caudal vessel for total erythrocytes number, differential and total leukocyte counts and total of thrombocytes count, hematocrit, hemoglobin concentration and absolute erythrocytes index determination. The phagocytic capacity was not significantly different among experimental periods. Regarding phagocytic index, the period of 2 hours presented the highest rate of phagocytized cells, indicating that this incubation period was sufficient for the migration of macrophages, in *B. amazonicus*. There was significant difference for the number of erythrocyte among periods.

Key-word: Phagocytosis, Inoculation, hematology,

Introdução

Na aquicultura estão sendo utilizados testes de ativação e de incremento da migração de macrófagos, com intuito de verificar a capacidade imunológica inespecífica dos animais frente a um desafio. Isto permite avaliar a migração dos macrófagos até a cavidade celomática por meio da estimativa da capacidade e índice fagocítico dos macrófagos. Esta metodologia foi descrita por Silva *et al.* (2002, 2005) que verificaram a capacidade fagocítica e o índice fagocítico em peixes antárticos, sendo esta empregada para outros

organismos aquáticos como o robalo, *Centropomus parallelus* (Ranzani-Paiva *et al.*, 2008) e também para rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (Dias *et al.*, 2009). Essa técnica também permite avaliar se esse macrófago está ativo ou não, pela contagem das leveduras fagocitadas. Entretanto, para a realização desse estudo é necessário estabelecer o tempo de incubação das leveduras para a espécie estudada, pois este tempo pode variar entre as espécies de peixes.

Neste estudo da atividade fagocítica foi eleito o macrófago, células mais primitivas do sistema imune, surgindo no período embrionário dos vertebrados. Praticamente, nas reações imunes contra doenças e agressões os macrófagos de peixes atuam (Zelikoff *et al.*, 1991) envolvendo-se no processo de fagocitose e na destruição de patógenos, interligando o sistema imune inespecífico ao específico, sendo isolado do sangue (monócitos), órgão linfóide (rim) ou na cavidade peritoneal (Vallejo *et al.*, 1992; Shoemaker *et al.*, 1997). A principal característica dos macrófagos é a capacidade de ingerir material estranho ao organismo, inerte e antigênico, assim como restos celulares da resposta inflamatória e de outros processos degenerativos, além de secretarem radicais livres de oxigênio e nitrogênio e destruir diferentes tipos de patógenos.

Sabe-se que o padrão de atividade dos macrófagos e dos índices de fagocitose para determinadas espécies de peixes podem ser utilizados como indicadores da homeostase ou das possíveis alterações que causem dano ao animal (Pulsford, 1984; Blazer, 1991). Com base no exposto, bioensaios de indução do processo inflamatório e, conseqüente, estímulo à atividade macrófágica vem assumindo importante papel para a compreensão, não só da biologia dos peixes, mas também das inter-relações ambientais (Silva *et al.*, 1998).

O objetivo deste estudo foi determinar o tempo de migração de macrófagos em matrinxã, *Brycon amazonicus* por meio da técnica de inoculação de leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e verificar as possíveis alterações hematológicas.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Pólo Regional do Vale do Ribeira – APTA –SAA, localizado no município de Pariquera-Açu SP/ Brasil. Foram utilizados 30 matrinxãs, *Brycon amazonicus*, com peso médio de $101,55 \pm 24,50$ g e comprimento médio de $19,75 \pm 1,72$ cm. Os tempos de incubação foram 2, 4, 8 e 12 horas, sendo utilizados seis peixes por tempo. Também foram utilizados seis exemplares (controle) que não receberam qualquer tipo de substância intraperitonealmente. Os peixes foram anestesiados com óleo de cravo na concentração de 80 mg L^{-1} (Delbon, 2006) e em seguida, injetados intraperitonealmente 3 mL de solução de levedura com concentração $8.000 \text{ cél. mm}^{-3}$ de *Saccharomyces cerevisiae* (Ranzani-Paiva *et al.*, 2008). Após os períodos de incubação, os animais foram anestesiados novamente, e retirada alíquotas de sangue por punção do vaso caudal, com auxílio de seringas descartáveis, heparinizadas para as seguintes determinações:

- a) número total de células, contado em câmara de Neubauer, utilizando-se solução de Hayen como diluente;
- b) contagem diferencial e total dos leucócitos e contagem total de trombócitos pelo método indireto em extensões sanguíneas coradas pelo May-Grünwald-Giemsa, segundo Rosenfeld (1947);
- c) porcentagem de hematócrito, pelo método do microhematócrito;
- d) taxa de hemoglobina, pelo método da cianometahemoglobina;

Com as taxas de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e número de eritrócitos (Er) foram calculados os índices hematimétricos: VCM (volume corpuscular médio = $\text{Ht} \times 10 / \text{Er}$) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média = $\text{Hb} \times 100 / \text{Ht}$).

Após a coleta de sangue, os matrinxãs foram eutanasiados por aprofundamento do estado anestésico e dissecação medular e a cavidade peritoneal foi delicadamente lavada com 3,0 mL de solução de PBS (phosphate buffered saline – pH 7,2). A seguir, o líquido contendo as células inflamatórias (macrófagos) foi aspirado com pipeta Pasteur. Este

lavado foi centrifugado a 1500 rpm (251.5 x g) por 5 min e o sobrenadante desprezado. O restante do lavado foi utilizado para a determinação da capacidade fagocítica (C.F.) e do índice fagocítico (I.F.) de macrófagos nos diferentes tempos, por microscopia de contraste de fase, segundo metodologia de Silva *et al.* (2002, 2005), obedecendo as seguintes fórmulas: $CF = n^{\circ} \text{ de macrófagos fagocitando} / 100$ e $IF = n^{\circ} \text{ total de leveduras no interior dos macrófagos} / \text{número de macrófagos fagocitando}$.

Para verificar as diferenças entre os tempos de inoculação, foi realizado a análise de variância (Anova) seguida pelo teste de Tukey (Zar, 1999).

Resultados e Discussão

A CF e o IF dos macrófagos nos diferentes tempos de inoculação estão apresentados nas Figuras 1 e 2. Pode-se observar que a CF não apresentou diferença significativa entre os tempos experimentais. Com relação ao IF, o tempo de 2 horas mostrou maior índice de células fagocitadas apresentando diferenças significativas com relação aos outros tempos experimentais. Neste estudo os resultados indicam que 2 horas de incubação foram suficientes para a migração dos macrófagos para *Brycon amazonicus*. Sabe-se que o tempo de incubação das leveduras pode variar de espécie para espécie. Segundo Ranzani-Paiva *et al.* (2008) para o peixe marinho, *Centropomus parallelus* o tempo de incubação foi de 8h, já para rã-touro *Lithobates catesbeianus* (*Rana catesbeiana*) o tempo observado foi de 2h (Dias *et al.*, 2009). Provavelmente essas diferenças estejam relacionadas com a temperatura e o metabolismo desses animais.

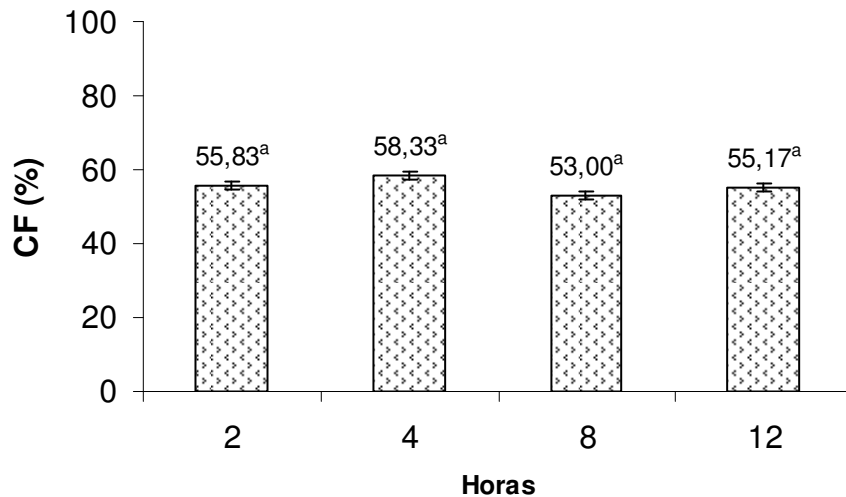


Figura 1– Valores médios percentuais da capacidade fagocítica (CF) de matrinxã, *Brycon amazonicus* nos tempos de incubação de leveduras (Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente)

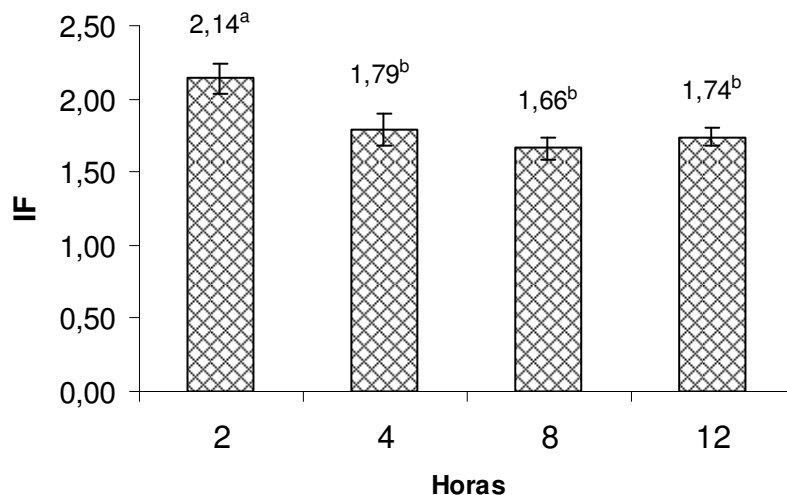


Figura 2– Valores do índice fagocítico (IF) de matrinxã *Brycon amazonicus* nos tempos de incubação de leveduras (Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente)

Avaliando-se os resultados obtidos para as características hematológicas das células vermelhas foi verificada diferença significativa ($p=0,02$) somente no número de eritrócitos entre os tempos (Tabela 1). Entretanto, os demais parâmetros hematológicos não apresentaram o mesmo comportamento ($p>0,05$) (Tabela 2 e 3). Mesmo os animais

sendo anestesiados durante o manejo para inoculação de solução de levedura, este aumento no valor de eritrócitos pode estar relacionado ao estresse sofrido (Martins, 2000), pois os valores aumentaram progressivamente conforme o tempo de espera de inoculação.

Na Tabela 2, pode-se visualizar que os valores dos trombócitos, células responsáveis pelo processo de defesa do organismo (Matushima e Mariano 1996), apresentaram diminuição dos valores conforme o tempo de inoculação, não diferindo estatisticamente ($P=0,22$). O teste de correlação de Pearson mostrou relação inversamente proporcional, com diminuição destas células em relação aos leucócitos totais ao longo do tempo experimental. Tal fato denota que outras células de defesa como os linfócitos, neutrófilos e monócitos provavelmente estejam envolvidos mais acirradamente no processo de defesa do que os trombócitos. Além disso, segundo Sopinska (1985), o aumento dos valores dos leucócitos como, por exemplo, os monócitos, mesmo que a elevação seja de forma sutil, reflete a intensificação do mecanismo de defesa celular.

O aumento dos valores de eritrócitos com diferença significativa correlacionou com as alterações (que não foram significativas) dos monócitos e neutrófilos. Nota-se que, o aumento de ambas as células e também na taxa de hemoglobina podem estar associados à maior demanda de energia/oxigênio pelo organismo, o que normalmente ocorre em situações de estresse agudo, neste caso, representado pela inoculação de leveduras. Neste sentido, a elevação dos eritrócitos, pode ser visto como resposta ao aumento da eficiência para o transporte de oxigênio, uma vez que este contribui e influencia diretamente na disponibilidade de energia empregada nos processos imunológicos.

De acordo com o acima exposto concluiu-se que o tempo de maior migração de macrófagos para o matrinxã é de 2 horas.

Tabela 1 – Valores médios e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros hematológicos de matrinxã, *Brycon amazonicus* nos tempos de incubação de leveduras

Tempo	Ht	Hb	Er	VCM	CHCM
	X ± EPM	X ± EPM	X ± EPM	X ± EPM	X ± EPM
Controle	38,83±1,33	10,62±0,44	289,5±8,89 ^a	134,57±4,27	27,42±0,89
2h	42,17±1,49	12,46±0,28	343,92±13,31 ^a	124,75±8,23	29,72±0,73
4h	40,83±1,83	11,46±0,55	327,00±9,64 ^{ab}	124,67±3,28	28,08±0,57
8h	38,17±0,54	10,92±0,32	330,00±1,41 ^b	115,67±1,72	28,63±0,82
12h	41,83±1,16	11,58±0,30	329,75±18,75 ^{ab}	129,31±5,59	27,71±0,48

Ht = hematócrito (%); Hb = taxa de hemoglobina (g 100 mL⁻¹); Er = número de eritrócitos (10⁷mm⁻³); VCM = volume corpuscular médio (fL); CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média (%); Letras iguais na coluna não diferem significativamente segundo teste de Tukey (P < 0,05);

Tabela 2 - Valores médios e erro padrão da média (EPM) do número absoluto de trombócitos de matrinxã, *Brycon amazonicus* nos tempos de incubação de leveduras

Tratamentos	Trombócitos
Controle	13.243,89 ± 4.260,44
2 h	11.555,10 ± 1.878,95
4 h	13.493,88 ± 3260,27
8 h	4.544,42 ± 1.015,80
12h	9.534,07 ± 3.794,34

Tabela 3 – Valores médios e erro padrão da média (EPM) dos números absolutos dos leucócitos de matrizã, *Brycon amazonicus* nos tempos de incubação de leveduras

Trat.	Leucócitos Totais n°. Absolutos	Linfócitos n°. Absolutos	Neutrófilos n°. Absolutos	Basófilos n°. Absolutos	Eosinófilos n°. Absolutos	Monócitos n°. Absolutos
Controle	6.810,54 ± 1.739,45	3.721,99 ± 1.100,27	2.499,04 ± 700,03	33,60 ± 23,84	18,36 ± 18,36	552,24 ± 177,46
2 h	13.031,06 ± 1.699,09	4.394,85 ± 660,44	7.343,57 ± 1.286,37	0,00	0,00	1.292,64 ± 208,53
4 h	10.291,51 ± 2.563,88	4.874,27 ± 1.636,53	5.161,21 ± 1.134,24	0,00	0,00	205,00 ± 64,75
8 h	13.930,10 ± 2.175,87	6.497,37 ± 965,81	6.754,98 ± 1.167,20	0,00	8,70 ± 8,70	669,05 ± 175,23
12 h	14.697,18 ± 3806,62	5.240,97 ± 1.930,21	7.673,24 ± 2.419,11	0,00	0,00	1.782,98 ± 865,03

Referências Bibliográficas

- Blazer, V.S. 1991 Piscine macrophage function and nutritional influences: A review. *Journal of Aquatic Animal Health*, 3: 77-86.
- Delbon, M.C 2006 *Ação da benzocaína e do óleo de cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia Oreochromis niloticus*. 91p. Dissertação de Mestrado em Aqüicultura, Jaboticabal, SP. Disponível em:
(http://www.caunesp.unesp.br/pg/trabalhos_dissertacoes_autor.php)
- Dias, D.C., De Stéfani, M.V., Ferreira, C.M., França, F.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Santos, A.A. 2009 Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research*, 40:1-8 (DOI 10.1111/j.1365-2109.2009.02390.x).
- Martins, M.L. 2000 *Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887) estressados*. 125f. Tese de Doutorado em Aqüicultura, Jaboticabal
(http://www.caunesp.unesp.br/pg/trabalhos_teses_autor.php).
- Matushima, E.R., Mariano, M. 1996. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Brazilian Journal of Veterinary Animal Science*, 33 (1): 5-10.
- Pulsford, A. 1984 Preliminary studies on tripanosomes from the dogfish, *Scyliarhinus canicula* L. *Journal of Fish Biology*, 6: 671-682.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Santos, A.A., Dias, D.C., Seriani, R., Egami, M. 2008 Hematological and phagocytic response of fat snook, *Centropomus parallelus*, reared in net cages, before and after inoculation with *Sacharomyces cerevisiae*. *Bioikos*, 22: 29-35.
- Rosenfeld, G. 1947 Corante pancrônico para hematologia e citologia clínica. Nova constituição dos componentes do May Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantã*, 20: 329-334.
- Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., Plumb, J.A. 1997 Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58: 181-190.
- Silva, J.R.M.C., Hernandez-Blazquez, F.J., Barbieri, R.L. 1998 Induced inflammatory response in the Antarctic fish *Notothenia neglecta*. *Polar Biology*, 20: 206-212.
- Silva, J.R.M.C., Porto-Neto, L.R., Borges J.C.S., Jensch-Junior B.E. 2005 Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0°C. *Polar Biology*, 28 (4): 326-328.

- Silva, J.R.M.C., Staines, N.A., Hernandez-Blazquez, F.J., Porto-Neto, L.R., Borges J.C.S. 2002 Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of *Notothenia coriiceps*. *Journal Fish Biology*, 60: 466-478.
- Sopinska, A. 1985 Effects physiological factors, stress, and disease on hematologic parameters of carp, with a particular reference to the leukocyte patterns.III. Changes in blood accompanying branchionecrosis and bothriocephalosis. *Acta Ichthyology. Pisc.*, 15: 141-165.
- Vallejo, A.N., Miller, N.W., Clem, L.W. 1992 Antigen processing and presentation in teleost immune responses. In: Faisal, M., Hetrick, F.M. (Ed.), *Ann. Rev. Fish Dis.*, 2: 73-89.
- Zar, J.H. 1999 *Biostatistical Analysis*. 4rd. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA, 662 p.
- Zelikoff, J.T., Enami, N.A., Bowser, D., Squibb, S., Frenel, K. 1991 Development of fish peritoneal macrophages as a model of higher vertebrates in immunotoxicological studies. 1. Characterization of trout macrophages morphological, functional and biochemical properties. *Fundamental Applied Toxicology*, 90: 17-26.

CAPITULO 2



Probiótico na dieta de reprodutores de matrinxã, *Brycon amazonicus*

Resumo

Objetivou-se avaliar a influência do probiótico em reprodutoras de matrinxã, *Brycon amazonicus*, e verificar o efeito do extrato hipofisário sobre o número de ovócitos liberados e na estimativa das taxas de fertilização e eclosão, bem como, avaliar os parâmetros hematológicos, atividade fagocítica dos macrófagos e análises de lipídios em músculo e fígado. As matrizes foram mantidas em dois viveiros de 600 m², na densidade de 50 matrizes por viveiro, de março a novembro de 2008. Foram utilizados dois tratamentos: controle (T1) e 10g de probiótico por kg de ração (T2), sendo a alimentação oferecida duas vezes ao dia. No período reprodutivo, 20 animais de cada tratamento foram selecionados, e submetidos ao processo de reprodução induzida. Para as análises hematológicas utilizaram-se 20 peixes, os quais foram anestesiados e retiradas alíquotas de sangue por punção do vaso caudal para as determinações de: número total de células, contagem diferencial e total dos leucócitos, contagem total de trombócitos, hematócrito, taxa de hemoglobina, cortisol e glicose. Calculou-se o volume corpuscular médio e a concentração de hemoglobina corpuscular média. Outros dez matrinxãs do mesmo lote foram utilizados para a avaliação da atividade fagocítica dos macrófagos e também para as análises de lipídios. Os resultados mostraram que as matrizes que receberam a dieta suplementada com probiótico apresentaram aumento do número de ovócitos e, conseqüentemente, nas taxas de fertilização e eclosão das larvas e também significativo aumento da atividade fagocítica dos macrófagos, indicando melhora no sistema imune dos reprodutores. Os parâmetros hematológicos sofreram alterações quando comparados com o momento zero e os valores de cortisol e glicose foram

mais elevados em fêmeas. Os valores de lipídios totais em músculo e fígado foram inferiores nos peixes que receberam alimentação suplementada com probiótico.

Palavra-chave: Reprodução induzida, *Bacillus subtilis*, migração macrófagos, hematologia, cortisol, glicose

Abstract

The objective was to evaluate the influence of probiotic in breeding females of matrinxã, *Brycon amazonicus*, and verify the effect of pituitary extract on the number of oocytes released and the estimated rates of fertilization and hatching, as well, to evaluate the hematological parameters, phagocytic activity of macrophages and lipids analysis in muscle and liver. The breedings were kept in two ponds of 600 m², at a density of 50 fish per pond during the period from March to November 2008. The treatments were: control (T1) and 10g of probiotic per kg of diet (T2). The feed was offered twice daily. During the reproductive period, 16 animals of each treatment were selected, it was administered two doses of crude extract of carp pituitary, at intervals of 10 hours for females and only one dose for males, along with the 2nd dose females. For hematological analysis, were used 20 fish, which were anesthetized and aliquots of blood by puncturing the caudal vessel to determine number of total cells, differential count and total leukocyte, thrombocyte count, hematocrit percentage, rate hemoglobin, cortisol and glucose. The mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin concentration was calculated. Another 10 matrinxãs the same lot were used for evaluating the phagocytic activity of macrophages and for analysis of lipids. The results showed that breeding who received diet supplemented with probiotics showed a slightly higher number of oocytes and, consequently, the rates of fertilization and hatching of larvae. A significant increase in phagocytic activity of macrophages was observed, indicating

an improvement in the immune system of breeding. Hematologic parameters changed when compared with the time zero and the values of cortisol and glucose were higher in females. The values of total lipids in muscle and liver were lower in fish fed with probiotic supplemented

Key-word: Induced spawning, *Bacillus subtilis*, macrophage migration, hematological, cortisol, glucose

Introdução

A piscicultura vem contribuindo cada vez mais na oferta de proteína para consumo humano. Dentre as inúmeras espécies de peixes nativos do Brasil o matrinxã vem apresentando perfil adequado para criação em cativeiro (Romagosa *et al.*, 2001 e Zaniboni-Filho *et al.*, 2006).

O gênero *Brycon*, pertencente à família Characidae, é considerado um dos mais numerosos gêneros de caraciformes neotropicais, com mais de 60 espécies nominais, das quais, aproximadamente 40 distribuem-se pela América Central e do Sul. O matrinxã, *Brycon amazonicus* é uma espécie de peixe de água doce nativa da região amazônica - Brasil, apresentando perfil adequado para criação em cativeiro (Zaniboni-Filho *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, tem-se intensificado o número de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de alimentos funcionais, ou seja, que fornecem a nutrição básica promovendo o aumento da eficiência alimentar, taxa de crescimento e melhora da saúde de peixes (Oliveira *et al.*, 2002). Dentre os alimentos funcionais destacam-se os probióticos que são suplementos alimentares compostos de microorganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro, pelo equilíbrio da microbiota intestinal (Fuller, 1989). Schrezenmeir e De Vrese (2001) consideraram que o termo probiótico deveria ser utilizado para designar preparações ou produtos

que contêm microrganismos viáveis definidos e em quantidade adequada que alteram, por colonização, a microbiota própria das mucosas do sistema do hospedeiro, produzindo efeitos benéficos em sua saúde. Os probióticos, em sua maioria são produtos preparados com *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium*, *Bacillus subtilis* e em alguns casos leveduras (Guzmán, 1992).

A ação deste composto ocorre pela exclusão competitiva (Ozawa *et al.*, 1978), competição por locais de adesão no aparelho digestivo (Watkins e Miller, 1983), por estímulo da imunidade (Inooka *et al.*, 1986), por maior produção de ácido láctico (Fuller, 1977), pela diminuição da produção de amins tóxicas, aumento da disponibilidade de aminoácidos nos locais de absorção (Kozasa, 1989), por economia de energia e também pela maior disponibilidade de vitaminas e enzimas (Fuller, 1989).

O efeito de probióticos sobre a imunidade tem induzido grande número de pesquisas, sendo a maioria realizada em mamíferos (Coppola e Gil-Turnes, 2004), apesar de ainda não estar esclarecido o modo de ação (Cross, 2002). Em peixes, o estudo da utilização de probiótico, tem sido cada vez maior com o intuito principal de promover proteção contra doenças (Aly *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009). Também podem atuar diminuindo a absorção de lipídios pelo organismo fazendo com que ocorra a diminuição de gordura nos tecidos (Roos e Katian, 2000).

Objetivou-se, com o presente estudo, avaliar a influência do probiótico como suplemento alimentar em reprodutores de matrinxã, *Brycon amazonicus*, sobre os aspectos reprodutivos (somente fêmeas), hematológicos, imunológicos e quantificação de lipídios totais em músculo e fígado.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Pólo Regional do Vale do Ribeira, no município de Pariquera-Açu, SP, Brasil. As matrizes foram mantidas em dois viveiros

(600 m²) na densidade de 50 matrizes por viveiro de março a novembro de 2008. Foram utilizados dois tratamentos, controle (T1) sendo utilizada ração comercial (32% PB, 7% FB, 6,5% EE) e 10g de probiótico por kg de ração (T2) (ração + probiótico). O probiótico comercial contendo 10⁹ UFC g⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônias) em pó (liofilizado) foi homogenizado na ração em misturador e adicionado 2% de óleo de soja (inclusive na ração do controle) para aderir o probiótico no pelete. A alimentação foi oferecida duas vezes ao dia, na proporção de 1% da biomassa total nos meses frios (maio a agosto) e 3% nos quentes (março, abril e setembro a novembro). No período reprodutivo (novembro), dez fêmeas de cada tratamento foram selecionadas pelos aspectos externos tais como, ventre abaulado e presença da papila urogenital saliente e dez machos, pela presença de sêmem, por meio de massagem na cavidade celomática. Nas fêmeas foram ministradas duas doses de extrato bruto de pituitária de carpa (0,5 e 5 mg.kg⁻¹) em intervalos de 10 horas e, nos machos uma dose (0,5 mg kg⁻¹), no momento da 2^a dose das fêmeas. Foi estimada a média do número de ovócitos liberados por tratamento, as taxas de fertilização e eclosão (Romagosa *et al.*, 2001).

No momento da implantação do experimento (março 2008) foram realizadas análises hematológicas, imunológicas e também coletados amostras de músculo e fígado para análises de lipídios sendo este grupo classificado como momento zero.

Após a extrusão dos ovócitos e fertilização, dez fêmeas e dez machos de matrinxã de cada tratamento (totalizando 20 animais por tratamento) com peso médio de 2,63 ± 0,68 kg e comprimento médio de 50,70 ± 4,31 cm foram utilizados para as análises hematológicas. Os animais foram anestesiados com benzocaína (concentração de 100 mg L⁻¹) e retirada alíquotas de sangue por punção do vaso caudal, com auxílio de seringas descartáveis, heparinizadas e determinados: número total de células, contado em câmara de Neubauer, utilizando-se solução de Hayen como diluente;

contagem diferencial e total dos leucócitos e contagem total de trombócitos pelo método indireto em extensões sanguíneas coradas pelo May-Grünwald-Giemsa, segundo Rosenfeld (1947); hematócrito, pelo método do microhematócrito e taxa de hemoglobina, pelo método da cianometahemoglobina. Com os valores da taxa de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e número de eritrócitos (Er) foram calculados os índices hematimétricos absolutos: volume corpuscular médio ($VCM = (Ht \times 10) / Er$) e concentração de hemoglobina corpuscular média ($CHCM = (Hb \times 100) / Ht$). Com o plasma, foram realizadas análises de cortisol pelo método de ELISA utilizando o kit DBC (Diagnostics Biochem Canadá Inc.) e glicose por kit da LABTEST®.

Outros dez peixes do mesmo lote foram utilizados para a avaliação da atividade fagocítica dos macrófagos. O tempo utilizado para migração foi de 2 horas como determinado em experimento preliminar (Capítulo 1). Os matrinxãs foram anestesiados com benzocaína, em seguida, injetados na cavidade celomática 6 mL de solução de levedura na concentração $8.000 \text{ células mm}^{-3}$ de *Saccharomyces cerevisiae*. Após o período de incubação (2h), os animais foram eutanasiados por aprofundamento do estado anestésico e dissecação medular e a cavidade celomática foi delicadamente lavada com 6 mL de solução de PBS (phosphate buffered saline – pH 7,2). O líquido contendo as células fagocíticas (macrófagos) foi aspirado com pipeta Pasteur e centrifugado a 1500 rpm ($251,5 \times g$) por 5 min sendo o sobrenadante desprezado. Parte deste lavado foi utilizada para a determinação da capacidade fagocítica ($CF = n^{\circ} \text{ de macrófagos fagocitando} / 100 \text{ macrófagos}$) e do índice fagocítico ($IF = n^{\circ} \text{ total de leveduras no interior dos macrófagos} / \text{número de macrófagos fagocitando}$) de macrófagos nos tempos de incubação, por meio de microscopia de contraste de fase (400 X), segundo metodologia de Silva *et al.* (2002, 2005).

Após o procedimento da análise fagocítica, foram coletados fígado e músculo (dorsal superior a 2,0 cm do opérculo esquerdo), dos dez peixes. Essas amostras

foram mantidas a -10°C e, posteriormente, enviados para análises de extrato-etéreo (segundo AOAC, 1984) no Laboratório de Análises em Nutrição Animal (LANA) UNESP/FCAVJ – Jaboticabal - SP.

Estatisticamente, para os dados reprodutivos foram verificadas as diferenças entre o número de ovócitos por tratamento pelo teste t. Para fins de comparação, a porcentagem de fertilização e eclosão foi transformada, sendo calculado o arcoseno da raiz de cada valor. Para os parâmetros hematológicos, imunológicos e lipídios foi realizado a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey (ZAR, 1999). Os dados em porcentagem foram previamente transformados pela fórmula $y = \arcseno \sqrt{x}$ (Mendes, 1999), para posterior análise.

Resultados e Discussão

A suplementação de 10g de probiótico kg^{-1} de ração (T2) propiciou o maior número de respostas positivas com 100% das fêmeas respondendo à indução hormonal e apresentando o número de ovócitos liberados e a taxa de fertilização superior quando comparados ao controle (T1), no qual apenas 80% responderam à indução. Entretanto, as diferenças entre os tratamentos foram significativas em relação as taxas de fertilização e eclosão (Tabela 1). Observou-se que as fêmeas do T2 apresentaram comportamento menos agressivo quando comparadas às do T1 durante a extrusão dos ovócitos. Neste estudo utilizou-se o extrato de pituitária de carpa, nas dosagens usuais preconizadas por Romagosa *et al.* (2001), uma pequena dose estimularia a migração da vesícula germinativa e 10 h após, a dose maior induziria a quebra da vesícula germinativa, ovulação e desova. Os machos utilizados liberaram sêmen fluído, com uma única aplicação hormonal, para garantir o sucesso do experimento. A estimativa da taxa de fertilização encontrados para *B. amazonicus* neste estudo, foram próximos aos de Romagosa *et al.* (2001) para a mesma espécie.

Tabela 1. Valores médios de peso, comprimento, número de ovócitos, taxa de fertilização e eclosão de fêmeas de *Brycon amazonicus* utilizadas no experimento

Trat.	PI (kg)	Pf (kg)	Ct (cm)	ovócitos liberados (10^2)	TF (%)	TE (%)
T1	2,4 ± 0,2	2,9 ± 0,3	53,4 ± 1,2	321,0 ± 48,4	28,1 ± 4,1 ^a	10,2 ± 1,5 ^a
T2	2,3 ± 0,4	2,8 ± 0,2	52,6 ± 2,7	354,0 ± 94,7	57,3 ± 4,1 ^b	21,9 ± 1,7 ^b

T1 – controle; T2 – 10g de probiótico / kg de ração; Pi = Peso Inicial; Pf = Peso Final; Ct = Comprimento Total; TF = Taxa de Fertilização; TE = taxa eclosão. Letras diferentes na coluna diferem estatisticamente.

Ghosh *et al.* (2007) testando probiótico composto de *Bacillus subtilis* em quatro espécies de peixes ornamentais (*Poecilia reticulata*, *Poecilia sphenops*, *Xiphophorus helleri* e *Xiphophorus maculatus*) constataram que a incorporação da bactéria na dieta dos peixes favoreceu o desempenho reprodutivo e aumentou a sobrevivência das larvas. Este fato ocorreu devido às bactérias probióticas facilitarem a absorção de aminoácidos melhorando o desenvolvimento dos ovários e maturação por serem importantes constituintes dos ovócitos e conseqüentemente aumentando seu número e as taxas reprodutivas (Dahlgren, 1980).

Avaliando-se estatisticamente os valores dos parâmetros hematológicos das células vermelhas, observou-se que somente o hematócrito e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) apresentaram diferenças significativas entre machos e fêmeas, sendo que as análises foram feitas separadamente para os sexos, segundo teste de Kruskal-Wallis (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores médios e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros hematológicos de reprodutores de matrinxã *Brycon amazonicus*, alimentados com probióticos, após reprodução

Trat.	Ht	Hb	Er	VCM	CHCM
MZ	40,75±1,90 ^b	12,78±1,09	2,53±0,22	171,64±15,84	31,25±1,95 ^a
T1♂	52,44±1,50 ^a	13,18±0,61	3,06±0,24	180,18±16,80	25,17±1,00 ^b
T2♂	52,10±1,83 ^{b^a}	12,74±0,44	2,52±0,18	213,41±11,16	24,49±0,45 ^b
MZ	40,75±1,90 ^b	12,78±1,09	2,53±0,22	171,64±15,84	31,25±1,95 ^a
T1♀	47,63±1,43 ^a	10,99±0,57	2,81±0,22	177,45±15,74	23,18±1,26 ^b
T2♀	45,20±0,85 ^{ab}	10,67±0,28	2,72±0,12	168,91±7,39	23,59±0,39 ^b

MZ = coleta antes do início da alimentação; T1 = controle; T2 = 10g probiótico kg⁻¹ ração; Ht = hematócrito (%); Hb = taxa de hemoglobina (g 100 mL⁻¹); Er = número de eritrócitos (10⁶ mm⁻³); VCM = volume corpuscular médio (fL); CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média (%); Letras iguais na coluna não diferem significativamente segundo teste de Kruskal-Wallis

Em relação aos valores de hematócrito os machos apresentaram porcentagem acima dos encontrados nos animais do momento zero (coleta antes do início do experimento) sendo que não foram apresentadas alterações quando comparados os animais do controle com os tratados com probiótico. Já nas fêmeas, pode-se observar que houve elevação nos valores quando comparados os animais do momento zero com os peixes do controle e probiótico sendo esta diferença significativa apenas nos matrinxãs do grupo controle. Segundo Urbinati e Carneiro (2001) e Inoue *et al.* (2005) o aumento do hematócrito também é considerado indicador de estresse.

Em relação aos valores de CHCM pode-se verificar que houve redução nos valores quando comparados ao momento zero em relação aos tratamentos em ambos os sexos, sendo que, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas. Estes valores assemelham-se aos encontrados por Tavares–Dias *et al.* (1999 e 2008) estudando a mesma espécie e Ranzani-Paiva (1996) com pirapitinga-do-sul, *Brycon* sp.

Os valores médios do número absoluto dos trombócitos estão apresentados na Tabela 3. Observou-se que os trombócitos apresentaram diferenças significativas somente nas fêmeas e quando comparados o momento zero com os animais do controle e probiótico.

Pode-se observar que os peixes (ambos os sexos) do grupo controle apresentaram valores mais elevados que os animais alimentados com dietas suplementadas com probiótico. Provavelmente este aumento está relacionado ao período em que os mesmos se encontravam, ou seja, no período reprodutivo.

Tabela 3 - Valores médios e erro padrão da média (EPM) do número de trombócitos de reprodutores de matrinxã, *Brycon amazonicus* utilizados no experimento

Tratamentos	Trombócitos
MZ	10.849,20 ± 2.981,90
T1♂	17.594,14 ± 5.256,77
T2♂	13.580,19 ± 2585,90
MZ	10.849,20 ± 2.981,90 ^b
T1♀	26.706,73 ± 2037,37 ^a
T2♀	19.485,95 ± 2619,52 ^{ab}

MZ = momento zero; T1 = Controle; T2 = probiótico; Letras iguais na coluna não diferem significativamente segundo teste de Kruskal-Walis ($p < 0,05$).

A função dos trombócitos nos peixes é pouco conhecida, uma vez que nesses animais é uma célula que participa do processo de defesa do organismo segundo Matushima e Mariano (1996). Entretanto, em mamíferos, sabe-se que o aumento de plaquetas pode ser verificado em certos processos fisiológicos associados às hemorragias (Janini e Janini Filho, 1990).

Os valores médios dos números absolutos das células brancas (leucócitos) estão representados na Tabela 4. Os leucócitos totais nos machos mostraram aumento, mas não foram significativos. Com relação às fêmeas, estas apresentaram o mesmo comportamento sendo estes valores significativos quando comparados o momento zero com os demais tratamentos.

Valores inferiores dos leucócitos totais foram encontrados por Tavares-Dias *et al.* (2008) com a mesma espécie. Em relação aos neutrófilos, pode-se observar que

houve elevação quando comparados aos peixes dos tratamentos (ambos os sexos) com os animais do momento zero. Nos machos pode-se observar que não houve diferença significativa entre os tratamentos (controle e probiótico) somente quando comparados com o momento zero, apresentando diferença somente nos animais do T₁. Provavelmente, esta elevação nos valores dessas células esteja relacionada com o período de reprodução, pois os animais que foram coletados no momento zero, não estavam no período reprodutivo. Os basófilos não foram encontrados nos animais do momento zero e nas fêmeas do T₂ sendo que foi verificado maior valor em fêmeas do T₁. Ranzani-Paiva e Silva-Souza (2004) sugerem que tal granulócito é mais freqüente em peixes portadores de parasitoses, enquanto que Roberts (1981) relaciona os mesmos a processos alérgicos, por possuírem histamina em seus grânulos. Tais observações não puderam ser avaliadas neste estudo, pois não foram realizadas coletas para verificar a presença de parasitos nesses peixes. Os monócitos apresentaram aumento elevado quando comparados o momento zero com os tratamentos (ambos os sexos), entretanto, não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos T₁ e T₂ (ambos os sexos). Esses valores encontrados nos tratamentos corroboram os de Tavares-Dias *et al.* (2008).

A variação dos parâmetros sanguíneos é atribuída não apenas entre diferentes espécies, mas também pode ser observada entre indivíduos da mesma espécie habitando diferentes nichos, induzindo-os à adaptações fisiológicas (Campbell e Murru, 1990). Mas as variações hematológicas, nos peixes, estão diretamente relacionadas ao sexo, estágio de desenvolvimento gonadal, estado nutricional, sazonalidade, alimentação e nicho (Ranzani-Paiva *et al.*, 2000; Tavares-Dias *et al.*, 2002 e 2004). Foi observado diminuição no número das CGE nos machos e elevação dos valores destas células em fêmeas sendo estas diferenças não significativas.

Tabela 4 – Valores médios e erro padrão da média (EPM) dos números absolutos das células do sangue periférico de reprodutores de matrinxã, *Brycon amazonicus* alimentados com dietas suplementadas com probiótico

Trat.	Leucócitos Totais n°. Absolutos	Linfócitos n°. Absolutos	Neutrófilos n°. Absolutos	Basófilos n°. Absolutos	Eosinófilos n°. Absolutos	Monócitos n°. Absolutos	CGE n°. Absolutos
MZ	12.415,96±2.493,87	8.961,41±1.876,37	2.990,94±1.193,22 ^b	0,00	45,46±34,14	236,43±88,19 ^b	181,72±94,74 ^{NS}
T1♂	18.845,77±2.869,54	7.031,21±1.454,70	10.200,42±1.862,11 ^a	22,87±22,87	0,00	1.555,95±265,76 ^a	35,32±18,16 ^{NS}
T2♂	17.677,47±2.282,66	8.106,12±1.114,35	7.862,61±1.557,84 ^{ab}	13,03±8,70	46,36±20,59	1.592,49±474,48 ^a	56,86±24,03 ^{NS}
MZ	12.415,96±2.493,87 ^b	8.961,41±1.876,37	2.990,94±1.193,22 ^b	0,00 ^b	45,46±34,14	236,43±88,19 ^b	181,72±94,74 ^{NS}
T1♀	27.510,41±3.466,26 ^a	8.347,87±1.717,75	16.644,84±2.822,00 ^a	121,13±49,30 ^a	0,00	1.974,49±354,15 ^a	422,08±81,56 ^{NS}
T2♀	29.938,44±3.505,89 ^a	6.606,36±962,60	20.472,48±3.152,94 ^a	0,00 ^b	29,58±29,58	2.581,55±489,02 ^a	248,47±90,83 ^{NS}

MZ = coleta antes do início do experimento; T1 = Controle; T2 = probiótico; Letras diferentes na coluna diferem significativamente segundo teste de Kruskal-Wallis (p<0,05).

Os dados encontrados de cortisol estão apresentados na Figura 1. Pode-se observar que os valores de cortisol foram superiores nas fêmeas quando comparadas ao momento zero e aos machos.

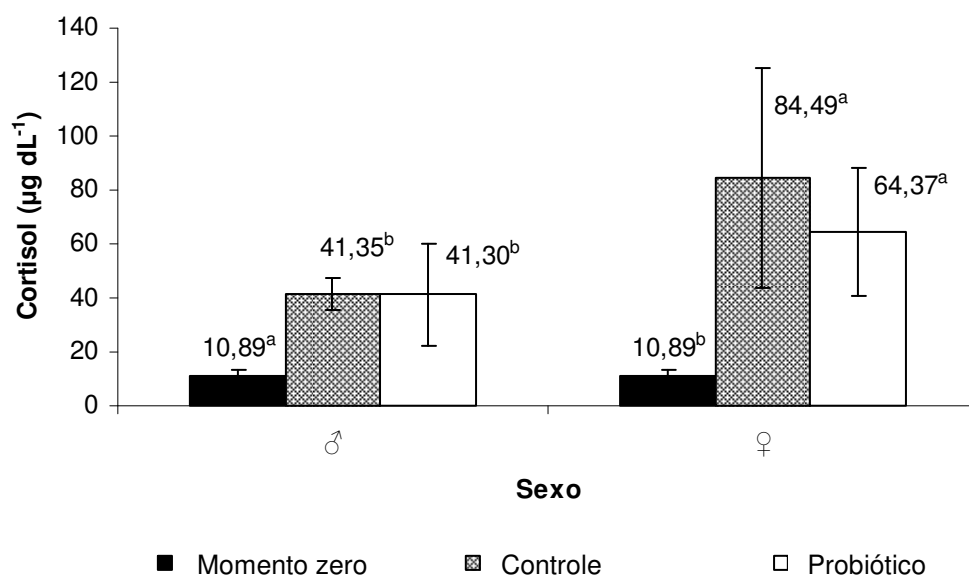


Figura 1- Cortisol plasmático de matrinxã *Brycon amazonicus* alimentados com dieta suplementada ou não com probiótico composto de *Bacillus subtilis* (Letras iguais não diferem estatisticamente).

Entretanto, mesmo não apresentando diferença estatística, os valores encontrados nas fêmeas que receberam alimentação suplementada com probiótico foram inferiores as fêmeas do controle. Os peixes do momento zero apresentaram valores inferiores quando comparado aos demais tratamentos. Carneiro e Urbinati (2002) observaram valores abaixo aos do presente estudo com matrinxãs após sofrerem o estresse de transporte. Os autores quantificaram como nível basal, ou seja, antes do transporte valor de $136,3 \pm 13,93 \text{ ng mL}^{-1}$ ($13,63 \mu\text{g dL}^{-1}$) valores esse próximo dos encontrados no momento zero. Após 24 horas do transporte, encontraram valores de $142,5 \pm 15,02 \text{ ng mL}^{-1}$ ($14,25 \mu\text{g dL}^{-1}$). Provavelmente,

após 24 horas já havia passado o “pico” do cortisol. Hoshiba *et al.* (2009) testaram o manejo de captura em matrinxãs e, observaram valores acima de 120 ng mL^{-1} ($12,0 \text{ } \mu\text{g dL}^{-1}$) sendo esses inferiores aos do presente estudo. Esta diferença entre os resultados encontrados podem estar relacionados com a fase de desenvolvimento dos peixes, sendo que para o transporte foram utilizados exemplares jovens de matrinxãs enquanto que neste estudo reprodutores após o estresse de extrusão dos ovos e coleta de sêmen.

O estresse usualmente é reportado como causador de efeitos adversos no desempenho reprodutivo de peixes por meio de alterações nas taxas de fecundidade, tamanho dos ovos e desenvolvimento larval. Captura, confinamento e estresse de manejo inibem ovulação em robalo *Centropomus undecimalis* e aumentam atresia em *Cheilodichthys kumer* (Small, 2004).

Embora a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura sugira que o estresse fisiológico afeta negativamente o processo reprodutivo de teleósteos por meio da função endócrina modificada (Pankhurst e Van Der Kraak, 2000), a relação entre estresse, cortisol e sucesso reprodutivo ainda não está esclarecido. Neste estudo, foi possível observar que os peixes que receberam alimentação suplementada com probiótico sofreram menos interferência do estresse na reprodução, pois apresentaram maior número de ovócitos e taxas de fertilização e eclosão ligeiramente superiores. Além disso, foi possível observar que os animais do tratamento com probiótico apresentaram-se mais calmos não se debatendo durante a manipulação.

Com relação a glicose, pode-se observar que houve aumento nos valores quando comparado o momento zero com os demais tratamentos, sendo essa diferença significativa como mostra a Figura 2.

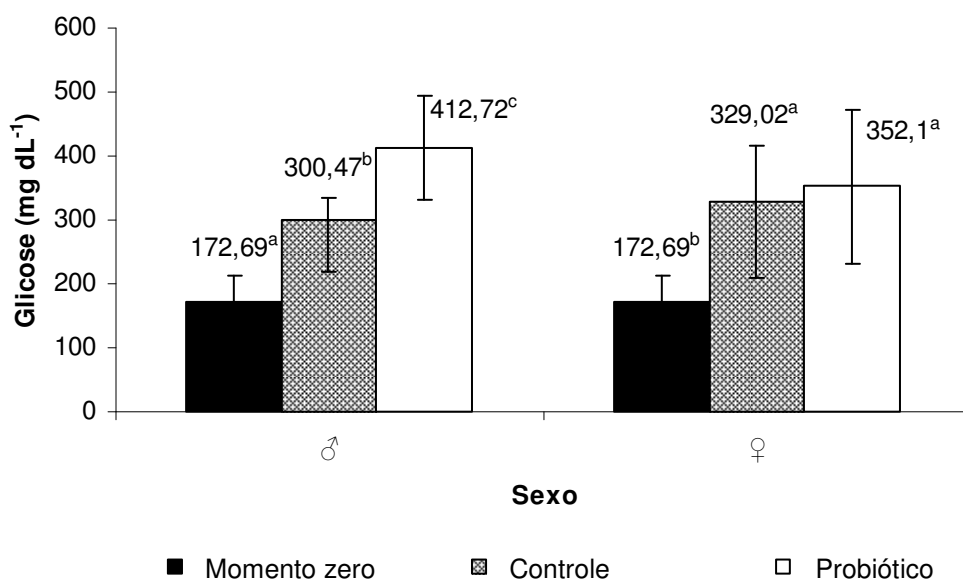


Figura 2- Glicose plasmática de matrinxã *Brycon amazonicus* alimentados com dieta suplementada ou não com probiótico (Letras iguais não diferem estatisticamente).

Os valores de glicose apresentaram-se superiores aos encontrados por Carneiro e Urbinati (2002) e Hoshiba *et al.* (2009) que variaram de 40 a 120 mg dL⁻¹ e 80 a 115 mg dL⁻¹, respectivamente. O aumento dos valores de cortisol e glicose no sangue são indicadores muito utilizados para expressar condições de estresse (Morgan e Iwana, 1997; Wendelaar Bonga, 1997; Wells e Pankhurst, 1999), o que sugere que o fato dos animais estarem no período reprodutivo foi situação estressante.

A capacidade fagocítica (CF) e índice fagocítico (IF) dos macrófagos estão representados na Figura 3 e 4. A CF dos macrófagos apresentou diferença significativa ($p < 0,0001$) nos animais que receberam dieta suplementada com probiótico apresentando melhora de quase 50% neste parâmetro. Isso mostra que o probiótico apresentou efeito imunocompetente. O IF não apresentou diferença significativa entre os tratamentos.

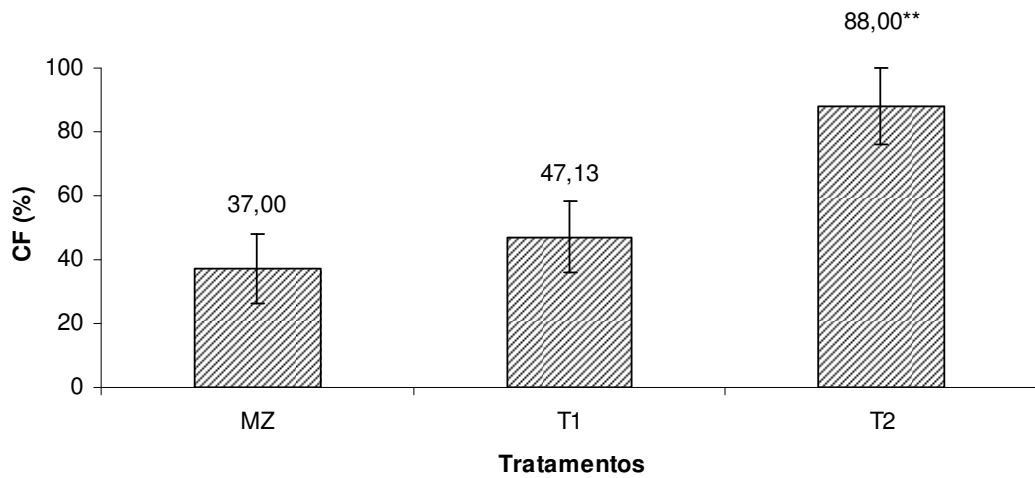


Figura 3 – Capacidade fagocítica dos macrófagos de reprodutores de matrinxã, *Brycon amazonicus* alimentados com dieta suplementada ou não com probiótico

(MZ= momento zero; T1= controle; T2= probiótico; ** P< 0,0001)

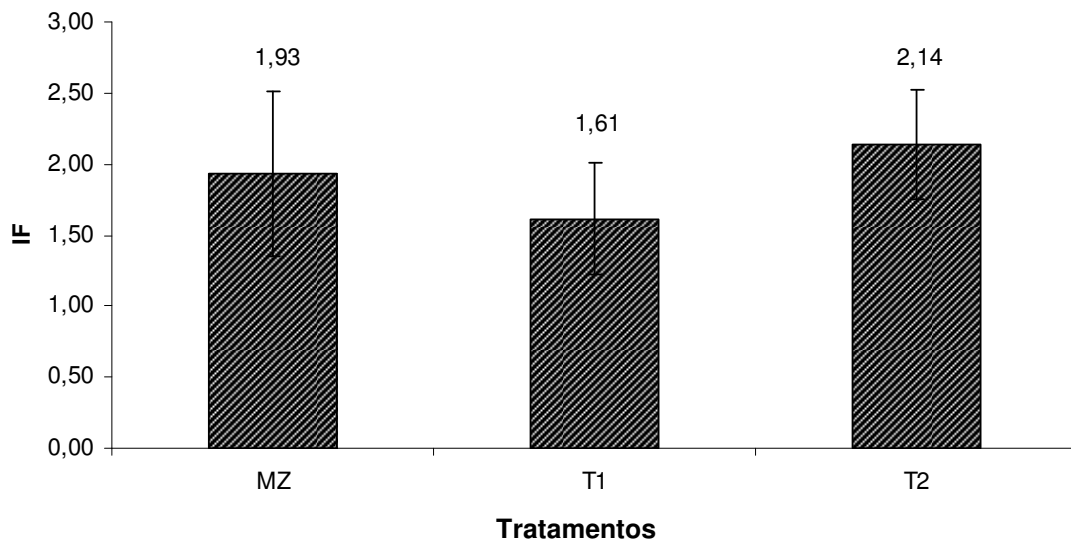


Figura 4 – Índice fagocítico dos macrófagos de reprodutores de matrinxã, *Brycon amazonicus* alimentados com dieta suplementada ou não com probiótico

(MZ= momento zero; T1= controle; T2= probiótico)

Segundo Copolla e Gil-Turnes (2004), os probióticos têm, além de sua atividade como promotores de crescimento e reguladores de microbiota das mucosas, efeito imunomodulador, embora a forma de ação seja pouco conhecida. Segundo os autores, as evidências acumuladas sobre os benefícios decorrentes do uso dos probióticos justificam a necessidade de aprofundar estes estudos sobre seu modo de ação, a fim de otimizar sua utilização como profiláticos, promotores de crescimento e imunoestimulante. Dias et al. (2009) analisando a capacidade e o índice fagocítico de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) na fase de engorda, alimentadas com diferentes probióticos e doses, também observou influência positiva da capacidade fagocítica desses animais alimentados com este produto. Entretanto, verificaram que os animais do controle apresentaram capacidade fagocítica de $48,2 \pm 4,19$ %, enquanto que nos dos tratamentos que utilizaram probióticos, observou variação de 66 a 93% valores próximos ao presente trabalho.

Para o índice fagocítico, entretanto, não foram observadas influências significativas, obtendo resultados variando entre 3,39 a 3,93 valores esses acima do presente trabalho. França *et al.* (2008) testando probiótico em imagos de rãs touro (*Lithobates catesbeianus*) observaram aumento nos valores da capacidade fagocítica dos macrófagos sendo que no controle foi observado percentual de 37,17% enquanto que nos demais tratamentos foram verificadas variações de 58,17 a 68,17%. Em relação ao índice fagocítico estes mesmos autores observaram diferença significativa entre os tratamentos quando comparados ao grupo controle, sendo que estes valores variaram de 3,28 (controle) e 4,34 a 4,76 nos tratamentos com probiótico, valores estes superiores ao do presente estudo. Segundo Cross (2002) tem sido demonstrado que os probióticos

favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune, apesar dos mecanismos pelos quais os probióticos estimulam a imunidade dos animais ainda não estarem esclarecidos. Segundo Coppola e Gil-Turnes (2004), bactérias do gênero *Bacillus* podem estimular a resposta imune e serem utilizadas como imunomoduladores. Esta habilidade das bactérias probióticas em modular a imunidade e aumentar o balanço microbiano de microrganismos entéricos comensais, oferece alternativa biologicamente efetiva para melhorar a saúde sem recorrer ao consumo de drogas alopáticas (Kailasapathy e Chin, 2000).

Os valores dos teores de Extrato Etéreo (EE) no músculo e fígado dos reprodutores encontram-se na Figura 5, mostrando que não houve diferença estatística entre o EE dos peixes alimentados com probiótico. No entanto, observa-se tendência de redução deste parâmetro no músculo e fígado dos peixes que receberam o probiótico na dieta. Os resultados das análises de lipídio do músculo avaliados foram superiores aos descritos por Arbeláez-Rojas *et al.* (2002) que observaram valores próximos de 4,0% de lipídios no músculo de matrinxãs com aproximadamente, 200g de peso, criados em regime semi-intensivo. No entanto, peixes na fase reprodutiva possuem em sua composição valores mais elevados de lipídio como fonte de reserva para a formação dos ovócitos.

A redução dos lipídios no músculo pode ser explicada pela redução de absorção do lipídio na dieta, pois, existe possível interação da bactéria probiótica com os sais biliares que reduzem a emulsificação desses e, conseqüentemente, a absorção do mesmo (Roos e Katian, 2000)

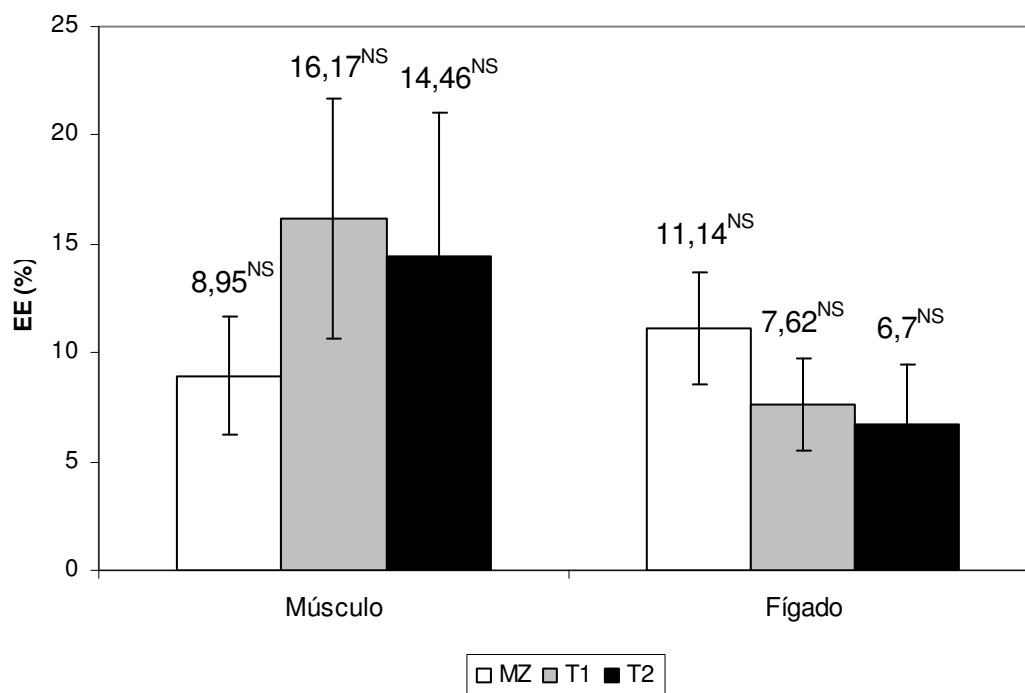


Figura 5 – Extrato etéreo (EE) de músculo e fígado de reprodutores de matrinxã, *Brycon amazonicus*, no Momento Zero (MZ) e ao final do experimento (base matéria-úmida).

Conclusão

- ✓ A dieta suplementada com probiótico melhora as taxas de fertilização e eclosão; diminui o estresse e melhora o sistema imunológico

Agradecimentos

A FAPESP pela bolsa concedida (07/50178-0) e auxílio para realização do projeto (08/05823-7).

Referências

- Aly, S.M., Ahmed, Y.A.G., Ghareeb, A.A.A. Mohamed, M.F. 2008 Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistense of tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunology*, 25: 128-136.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists 1984 Official Methods of Analysis. 12.ed. Washington, D.C., 1015p.
- Arbeláez-Rojas, G., Fracalossi, D., Fim, J.D.I. 2002 Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de cultivo intensivo, em igarapé, e semi-intensivo, em viveiros. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31 (3): 1059-1069.
- Campbell, T.W., Murru, F. 1990 An introduction to fish hematology. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 12 (4): 525-532.
- Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C. 2002 Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei:Characidae), at different densities. *Aquaculture International*, 10: 221-229.
- Coppola, M.M., Gil-Turnes, C. 2004 Efeito de probiótico na resposta imune *Ciência Rural*, 34 (4): 1297-1303.
- Cross, M.L. 2002 Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34 (4): 245-253.
- Dahlgren, B.T. 1980 The effects of three different dietary protein levels on the fecundity in the guppy, *Poecilia reticulata*. *Journal of Fish Biology*, 16: 83-97.
- Dias, D.C., De Stéfani, M.V., Ferreira, C.M., França, F.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Santos, A.A. 2009 Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research*, 40: 1-8 (DOI 10.1111/j.1365-2109.2009.02390.x).
- França, F.M., Dias, D.C, Teixeira, P.C., Marcantônio, A.S., Stéfani, M.V., Antonucci, A.M., Rocha, G.C., Ranzani-Paiva, M.J.T., Ferreira, C.M. 2008 Efeito do probiótico *Bacillus subtilis* no crescimento, sobrevivência e fisiologia de rãs-touro (*Rana catesbeiana*). *Boletim do Instituto de Pesca*, 34 (3): 403-412.

- Fuller, R. 1977 The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *British Poultry Science*, 18: 85-94.
- Fuller, R. 1989 Probiotics in man and animals: A review. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.
- Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C. 2007 Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, 38: 518-526.
- Guzmán, G.A. 1992 Aplicación de probióticos en la acuicultura. In: Suárez, L.E.C., Marie, D.R., Alfaro, R.M. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Universidade Autónoma de Nuevo León Monterrey: 332-337.
- Hoshiba, M.A., Gonçalves, F.D., Urbinati, E.C. 2009 Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura. *Acta Amazônica*, 39 (2): 445-452.
- Inooka, S., Uehara, S., Kimura, M. 1986 The effect of *Bacillus natto* on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens. *Poultry Science*, 65: 1217-1219.
- Inoue, L.A.K.A., Afonso, L.O., Iwama, G.K., Moraes, G. 2005 Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amazônica*, 35(2): 289 - 295
- Janini, P., Janini Filho, P. 1990 *Interpretação clínica do Hemograma*. 10^a ed., São Paulo: Sarvier, 625 p.
- Kailasapathy, K., Chin, J. 2000 Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, 78: 80-88.
- Kozasa, M. Probiotics for animal use in Japan. 1989 *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 8 (2): 517-531.
- Matushima, E.R., Mariano, M. 1996 Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Brazilian Journal of Veterinary Animal Science*, 33 (1): 5-10.
- Mendes, P.P. 1999 *Estatística aplicada à aqüicultura*. Recife: Bagaço, 265p.
- Morgan, J.D., Iwana, G.K. 1997 Measurements of stressed states in the field In: Iwana, G.W., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p. 247-270.

- Oliveira, M.N., Sivierl, K., Alegro, J.H.A., Saad, S.M.I. 2002 Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas*, 38 (1): 1-21.
- Ozawa, K., Yabu-Uchi, K., Yamanak, K. 1978 Antagonistic effects of *Bacillus natto* and *Streptococcus faecalis* on growth of *Candida albicans*. *Microbiology Immunology*, 23 (12), 1147-1156.
- Pankhurst, N.W., Van Der Kraak G. 2000 Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogenesis in rainbow trout in vivo, through the actions of cortisol. *Genetic Comparative Endocrinology*, 117: 225-237.
- Ranzani-Paiva, M.J. 1996 Células sangüíneas e contagem diferencial de leucócitos em pirapitinga-do-sul, *Brycon* sp, sob condições experimentais de criação intensiva. *Revista Ceres*, 43 (250): 685-695.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Silva-Souza, A. 2004 Hematologia de peixes Brasileiros In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M.L.P. *Sanidade de Organismos Aquáticos*, Varela, São Paulo. pp. 89-120.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Souza, A.T.S., Pavanelli, G.C., Takemoto, R.M., Eiras, A.C. 2000 Hematological evaluation in commercial fish species from the floodplain of the upper Paraná River, Brazil. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 22 (2): 507-513.
- Roberts, R.J. 1981 *Patologia de los peces*. Madrid: Mundi-Prensa, pp.366.
- Romagosa, E., Narahara, M.Y., Borella, M.I., Fenerich-Verani, N. 2001 Seleção e caracterização de fêmeas de matrinxã, *Brycon cephalus*, induzidas à reprodução. *Boletim do Instituto de Pesca*, 27(2): 139 – 147.
- Roos, N.M., Katian, M.B. 2000 Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *American Society for Clinical Nutrition*, 71: 405-411.
- Rosenfeld, G. 1947 Corante pancrônico para hematologia e citologia clínica. Nova constituição dos componentes do May Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memorias do Instituto Butantã*, 20: 329-334.
- Schrezenmeir, J., De Vrese, M. 2001 Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 361–364.
- Silva, J.R.M.C., Porto-Neto, L.R., Borges J.C.S., Jensch-Junior B.E. 2005 Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothernia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0°C. *Polar Biology*, 28 (4): 326-328.

- Silva, J.R.M.C., Staines, N.A., Hernandez-Blazquez, F.J., Porto-Neto, L.R., Borges J.C.S. 2002 Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of *Notothenia coriiceps*. *Journal of Fish Biology*, 60: 466-478.
- Small, B.C. 2004 Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish. *Journal of Fish Biology*, 64: 589-596.
- Tavares-Dias, M., Affonso, E.G., Oliveira, S.R., Marcon, J.L., Egami, M.I. 2008 Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. *Acta Amazônica*, 38 (4): 799-806.
- Tavares-Dias, M., Bozzo, F.R., Sandrin, E.F.S., Campos-Filho, E., Moraes, F.R. 2004 Células sanguíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenosomática de carpa comum, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) na primeira maturação gonadal. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 26 (1): 73-80.
- Tavares-Dias, M., Frascá-Scorvo, C.M.D., Moraes, F.R., Campos-Filho, E. 1999 Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Parâmetros eritroleucométricos, trombométricos e glicemia do matrinxã *Brycon cephalus* Günther, 1869 (Osteichthyes:Characidae). *Ars Veterinária*, 15:149-153.
- Tavares-Dias, M., Melo, J.F.B., Moraes, G., Moraes, F.R. 2002 Características hematológicas de teleósteos brasileiros: Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciência Rural*, 32 (4): 693-698.
- Urbinati, E.C., Carneiro, P.C. 2001 Metabolic and hormonal responses of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) to transport stress under influence of benzocaine. *Journal Aquaculture Tropical*, 16 (1): 75-85.
- Watkins, B.A., Miller, B.F. 1983 Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. *Poultry Science*, 61: 1772-1779.
- Wells, R.M.G., Pankhurst, N.W. 1999 Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein a stress indicator in fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30: 276-284.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1997 The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77:591-625.
- Zaniboni-Filho, E., Reynalte-Tataje, D., Weingartner, M. 2006 Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19 (2): 233-240.

- Zar, J.H. 1999 *Biostatistical Analysis*. 3rd. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA, 662 p.
- Zhou, X., Tian, Z., Wang, Y., Li, W. 2009 Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiology Biochemistry*, 1742: 1573-1586.

CAPITULO 3



**Probiótico bioencapsulado em *Artemia salina* na dieta de larvas de
matrinxã *Brycon amazonicus***

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico de larvas de matrinxã, *Brycon amazonicus*, alimentadas com probiótico composto de *Bacillus subtilis* bioencapsulado em *Artemia salina*, em diferentes doses. Os náuplios foram divididos em seis tratamentos, sendo: T₁ = controle (sem adição de probiótico), T₂ = 2,5 g de probiótico, T₃ = 5,0 g de probiótico, T₄ = 7,5 g de probiótico, T₅ = 10,0 g de probiótico e T₆ = 12,5 g de probiótico. As doses utilizadas foram adicionadas por litro de cultivo 4h antes da alimentação das larvas. Após o período de sete dias, as larvas começaram a se alimentar de ração comercial farelada (40%PB) e o probiótico foi adicionado nas mesmas doses na ração. Os resultados mostraram heterogeneidade em relação ao crescimento, com aumento do canibalismo, indicando que na fase larval este processo não influenciou o desempenho e crescimento dos peixes.

Palavra-chave: *Bacillus subtilis*, larvicultura, nauplios

Abstract

The aim of this study was to evaluate the performance of matrinxã larvae, *Brycon amazonicus* fed with probiotic compound of bioencapsulated *Bacillus subtilis* in brine shrimp at different doses. The nauplii were divided into six treatments, T1 - control (without probiotic), T2 - 2.5 g of probiotic, T3 - 5.0 g of probiotic, T4 - 7.5 g of probiotic, T5 - 10, 0 g of probiotic and T6 - 12.5 g of

the probiotic. The doses used were added per liter of culture 4 h before feeding larvae, following the method described by Lomba (2001). After seven days, the larvae began to feed on commercial feed (40% CP). At this stage the probiotic was added in equal doses in the diet. The results shown that there were no significant differences among treatments and matrinxã larvae showed lower survival rates and heterogeneity in relation to growth.

Key word: *Bacillus subtilis*, larvae, nauplii

Introdução

A artemia é alimento utilizado na larvicultura de peixes marinhos e também em larviculturas de água continental, sendo sua maior vantagem a praticidade na obtenção de náuplios e metanáuplios, após a eclosão de cistos (Lim et al., 2003). O náuplio é mais eficiente no fornecimento de nutrientes para as larvas de peixes devido a suas maiores reservas endógenas de energia. Por serem filtradores de substâncias adicionadas na água são considerados bioencapsuladores (Sorgeloos et al., 2001).

O canibalismo é comportamento natural das espécies de peixes, mas sua intensidade vai depender de fatores ambientais como, densidade de estocagem e disponibilidade de alimento (Kestemont et al., 2003). O matrinxã é predador voraz e logo no início do seu desenvolvimento apresenta alto grau de canibalismo (Gomes et al., 1998). Leonardo et al. (2008) observaram elevada taxa de canibalismo em experimentos com larvas de matrinxã, nos primeiros dias de vida, atingindo até 60% das larvas. Por causa deste canibalismo, estes autores enfatizaram que o maior crescimento das larvas predadoras é explicado pelo alto

valor nutritivo das presas que estas ingeriram e não pelo fato da diminuição da densidade de larvas, o que acaba acentuando ainda mais a predação.

Segundo Senhorini et al. (1998), em estudos na fase larval do matrinxã, o período crítico ocorre no momento da transição do alimento endógeno para o exógeno e este comportamento foi observado nas incubadoras, quando as larvas tinham consumido menos de $\frac{1}{4}$ da reserva vitelínica e apresentavam apenas 32 a 36 horas de idade. Neste mesmo estudo a alimentação inicial das larvas influenciou o crescimento e sobrevivência final da larvicultura. Em outro estudo com larvas de matrinxã quando mantidas em aquários não foi observado efeito da densidade de estocagem de 1,5 a 13 larvas por litro no crescimento e sobrevivência. Por outro lado, estudos com larvas de outras espécies de peixes mostraram que a proporção de 1:5 na quantidade de predador e presas foi mais adequado (Ceccarelli e Volpato, 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico de larvas de matrinxã, *Brycon amazonicus*, alimentadas com probiótico composto de *Bacillus subtilis* bioencapsulado em *Artemia salina* em diferentes doses.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório do Pólo Regional do Vale do Ribeira – APTA – SAA, em Pariquera-Açu, SP. Para isso foram utilizadas 24 caixas plásticas com capacidade de 20L (Figura 1), cuja densidade de estocagem foi de 10 larvas L^{-1} totalizando 200 larvas por caixa. Foram empregados seis tratamentos, sendo: T_1 = controle (sem adição de probiótico), T_2 = 2,5 g de probiótico, T_3 = 5,0 g de probiótico, T_4 = 7,5 g de probiótico, T_5 = 10,0 g de probiótico e T_6 = 12,5 g de probiótico com quatro réplicas simultâneas.

Inicialmente, o probiótico foi administrado por enriquecimento do alimento vivo (*Artemia salina*) (Figura 2). Os cistos de artêmia foram hidratados por uma hora em água doce, depois incubados por 24 horas em água salgada, com aeração e iluminação constante. Após a eclosão, os náuplios foram separados dos cistos e colocados por 12 horas em recipientes com água salgada, aeração, emulsão enriquecedora e 4 horas antes da alimentação as respectivas doses de probióticos foram colocadas segundo metodologia descrita por Lomba (2001). Os náuplios foram fornecidos para as larvas de matrinxã em cinco alimentações diárias: 8:00, 11:00, 14:00, 17:00, 20:00 horas, sendo que somente na última alimentação foi fornecido o dobro de náuplios em relação aos demais. Cada aquário recebeu inicialmente 40 mil náuplios por dia, com aumento progressivo de até 122 mil náuplios por dia. O controle recebeu apenas *A. salina*.

Após 4 horas da suplementação de probiótico nas artemias eram verificadas sob microscopia de luz comum se as mesmas continham bactérias no trato digestório. O mesmo procedimento era realizado no grupo controle para verificar se não tinha ocorrido contaminação pelas bactérias probióticas.

Após o período de sete dias, a alimentação das larvas foi gradativamente substituída por ração comercial farelada (40%PB), com probiótico (em pó) adicionado nas mesmas doses, mas diretamente à ração e homogeneizado. Foram fornecidos 10% peso vivo de ração por larva, cinco vezes ao dia.

Para determinação dos parâmetros zootécnicos foram realizadas coletas de larvas de matrinxã a cada três dias quando foram aferidos o peso (mg), comprimento total (mm), taxa de crescimento específico (CE (% por dia) = $100 \times \frac{\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}}{\text{dias}}$), segundo Jobling (1994). A

sobrevivência final de larvas (%) foi calculada a partir da seguinte fórmula: $S(\%) = (NF/NI) \times 100$ (NI = número inicial de larvas; NF = número final de alevinos), segundo Senhorini et al. (1998).



Figura 1 – Disposição das caixas, no laboratório de larvicultura utilizado durante a realização do experimento com matrinxã, *B. amazonicus* suplementados com probiótico



Figura 2 – Enriquecimento de *Artemia salina* com probióticos durante a realização do experimento com matrinxã, *B. amazonicus*

Também foram avaliados, a cada três dias, os parâmetros físicos e químicos da água das caixas como: pH, temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica.

Para verificar a diferença entre as médias dos tratamentos foi realizada análise descritiva das variáveis em termos de seus valores de tendência central e dispersão (Berquó et al., 1981). Foi realizado o teste de Bartlett's para verificar a homocedasticidade e normalidade dos dados e o teste de Tukey para verificar a diferença entre os tratamentos (Zar, 1999).

Resultados e discussão

Os parâmetros físicos e químicos da água entre os tratamentos e ao longo do experimento não apresentaram diferenças que pudessem interferir nos resultados obtidos, pois os mesmos permaneceram dentro do limite estabelecido para conservação da vida aquática (Sipaúba-Tavares, 1995) (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão das variáveis físicas e químicas da água durante o experimento

Tratamentos	pH	T(°C)	Oxigênio Dissolvido		Condutividade. Elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
			(mg L ⁻¹)	(%Sat)	
T ₁	8,00±0,17	29,2±2,25	6,24±0,40	81,13±5,61	201,67±6,72
T ₂	7,96±0,14	29,2±2,32	5,82±0,59	75,88±7,38	209,88±2,10
T ₃	7,93±0,11	29,2±2,29	6,05±0,69	78,68±9,39	202,42±9,06
T ₄	8,01±0,15	29,2±2,34	6,26±0,52	81,92±7,73	203,75±10,75
T ₅	7,99±0,14	29,2±2,41	6,18±0,51	80,68±7,43	203,67±10,08
T ₆	7,98±0,16	29,2±2,34	6,04±0,77	78,82±9,53	197,42±22,44

Os valores em ganho de peso obtidos durante o experimento estão apresentados na Tabela 2 e Figura 3, sendo que os mesmos não apresentaram diferenças significativas. Pode-se observar que os peixes do T₃ (5,0 g L⁻¹ de cultivo de *A. salina* ou 5,0 g Kg⁻¹ de ração) apresentaram médias de peso superiores quando comparado com os animais dos outros tratamentos. Nesta fase de larvicultura, o matrinxã mostrou heterogeneidade em relação ao crescimento nos tratamentos e baixa sobrevivência (Tabela 3) evidenciando que a espécie não apresentou bom desempenho em alta densidade de estocagem, quando mantidas em pequenos volumes de água no laboratório.

Tabela 2 – Médias e desvios padrão, peso inicial (Pi), peso final (Pf), comprimento inicial (Ci), comprimento final (Cf), ganho de peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE) sobrevivência (%) e canibalismo (%) ao longo do experimento com matrinxã, *B. amazonicus* alimentados com probióticos.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Pi (mg)	2,37 ± 1,19	2,37 ± 1,19	2,37 ± 1,19	2,37 ± 1,19	2,37 ± 1,19	2,37 ± 1,19
Pf (mg)	45,79 ± 30,48 ^{ab}	46,08 ± 33,62 ^{ab}	72,74 ± 51,68 ^a	49,84 ± 37,09 ^{ab}	31,70 ± 33,56 ^b	50,56 ± 34,26 ^{ab}
Ci (mm)	2,37 ± 1,19	2,37 ± 1,19	2,37 ± 1,19	2,37 ± 1,19	2,37 ± 1,19	2,37 ± 1,19
Cf (mm)	18,57 ± 1,35	18,87 ± 2,06	19,62 ± 3,64	17,40 ± 1,97	18,13 ± 2,42	17,71 ± 1,64
GP (mg)	43,42 ^{ab}	43,71 ^{ab}	70,37 ^a	47,47 ^{ab}	29,33 ^b	48,19 ^{ab}
TCE (%/dia)	1,43	1,43	1,65	1,47	1,25	1,48
Sobrevivência	3,61	4,86	3,61	5,28	2,78	4,17
Canibalismo	96,39	95,14	96,39	94,72	97,22	95,83

T₁ - controle (sem adição de probiótico); T₂ - 2,5 g de probiótico; T₃ - 5,0 g de probiótico; T₄ - 7,5 g de probiótico; T₅ - 10,0 g de probiótico; T₆ - 12,5 g de probiótico; Letras iguais na linha não diferem significativamente;

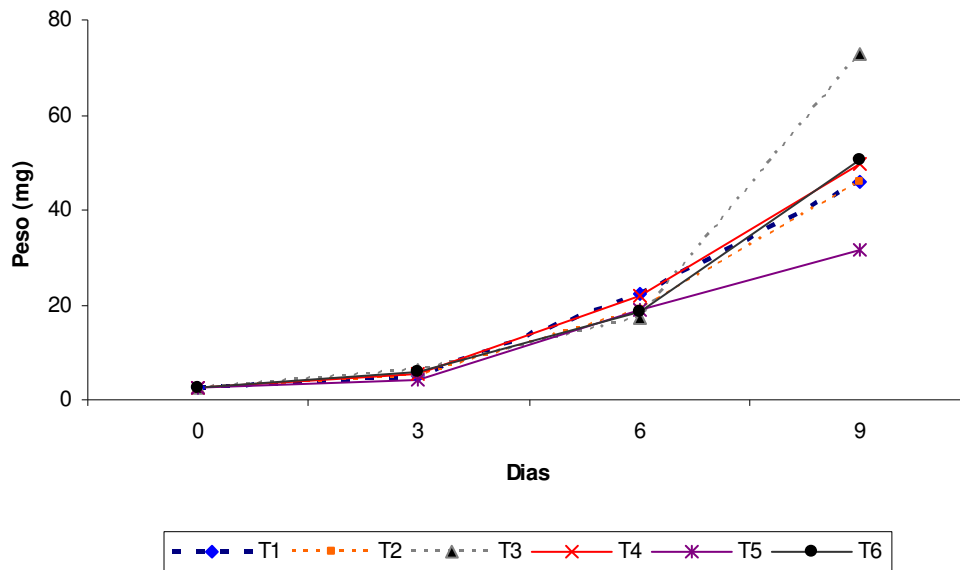


Figura 3 – Valores médios de peso das larvas de matrinxã, *Brycon amazonicus* alimentados com probiótico em diferentes doses

Segundo Gomes *et al.* (1998), larvas de matrinxã mantidas em altas densidades de estocagem apresentaram redução de crescimento em experimentos conduzidos em tanques de terra. Pode-se observar que as larvas do T₃ (5g.kg⁻¹) apresentaram maiores ganhos em peso e taxas de crescimento específico embora esta diferença não tenha apresentado valores significativos.

O comportamento de canibalismo das larvas foi descrito por Smith e Reay (1991) em 36 famílias de peixes. Trabalhando com larvas de matrinxã, Leonardo *et al.* (2008) observaram taxa de canibalismo variando de 50 a 60%, valores esses inferiores aos encontrados no presente trabalho. Katavic *et al.* (1989) atribuíram o canibalismo à alimentação inadequada, pouca frequência de alimentação e alta densidade de estocagem. No presente estudo a alimentação foi adequada na fase inicial de criação sendo ofertada a cada 3 horas, portanto, descartando estes dois fatores (alimentação inadequada e baixa frequência alimentar) como causadores do alto índice de canibalismo. A alta densidade de

estocagem em caixas provavelmente provocou este elevado índice de canibalismo. Segundo Kestemont et al.(2003) o crescimento heterogêneo inicial induz ao canibalismo em que os peixes maiores predam os menores.

Experimentos realizados com rã-touro, *Rana catesbeiana*, testando dois probióticos comerciais mostraram que os mesmos induziram os melhores índices zootécnicos (Dias *et al.*, 2008). Em girinos de *Rana catesbeiana*, recém eclodidos, suplementados com quatro probióticos comerciais, França (2007) observou maior mortalidade nos animais do controle e com relação ao ganho de peso os diferentes tratamentos não apresentaram diferença.

Diante do exposto, acredita-se que muito ainda tem que ser pesquisado no que tange a larvicultura de espécies de peixes migradores.

Conclusões

O probiótico não favoreceu o desempenho de matrinxãs, *B. amazonicus* em alta densidade de estocagem.

Referências

- Berquó, E.S., Souza, J.M.P., Gotlieb, S.L.D. 1981 *Bioestatística*. São Paulo: EPU. 185p.
- Ceccarelli, P.S., Volpato, G.L. 2001 Efeitos da densidade e proporção de presas consorciadas no crescimento e sobrevivência de larvas de matrinxã (*Brycon cephalus*). *Boletim Técnico do CEPTA*, 14:1-18.
- Dias, D. C., Stefani, M.V., Ferreira, C.M., Franca, F.M. 2008 Uso de probiótico em ração de rã-touro, *Rana catesbeiana*: desempenho produtivo. *Archivos de Zootecnia*, 57: 449-455.
- França, F.M. 2007 *Efeitos da utilização de probióticos no desempenho, resposta imune e hematológica de girinos e imagos de rãs-touro (Rana catesbeiana)*.

- Dissertação programa de pós-graduação em aquicultura e pesca do Instituto de Pesca. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/dissertacao07.pdf>
- Gomes, L.C., Baldisserotto, B., Senhorini, J.A. 1998 Influência da densidade de estocagem na produtividade de larvas do matrinxã *Brycon cephalus* (Pisces, Characidae) em tanques. *Boletim Técnico do CEPTA*, 11: 1-12.
- Jobling, M. 1994 *Fish bioenergetics*. London: Chapman e Hall, 294 p.
- Katavic, I., Jug-Dujakovic, J., Glamuzina, B. 1989 Cannibalism as a factor affecting the survival of intensively culture sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fingerlings. *Aquaculture*, 77:135-143.
- Kestemont, P.S., Jourdan, M., Houbart, C., Merlard, M., Paspatis, P., Fortaine, A., Cuvier, M., Baras, E. 2003 Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae, biotic and abiotic influences. *Aquaculture*, 227: 333-356.
- Leonardo, A.F.G., Hoshiba, M.A., Senhorini, J.A., Urbinati, E.C. 2008. Canibalismo em larvas de matrinxã, *Brycon cephalus*, após imersão dos ovos a diferentes concentrações de triiodotironina (T₃). *Boletim do Instituto de Pesca*, 34 (2): 231–239.
- Lim, L.C., Dhert, P., Sorgeloos, P. 2003 Recent developments in the application of live feeds in the freshwater ornamental fish culture. *Aquaculture*, 227: 319-331.
- Lomba, R.M.P. 2001 *Aplicación de bacterias lácticas nos sistemas de cultivo larvário de peixes*. 74f. Tese de licenciatura – Instituto de Investigacións Mariñas, Universidade de Vigo.
- Senhorini, J.A., Mantelatto, F.L.M., Casanova, S.M.C. 1998 Growth and survival of larvae of the amazon species “matrinxã”, *Brycon cephalus* (Pisces, Characidae), in larviculture tanks of Brasil. *Boletim Técnico do CEPTA*, 11:1-79.
- Sipaúba-Tavares, L.C. 1995 *Limnologia aplicada à aqüicultura*. São Paulo: UNESP, 66 p. (Boletim técnico, n. 1).
- Smith, C., Reay, P. 1991 Cannibalism in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1:16-29.
- Sorgeloos, P., Dhert, P., Candreva, P. 2001 Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200: 147-159.
- Zar, J.H. 1999 *Biostatistical Analysis*. 3rd. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA, 662 p.

CAPITULO 4



Probiótico composto de *Bacillus subtilis* no desempenho produtivo de matrinxã, *Brycon amazonicus*, mantidos em tanques-rede

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito do probiótico comercial composto de *Bacillus subtilis* no desempenho produtivo e composição química corporal de matrinxã, *Brycon amazonicus*, mantidos em tanques-rede. O produto foi adicionado na ração comercial (32% PB, 7% FB, 6,5% EE) nas doses de 5 e 10 g kg⁻¹ acrescido de 2% de óleo de soja, para proteção do pelete com probiótico. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos e quatro réplicas simultâneas. Foram calculados o ganho em peso (GP), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), biomassa final (BF) e também analisados o extrato etéreo (EE) do fígado e músculo e a composição centesimal do peixe inteiro. Os resultados mostraram que os animais do controle (T1) apresentaram, a partir da 2ª biometria, médias de peso inferiores o que foi mantido até o final do experimento. Os peixes dos tratamentos que receberam o probiótico apresentaram-se 7,17 e 9,77% maior no peso final em relação ao tratamento controle, respectivamente, para 5 e 10g kg⁻¹. O EE dos músculos dos peixes alimentados com probiótico apresentaram ligeira diminuição em sua porcentagem aos 42 dias de alimentação, quando comparados com o controle. Aos 84 dias de experimento, quando comparados o controle com o tratamento de 5g de probiótico pode-se observar aumento na porcentagem de EE e no tratamento de 10g diminuição nos valores. O probiótico *Bacillus subtilis*, suplementado na dieta de matrinxã, promove aumento no ganho de peso e

consequentemente na TCE e melhora na CAA. A dose de 10g de probiótico por quilo de ração reduz a deposição de lipídios no músculo.

Palavra chave: Produtividade, promotor de crescimento, tanque-rede

Abstract

The aim of the experiment was to evaluate the effect of commercial probiotic compound of *Bacillus subtilis* on growth performance and body composition of matrinxã, *Brycon amazonicus*, kept in cages. The product was added to the commercial feed (32% CP, 7% CF, 6,5% EE) at doses of 5 and 10 g kg⁻¹ plus 2% soybean oil to protect the pellets with probiotic. The experimental design was completely randomized design with 3 treatments and 4 replicates at a time. Weight gain (WG), feed conversion ratio (FCR), specific growth rate (SGR), final biomass (FB) were calculated and ether extract (EE) of the liver and muscle and composition of whole fish were analyzed. The results showed that animals in the control group (T1) showed, from the 2nd biometrics, means of weight remained below that until the end of the experiment. The fish that received the probiotic had 7.17 and 9.77% higher final weight compared to control treatment, respectively for 5 and 10 g kg⁻¹. EE muscles of fish fed probiotic showed slightly decrease in their percentage in 42 days of feeding, compared with the control. At 84 days of experiment, comparing control treatment with 5g of probiotic, was observed an increase in the percentage of EE and treatment of 10g decline in values. The probiotic *Bacillus subtilis* supplemented in the diet promotes an increase in weight gain and hence improves the SGR and the FCR. A 10g dose of probiotic per kg of diet reduces lipid deposition in muscle.

Keywords: Productivity, growth promoter, cage

Introdução

Nos últimos anos tem-se intensificado o número de pesquisas voltadas a utilização de alimentos funcionais e de substâncias químicas que promovam o aumento da eficiência alimentar e da taxa de crescimento dos peixes (Oliveira *et al.*, 2002), aumento da resistência do animal às doenças infecciosas (Barbosa *et al.*, 2005) e a redução do uso de antibióticos como promotores de crescimento (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008).

Dentre os alimentos funcionais, ou seja, alimentos que fornecem a nutrição básica e a melhora da saúde dos peixes encontram-se os probióticos, que são suplementos alimentares compostos de microorganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro, por meio do equilíbrio da microbiota intestinal (Fuller, 1989). Em sua maioria são produtos preparados com *Lactobaccillus acidophillus*, *Streptococcus faecium*, *Bacillus subtilis* e, em alguns casos, leveduras (Verschuere *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008). Segundo Verschuere *et al.* (2000) probióticos podem ser definidos como microorganismos vivos adjuvantes que tem efeito benéfico no hospedeiro, modificando a relação microorganismo / hospedeiro ou a própria comunidade microbiana, por propiciar melhora na absorção dos alimentos ou aumentando seu valor nutricional. Além disso, esses benefícios podem ser pela melhora da resposta do hospedeiro às doenças ou melhorando a qualidade da microbiota.

O mecanismo de ação dos probióticos pode ocorrer por exclusão competitiva (Ozawa *et al.*, 1978; Vine *et al.*, 2004), competição por locais de adesão no aparelho digestório (Watkins e Miller, 1983; Yan *et al.*, 2002), por estímulo da imunidade (Inooka *et al.*, 1986; Son *et al.* 2009), maior produção de ácido lático (Fuller, 1977), diminuição da produção de amins tóxicas, aumento

da disponibilidade de aminoácidos nos locais de absorção (Kozasa, 1989), economia de energia e também pelo aumento da disponibilidade de vitaminas e enzimas (Fuller, 1989).

A digestão dos alimentos pode ser afetada devido ao funcionamento ideal das células das vilosidades intestinais que absorvem os nutrientes com maior eficiência quando bactérias benéficas estão presentes, como observado em frangos de corte (Silva, 2008) e peixes (Hisano *et al.*, 2006). Existe também, a possibilidade das bactérias aeróbicas associadas ao trato gastrintestinal de peixes produzirem enzimas digestivas que facilitam a digestão do alimento (Bairagi *et al.*, 2002).

O uso convencional de antibióticos, como promotores de crescimento, tem limitado o sucesso na prevenção e cura de doenças de organismos aquáticos (Subasinghe, 1997). No entanto, os testes com probióticos na aquicultura vêm apresentando resultados promissores na criação de larvas, pós-larvas e juvenis de peixes, moluscos, crustáceos (Planas e Cunha, 1999; Verschuere *et al.*, 2000; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008) e rãs-touro, *Rana catesbeiana* (Dias *et al.*, 2008) sendo possível substituir os antibióticos como promotor de crescimento. Os gêneros dos probióticos mais utilizados com sucesso na criação de peixes de água continental são as bactérias *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* e leveduras *Saccharomyces* (Verschuere *et al.* 2000; Wang *et al.*, 2008; Aly *et al.*, 2008, Lara-Flores *et al.*, 2003; Meurer *et al.*, 2006 e 2008).

O *Bacillus subtilis* tem sido testado em peixes como bactéria probiótica e mostrou capacidade inibitória *in vitro* do crescimento de *Aeromonas hydrophila* e quando suplementado na alimentação da tilápia-do-Nilo foi eficaz como promotor de crescimento, além de aumentar a imunidade (Aly *et al.*, 2008).

Objetivou-se com este experimento avaliar o efeito do probiótico comercial composto de *Bacillus subtilis* no desempenho produtivo e na composição química corporal de matrinxã *Brycon amazonicus* mantidos em tanque-rede.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Pólo Regional do Vale do Ribeira – APTA, SAA, no município de Pariquera-açu – SP/Brasil. Foram utilizados 960 matrinxãs, *B. amazonicus*, com peso médio $39,83 \pm 8,18$ g e comprimento médio $14,6 \pm 1,0$ cm, divididos em 12 tanques-rede de $2,7\text{m}^3$ ($1,5 \times 1,5 \times 1,2\text{m}$) instalados em três viveiros escavados de 600 m^2 cada (espelho d'água), profundidade média de 1,50 m, vazão de 15 L min^{-1} (Figura 1). Os tratamentos foram constituídos por: T1 = Controle (ração 32% PB, 7% FB, 6,5% EE) sem adição de probiótico, T2 = 5g de probiótico kg^{-1} de ração e T3 = 10g de probiótico kg^{-1} de ração. O probiótico comercial contendo 10^9 UFC g^{-1} (Unidades Formadoras de Colônias) em pó (liofilizado) foi homogenizado na ração em misturador e adicionado 2% de óleo de soja (inclusive na ração do controle) para incorporação do probiótico ao pelete. As rações testes foram previamente pesada e fornecida duas vezes ao dia (8:00 e 16:00 horas), inicialmente 7% do peso vivo por dia e gradativamente reduzindo de acordo com a observação do consumo dos peixes. Foram realizadas análises microbiológicas das rações todas as vezes que eram feitas as misturas para verificar a dose de probiótico adicionado na ração. Também foram realizadas análises de lipídio na ração para confirmar que a quantidade de óleo adicionado não desbalanceava o alimento.



Figura 1 – Preparação dos tanques-rede nos viveiros escavados para implantação do experimento de probiótico com *B. amazonicus*

Foram realizadas biometrias (peso e comprimento) a cada 21 dias e após 84 dias de experimento para avaliar ganho em peso (GP), taxa de crescimento específico (TCE), sobrevivência (S), conversão alimentar aparente (CAA) e biomassa inicial (Bi) e final (Bf) (para cálculo da Bf foram somados os peixes abatidos nas biometrias intermediárias mais o peso final de todos os peixes). No mesmo período, foram coletados oito peixes de cada tratamento que foram eutanasiados por aprofundamento do estado anestésico e dissecação medular para coleta do fígado e de músculo (dorsal superior a 2,0 cm do opérculo esquerdo). Os fragmentos foram mantidos a -10°C e, posteriormente, enviados para análises de extrato-etéreo. Também foram coletados dez peixes inteiros de cada parcela para as análises de matéria-seca (105°C até peso constante), proteína-bruta (método de Kjeldhal), extrato-etéreo (método de Soxhlet) e cinza (mufla 550°C), segundo AOAC (1984) no Laboratório de Análises em Nutrição Animal (LANA) UNESP/FCAVJ – Jaboticabal-SP.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados segundo teste de Tukey. Os dados em porcentagem foram previamente transformados pela fórmula $y = \arcseno \sqrt{x}$ (Mendes, 1999), para posterior avaliação.

Resultados e Discussão

Não houve diferenças significativas no peso final (PF), biomassa final (Bf), comprimento final (Cf) e sobrevivência (S) (Tabela 1). O GP dos peixes alimentados com probióticos foi crescente conforme o aumento da concentração de probiótico.

Os valores de CAA dos matrinxãs apresentaram diferenças entre tratamentos ($P < 0,05$) sendo a melhor nos animais do T2 (5g/kg) e não diferiu dos peixes do T3 (10g/kg). A TCE dos matrinxãs do T2 não diferem dos valores dos peixes dos outros tratamentos (T1 e T3), mas os peixes do T3 apresentaram valores ligeiramente superiores em relação ao T1.

Tabela 1 – Média e desvio padrão do peso inicial individual (PII), peso final individual (PFI), biomassa inicial (BI), biomassa final (BF), ganho em peso individual (GPI), comprimento inicial (Ci), comprimento final (Cf), taxa de crescimento específico (TCE), conversão alimentar aparente (CAA) e sobrevivência (S) de *B. amazonicus*, após 84 dias de alimentação com ração suplementada ou não com probiótico composto de *Bacillus subtilis*

	PII (g)	PFI (g)	BI (kg)	BF (kg)	GP (g)	Ci (cm)	Cf (cm)	TCE (%)	CAA	S (%)
T1	42,24±5,89	235,29±5,89	3,38±0,14	8,46±0,61	193,04±4,62 ^b	14,60±1,00	24,40±1,12	2,02±0,03 ^b	2,38±0,11 ^b	91,11±4,19
T2	43,40±2,27	253,11±10,63	3,47±0,18	7,68±0,95	209,71±13,92 ^{ab}	14,60±1,00	25,10±1,19	2,08±0,06 ^{ab}	2,09±0,13 ^a	88,75±3,19
T3	40,80±1,24	256,21±10,67	3,41±0,99	7,97±0,95	215,41±10,62 ^a	14,60±1,00	25,40±1,16	2,13±0,06 ^a	2,21±0,07 ^{ab}	88,13±3,13

Letras iguais na coluna não diferem significativamente segundo teste Tukey (P<0,05); T1 = controle; T2 = 5g probiótico kg⁻¹ ração; T3 = 10g probiótico kg⁻¹ ração

Os parâmetros avaliados mostraram que o probiótico proporcionou aumento nos valores de crescimento aumentando a eficiência de transformação do alimento em peixe. Os motivos para tal melhora nos parâmetros zootécnicos podem ser devido ao aumento da disponibilidade de aminoácidos nos locais de absorção (Kozasa, 1989) e também pelo aumento da disponibilidade de vitaminas e enzimas (Fuller, 1989)

Os valores da CAA apresentaram diferenças entre tratamentos ($P < 0,05$), sendo que nos peixes do grupo T2 foi observada a melhor taxa diferindo do T1, valores esses mais elevados que os descritos por Brandão *et al.* (2005) que testaram densidades de estocagem do matrinxã em tanques-rede, obtendo valores médios de 1,3 para CAA e peso final de aproximadamente 70g. Essa diferença entre os valores encontrados por estes autores podem ser devidos à fase de desenvolvimento que os animais se encontravam (fase juvenil). Utilizando-se o índice de comparação relativa observa-se que o probiótico promoveu melhora da CAA de 6,30 (T2) e 7,14% (T3) quando comparado ao T1. Os valores de biomassa final não apresentaram diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre tratamentos.

Em relação à sobrevivência, não houve diferença significativa entre os tratamentos. No entanto, observou-se menor valor numérico dos peixes alimentados com probióticos no final do experimento. Embora esta maior mortalidade tenha ocorrido nos animais alimentados com ração suplementada com probiótico, esses peixes apresentaram GP superior.

Na Figura 2 pode-se observar que os animais do T1 apresentaram a partir da 2ª biometria peso inferior, permanecendo este comportamento até o final do experimento. As análises estatísticas mostraram que a dose de 5 g kg^{-1} foi suficiente para promover peso individual médio superior, à partir da segunda biometria. Provavelmente, no período de 21 dias (primeira biometria), não houve tempo suficiente para a atuação do probiótico como promotor de crescimento. Os tratamentos que receberam o probiótico

apresentaram 7,17 e 9,77% maior no peso final em relação ao tratamento controle, respectivamente, para 5 e 10 g kg⁻¹.

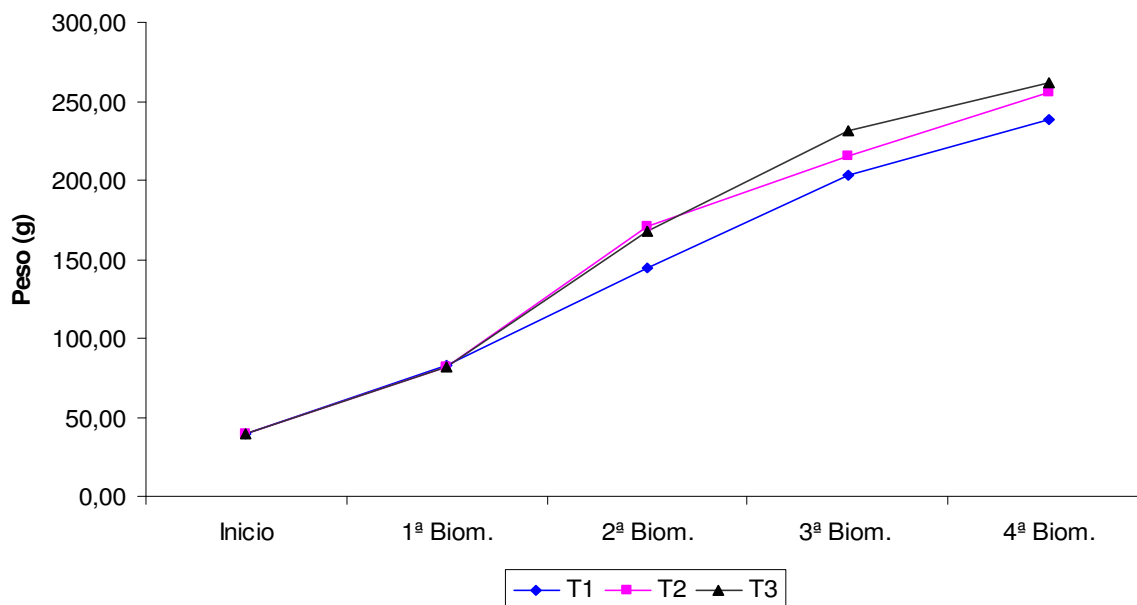


Figura 2 – Pesos médios de matrinxãs, *Brycon amazonicus* alimentados com ração suplementada ou não com probiótico composto de *Bacillus subtilis*.
(T1 = controle; T2 = 5g probiótico kg⁻¹ ração; T3 = 10g probiótico kg⁻¹ ração)

Dias *et al.* (2008), testando dois probióticos comerciais nas mesmas doses do presente trabalho em rãs touro, verificaram diferenças significativas entre os animais tratados com probióticos quando comparados com o controle. Entretanto, não foram observadas diferenças entre as doses e os produtos utilizados. França *et al.* (2008) testando o mesmo probiótico em imagos de rãs-touro com três doses, notaram maior ganho em peso nos animais tratados com probiótico nas diferentes doses, mas essa diferença também não se mostrou significativa. Lara-Flores *et al.* (2003), utilizando dois tipos de probióticos (*Saccharomyces cerevisiae* e mistura de *Streptococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*) em um nível de inclusão 0,1% (1g kg⁻¹) para alevinos de tilápia, com três semanas de idade, concluíram que o *Saccharomyces*

cerevisiae proporcionou melhor desempenho após um período de nove semanas de cultivo.

Nas análises de EE do músculo (Figura 3) na 1ª coleta (42 dias de alimentação), pode-se observar diminuição nos valores desta análise quando comparados os valores encontrados nos dos peixes do T1 com os demais tratamentos, sendo essa diferença significativa ($P=0,008$). Entretanto, na 2ª coleta (final do experimento) pode-se notar redução significativa da porcentagem de EE nos peixes do T3 em relação ao T1 e T2 ($P=0,005$).

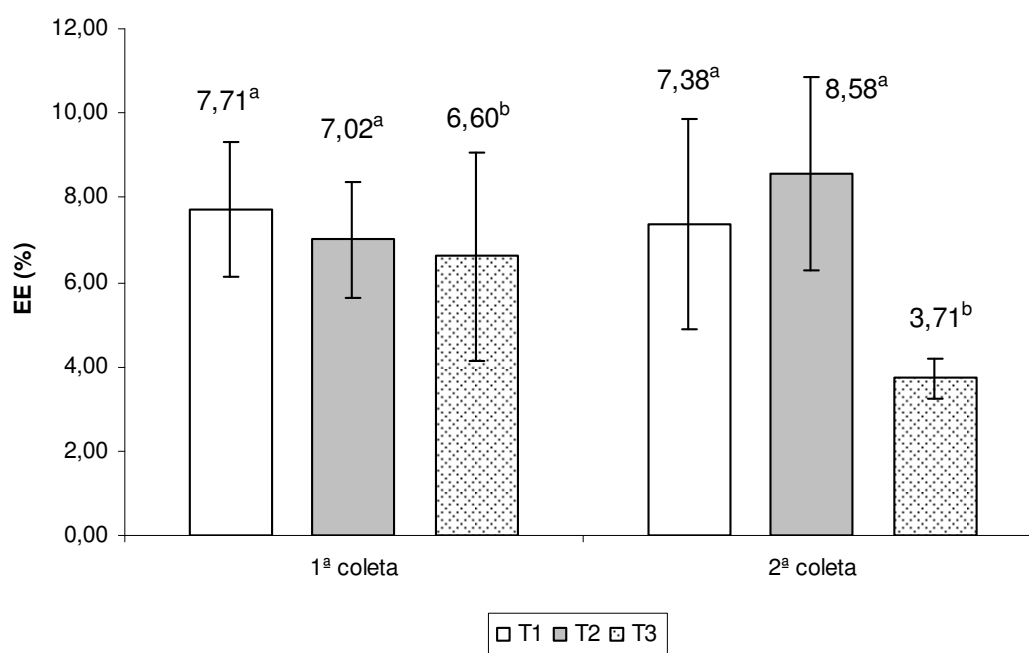


Figura 3 – Média percentual de extrato etéreo (EE) do músculo de matrinxã, *Brycon amazonicus* após 42 (1ª coleta) e 84 dias (2ª coleta) de alimentação com probiótico criados em tanques-rede (base matéria-úmida).
(T1 = controle; T2 = 5g probiótico kg⁻¹ ração; T3 = 10g probiótico kg⁻¹ ração)

A redução dos lipídios no músculo pode ser explicada pela redução de absorção do lipídio na dieta, pois, existe possível interação da bactéria probiótica com os sais biliares que reduzem a emulsificação desses e, conseqüentemente, a

absorção do mesmo (Roos e Katian, 2000). As bactérias probióticas possuem, em sua composição, os chamados polissacarídeos não amiláceos, que aumentam a viscosidade do quimo no intestino, protegendo o alimento contra ataques de enzimas digestivas, diminuindo a digestibilidade da gordura pela inativação dos sais biliares e aumentando a secreção pancreática de enzimas. Essas bactérias aumentam a passagem do alimento pelo trato gastrointestinal e o número de microrganismos (Campbell *et al.*, 1983).

Outro motivo para a diminuição do lipídio muscular seria o aumento da absorção de aminoácidos com a adição dos probióticos causando melhor balanceamento (relação energia digestível x proteína digestível) da dieta e, com isto, reduzindo os lipídios (Kozasa, 1989). A absorção dos aminoácidos da dieta são mais bem aproveitados pelo animal, pois, os microrganismos probióticos evitam a competição pelos patógenos, aumentando a disponibilidade destes nutrientes, além dos carboidratos e minerais (Guillot, 2000; Robles-Huaynate *et al.*, 2007).

Kalavathy *et al.* (2006) trabalhando com aves de corte alimentadas com cultura de *Lactobacillus* spp. observaram reduções na concentração de lipídio muscular de 0,89 para 0,70% e no fígado de 3,50 para 2,88%. Segundo Santoso *et al.* (1999) que pesquisaram a ação do *Bacillus subtilis* em dietas para aves de corte, a redução do lipídio poderia ser devido à redução da ação da enzima acetil CoA carboxilase que catalisa a síntese de ácidos graxos.

Com relação ao EE do fígado, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos tanto na 1ª (P=0,84) quanto na 2ª coleta (P=0,73) (Figura 4).

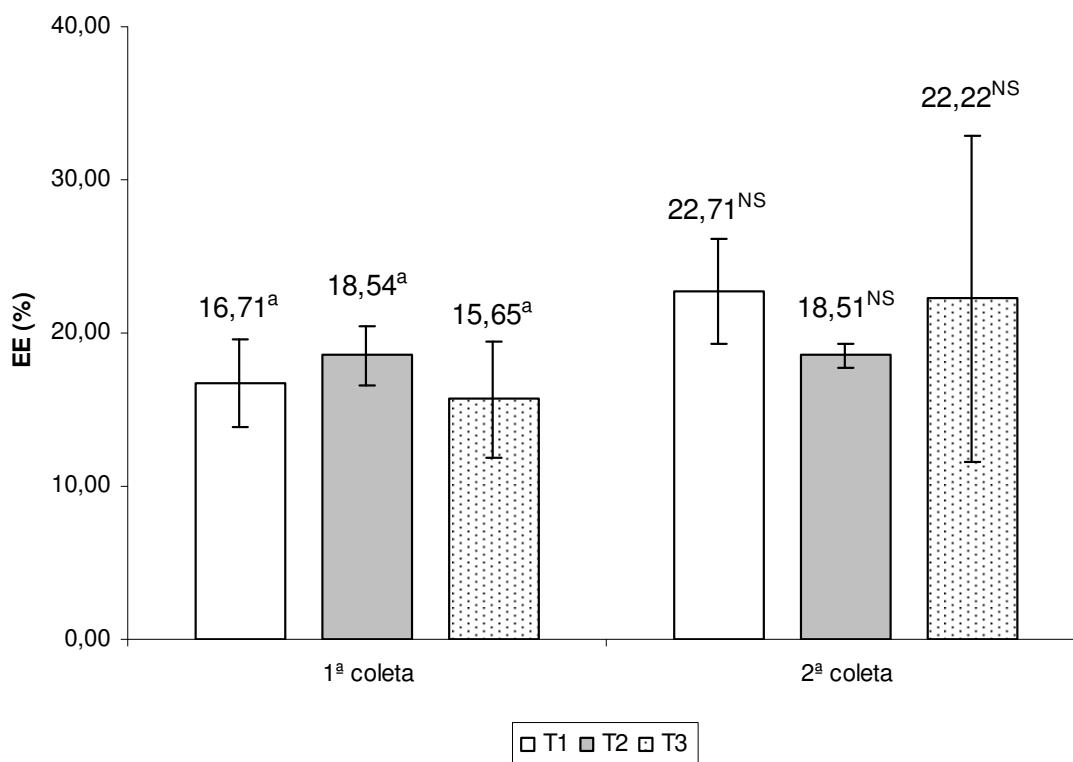


Figura 4 – Média percentual de extrato etéreo (EE) do fígado de matrinxã, *Brycon amazonicus*, após 42 dias (1ª coleta) e 84 dias (2ª coleta) de alimentação com probiótico criados em tanques-rede (base matéria-úmida). (T1 = controle; T2 = 5g probiótico kg⁻¹ ração; T3 = 10g probiótico kg⁻¹ ração)

As análises de EE dos peixes inteiros, realizadas ao final do experimento (Tabela 2) não mostraram diferenças significativas entre tratamentos, provavelmente, devido à grande quantidade de gordura nas vísceras que não permitiu a detecção das diferenças encontradas no músculo.

Visualmente, podia se notar que as vísceras dos peixes avaliados apresentaram grande quantidade de lipídios, confirmando sua presença nas análises químicas. Segundo Arbelárez-Rojas *et al.* (2002), esta espécie com aproximadamente 200g possui 11,00% de EE, 15,5% de PB e 4,5% de cinza. Neste trabalho foi determinada a concentração média de 22,00% de lipídios, valores esses acima dos encontrados na literatura. Estes níveis elevados podem ser devido à dieta fornecida, com altos níveis protéicos (32% proteína-bruta) e energéticos (4.196kcal

kg⁻¹ - valor calculado), além da alimentação *ad libitum*, que para esta espécie em tanques-rede pode gerar consumo em excesso, confirmando portanto, acúmulo da energia, na forma de lipídios nos músculos, vísceras e fígado.

Tabela 2. Médias e desvio padrão da umidade (UM), matéria-mineral (MM), proteína-bruta (PB), extrato-etéreo (EE) de matrinxã *B. amazonicus* (peixe inteiro) alimentados com doses de probiótico (base matéria-umida)

Tratamentos	Análises (%)			
	UM	MM	PB	EE
T1	59,28 ± 3,26	2,33 ± 0,51	15,50 ± 1,60	21,48 ± 1,69
T2	58,21 ± 2,08	2,22 ± 0,75	16,49 ± 1,22	22,05 ± 1,53
T3	58,00 ± 1,88	2,10 ± 0,68	16,55 ± 0,99	22,49 ± 1,15

(T1 = controle; T2 = 5g probiótico kg⁻¹ ração; T3 = 10g probiótico kg⁻¹ ração)

Conclusões

- ✓ O probiótico *Bacillus subtilis* suplementado na dieta de matrinxã melhora o desempenho produtivo;
- ✓ A dose de 10g de probiótico por quilo de ração reduz a deposição de lipídios no músculo.

Referências

- Aly, S.M., Ahmed, Y.A.G., Ghareeb, A.A.A. Mohamed, M.F. 2008 Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistence of tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunology*, 25: 128-136.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists 1984 Official Methods of Analysis. 12.ed. Washington, D.C., 1015p.

- Arbelárez-Rojas, G.A., Fracalossi, D.M., Fim, J.D.I. 2002 Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de cultivo intensivo, em igarapé, e semi-intensivo, em viveiros. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31 (3): 1059-1069.
- Bairagi, A., Sakar Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.K. 2002 Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10: 109-121.
- Barbosa, T.M., Serra, C.R., La Ragione, R.M., Woodward, M.J., Henriques, A.O. 2005 Screening for *Bacillus isolatres* in the broiler gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2): 968-978.
- Brandão, F.R., Gomes, L.C., Chagas, E.C., Araujo, L.D., Silva, A.L.F. 2005 Densidade de estocagem de matrinxã (*Brycon amazonicus*) na recria em tanque-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40 (3): 299-303.
- Campbell, G.L., Classen, H.L. Goldsmith, K.A. 1983 Effect of fat retention on the rachitogenic effect of rye fed to broiler chicks. *Poultry Science*, 62: 2218-2223.
- Dias, D.C., Stefani, M.V., Ferreira, C.M., Franca, F.M. 2008 Uso de probiótico em ração de rã-touro, *Rana catesbeiana*: desempenho produtivo. *Archivos de Zootecnia*, 57: 449-455.
- França, F.M., Dias, D.C, Teixeira, P.C., Marcantônio, A.S., Stéfani, M.V., Antonucci, A.M., Rocha, G.C., Ranzani-Paiva, M.J.T., Ferreira, C.M. 2008 Efeito do probiótico *Bacillus subtilis* no crescimento, sobrevivência e fisiologia de rãs-touro (*Rana catesbeiana*). *Boletim do Instituto de Pesca*, 34 (3): 403-412.
- Fuller, R. 1977 The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *British Poultry Science*, 18: 85-94.
- Fuller, R. 1989 Probiotics in man and animals: A review. *Journal Applied Bacteriology*. 66: 365-378.
- Guillot, J.F. 2000 The pros and cons of probiotics – make probiotics work for poultry. *Feed Mix*, 23 (8): 28-30
- Hisano, H., Silva, M.D.P., Barros, M.M., Pezzato, L.E. 2006 Levedura íntegra e derivados do seu processamento em rações para tilápia do Nilo: aspectos hematológicos e histológicos. *Acta Scientiarum*, 28 (4): 311-318.
- Inooka, S., Uehara, S., Kimura, M. 1986 The effect of *Bacillus natto* on the T and B lymphocytes from spleens of feeding chickens. *Poultry Science*, 65: 1217-1219.

- Kalavathy, R., Abdullah, N., Jalaludin, S., Wong, M.C.V.L., Ho, Y.W. 2006 Effects of *Lactobacillus* feed supplementation on cholesterol, fat content and fatty acid composition of the liver, muscle and carcass of broiler chickens. *Animal Research*, 55: 77–82.
- Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M.J., Gibson, L. 2008 Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*. 274: 1-14. D.O.I. 10.1016/j.aquaculture.2007.11.019
- Kozasa, M. 1989 Probiotics for animal use in Japan. *Revue Scientifique et Technique de l'Ofisse International des Epizooties*, 8 (2): 517-531.
- Lara-Flores, M., Olvea-Novoa, M.A., Guzman-Mendez, B.E. 2003 Use of bactéria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216 (1-4): 193-201.
- Mendes, P.P. 1999 *Estatística aplicada à aqüicultura*. Recife: Bagaço, 265p.
- Meurer, F., Hayashi, C., Costa, M.M., Mauerwerk, V.L., Freccia, A. 2006 Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para tilápias-do-nilo durante o período de reversão sexual submetidas a um desafio sanitário. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35 (5): 1881-1886.
- Meurer, F., Hayashi, C., Costa, M.M., Mascioli, A.S., Colpini, L.M.S., Freccia, A. 2008 Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia-do-Nilo. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 9 (4): 804-812.
- Oliveira, M.N., Sivieri, K., Alegro, J.H.A., Saad, S.M.I. 2002 Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas*, 38 (1): 1-21.
- Ozawa, K., Yabu-Uchi, K., Yamanak, K. 1978 Antagonistic effects of *Bacillus natto* and *Streptococcus faecalis* on growth of *Candida albicans*. *Microbiology Immunology*, 23 (12): 1147-1156.
- Planas, M., Cunha, I. 1999 Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177: 171-190.
- Robles-Huaynate, R.A., Thomaz, M.C., Budiño, F.H.L., Ruiz, U.S., Watanabe, P.H., Pascoal, L.A.F. 2007 Métodos de colheita de fezes e balanço de minerais em suínos alimentados com dietas suplementadas ou não com probióticos. *Acta Scientiarum Animal Science*, 29 (4): 395-401.

- Roos, N.M., Katian, M.B. 2000 Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *American Society for Clinical Nutrition*, 71: 405-411.
- Santoso, U., Tanaka, K., Ohtani, S. 1999 Effect of dried composition and *Bacillus subtilis* culture on growth, body hepatic lipogenic enzyme activity in female broiler chicks. *British Journal of Nutrition*, 14: 523-529.
- Silva, C.R. 2008 *Uso de probióticos em rações para frangos de corte: desempenho, digestibilidade e energia metabolizável*. Dissertação em Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa.
- Son, V.M., Chang, C.C., Wu, M.C., Guu, Y.K., Chiu, C.H., Cheng, W. 2009 Dietary administration of probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26 (5): 691-698.
- Subasinghe, R. 1997 Fish health and quarantine *In: Review of the state of the world aquaculture*. FAO Fishries circular. N. 886. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, p. 45-49.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. 2000 Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4): 655-671.
- Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H. 2004 Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases*, 2: 319–326.
- Wang, Y.B., Tian, Z.Q., Yao, J.T., Li, W.F 2008 Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, 277: 203-207.
- Watkins, B.A., Miller, B.F. 1983 Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. *Poultry Science*, 61: 1772-1779.
- Yan, L., Boyd, K.G., Burgess, J.G. 2002 Surface attachment induced production of antimicrobial compounds by marine epiphytic bacteria using modified roller bottle cultivation. *Marine Biotechnology*, 4: 356-366.

CAPITULO 5



Aspectos hematológicos e atividade fagocítica do matrinxã *Brycon amazonicus* alimentados com ração suplementada com probiótico

Resumo

Objetivou-se com este experimento avaliar o efeito do probiótico comercial composto de *Bacillus subtilis* nos parâmetros hematológicos e atividade fagocítica dos macrófagos de matrinxã, *Brycon amazonicus*, mantidos em tanques-rede. O produto foi adicionado na ração comercial nas doses de 5 e 10 g kg⁻¹ acrescido de 2% de óleo de soja, para proteção do probiótico ao pelete. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos e quatro réplicas simultâneas. Para as análises hematológicas utilizaram-se oito peixes por tratamento, os quais foram anestesiados e retiradas alíquotas de sangue por punção caudal para as determinações de: número total de células, contagem diferencial e total dos leucócitos, contagem de trombócitos, hematócrito, taxa de hemoglobina, cortisol e glicose. Calculou-se o volume corpuscular médio e a concentração de hemoglobina corpuscular média. Outros oito matrinxãs do mesmo lote foram utilizados para a avaliação da atividade fagocítica dos macrófagos. Os resultados mostraram que os probióticos alteraram os parâmetros hematológicos, o cortisol e a glicose e melhoraram a atividade fagocítica dos macrófagos.

Palavra-chave: *Bacillus subtilis*, migração macrófagos, hematologia, cortisol, glicose

Abstract

The aim of this experiment was to evaluate the effect of commercial probiotic composed of *Bacillus subtilis* in blood parameters and the phagocytic activity in macrophages matrinxã, *Brycon amazonicus*, kept in cages. The product was added to the commercial feed at doses of 5 and 10 g kg⁻¹ plus 2% soybean oil, to protect the pellets. The experimental design was completely randomized with three treatments and four replicates simultaneously. For the hematological analysis were used eight fish per treatment, which were anesthetized and, aliquots of blood were taken by puncturing the caudal vessel to determine number of total cells, differential count and total leukocyte, thrombocyte count, hematocrit, hemoglobin, cortisol and glucose. The mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin concentration were calculated. Eight other matrinxãs from the same batch were used to evaluate the macrophages phagocytic activity. The results showed that probiotics alter the hematological, cortisol and glucose parameters and improved the macrophages phagocytic activity.

Key words: *Bacillus subtilis*, macrophage migration, hematology, cortisol, glucose

Introdução

O gênero *Brycon*, pertencente à família Characidae, é considerado um dos mais numerosos gêneros de caracíformes neotropicais, contando mais de 60 espécies nominais, das quais, aproximadamente 40 distribuem-se pela América Central e do Sul (Howes, 1982). Entretanto, o mesmo autor afirma que *Brycon amazonicus* se restringe à Bacia Amazônica. Esta espécie possui dentição forte, carne saborosa, podendo atingir até 50 cm de comprimento. Geralmente apresentam coloração olivácea-dourada e as nadadeiras caudal e anal avermelhadas (Romagosa et al., 2001).

Nos últimos anos, tem-se intensificado o número de pesquisas voltadas ao desenvolvimento de alimentos funcionais e de substâncias químicas que promovam o aumento na eficiência alimentar e na taxa de crescimento dos peixes (Oliveira et al., 2002). Dentre os alimentos funcionais, ou seja, alimentos que fornecem a nutrição básica e a melhora da saúde de peixes encontram-se os probióticos. Esses elementos possuem potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional (Sanders, 1998; Castro, 2003).

O conceito de probiótico tem mudado através do tempo. Para Fuller (1989), são suplementos alimentares compostos de microorganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro, por meio do equilíbrio da microbiota intestinal. Os probióticos, em sua maioria são produtos preparados com *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, e em alguns casos, leveduras (Guzmán, 1992). Os probióticos são ingredientes não digeríveis incorporados aos alimentos no sentido de selecionar determinadas bactérias da microbiota intestinal, por meio de sua atuação como substrato seletivo no nível do cólon (Ziemer e Gibson, 1998; Lee et al., 1999).

Hematologia é o estudo do sangue ou a soma dos conhecimentos sobre o sangue e, grande parte das informações, consiste em medidas de valores de parâmetros em condições orgânicas normais e anormais. A aplicação da hematologia em pesquisa animal é bem aceita e considerada como procedimento de rotina em métodos de diagnósticos (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

Vários autores enfatizam que os conhecimentos das anormalidades existentes no sangue e órgãos constituem meio valioso e seguro na avaliação das condições biológicas, bioquímicas e patológicas nos peixes (Ribeiro et al., 1999, Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004). O conhecimento da composição sanguínea tem importância fundamental na avaliação das condições fisiológicas e estado nutricional dos peixes (Ranzani-Paiva et al., 2005).

O efeito de probióticos sobre a imunidade tem induzido grande número de pesquisas, sendo a maioria realizada em mamíferos (Coppola e Gil-Turnes, 2004), apesar de ainda não estar esclarecido como estes atuam (Cross, 2002). Este efeito pode estar relacionado à capacidade de os microrganismos do probiótico interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando linfócitos B produtores de IgA e a migração de linfócitos T (Perdigón e Holgado, 2000). Também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos fagócitos alveolares sugerindo ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (Cross, 2002).

Na aquicultura, há interesse especial em aumentar a resistência às doenças com incremento da atividade fagocítica das células de defesa. O aumento da atividade fagocítica de antígenos bacterianos é induzida pela liberação de patógenos mortos ou de seus produtos e pela aplicação de imunoestimuladores e adjuvantes como descrito por Roitt et al. (1998). Esses imunoestimulantes aumentam a mobilização enzimática de neutrófilos (Siwicki et al., 1998), que possuem grandes quantidades de peroxidase (Ellis, 1997), uma enzima lisossômica presente nas células fagocíticas e que promove a oxidação de certos compostos pelo peróxido de hidrogênio no processo de fagocitose (Oliveira et al., 1997).

Na aquicultura estão sendo utilizados testes de ativação e de incremento da migração de fagócitos, com intuito de verificar a capacidade imunológica dos animais frente a um desafio. Esta metodologia, descrita por Silva et al. (2002; 2005) que verificaram a capacidade fagocítica e o índice fagocítico em peixes antárticos, também está sendo utilizada para outros organismos aquáticos como o robalo *Centropomus parallelus* (Ranzani-Paiva et al., 2008) e a rã-touro *Rana catesbeiana* (Dias et al., 2009).

De acordo com o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros hematológicos (hemograma, glicemia e cortisol) e atividade imunológica inespecífica

dos macrófagos de matrinxã *Brycon amazonicus* alimentados com probiótico composto de *Bacillus subtilis*.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Pólo Regional do Vale do Ribeira, no município de Pariquera-Açu – SP/Brasil. Foram utilizados 960 alevinos de matrinxã com peso médio $39,83 \pm 8,18$ g e comprimento médio $14,60 \pm 1,00$ cm divididos em 12 tanques-rede de $2,7\text{m}^3$ ($1,5 \times 1,5 \times 1,2\text{m}$) instalados em três viveiros externos, devidamente preparados, com área de 600 m^2 , profundidade média de 1,50 m, vazão igual a 15 L min^{-1} . Os tratamentos foram constituídos por: T1 – Controle (ração 32% PB sem adição de probiótico), T2 – 5g de probiótico kg^{-1} de ração e T3 – 10g de probiótico kg^{-1} de ração. Foram realizadas coletas de sangue no 42º e 84º dia do experimento.

Para as análises hematológicas foram utilizados 8 matrinxãs de cada tratamento com peso médio de $262,12 \pm 31,95$ g e comprimento médio de $25,45 \pm 0,85$ cm. Os animais foram anestesiados com benzocaína (10 mg L^{-1}) e, retirada alíquotas de sangue por punção do vaso caudal, com auxílio de seringas descartáveis, heparinizadas para as determinações de:

- a) número total de células, contado em câmara de Neubauer, utilizando-se solução de Hayem como diluente;
- b) contagem diferencial e total dos leucócitos e contagem de trombócitos pelo método indireto segundo Hrubc e Smith (1998) em extensões sanguíneas coradas pelo May-Grünwald-Giemsa, segundo Rosenfeld (1947);
- c) hematócrito, pelo método do microhematócrito;
- d) taxa de hemoglobina, pelo método da cianometahemoglobina;

Com os resultados da taxa de hemoglobina (Hb), do hematócrito (Ht) e do número de eritrócitos (Er) foram calculados os índices hematimétricos absolutos: volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média.

Com o plasma foram realizadas análise de cortisol por meio de kit de ELISA e a glicemia utilizando-se kit da Labtest®.

Outro grupo de oito animais dos mesmos tratamentos anteriores foi utilizado para a avaliação da atividade fagocítica dos macrófagos. Os peixes foram anestesiados com benzocaína, em seguida, injetados na cavidade celomática 3 mL de solução de levedura na concentração 11.000 células mm⁻³ de *Saccharomyces cerevisiae*. Após os períodos de incubação, os animais foram eutanasiados por aprofundamento do estado anestésico e dissecação medular, a cavidade celomática foi lavada com 3 mL de solução de PBS (Phosphate Buffered Saline – pH 7,2) e o líquido foi aspirado com pipeta Pasteur. O lavado foi centrifugado a 1500 rpm (251,5 x g) por 5 min com o sobrenadante desprezado. Este material sedimentado foi utilizado para a determinação da capacidade fagocítica (CF = nº de macrófagos fagocitando/100 macrófagos) e do índice fagocítico (IF = nº total de leveduras no interior dos macrófagos / número de macrófagos fagocitando) de macrófagos por meio de microscopia de contraste de fase (400 X), segundo metodologia de Silva et al. (2002 e 2005).

Para verificar diferenças entre os tratamentos, foi realizado a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey (Zar, 1999). Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

As Tabelas 1 e 2 mostram a médias dos valores dos parâmetros hematológicos da serie vermelha. Observando os resultados obtidos, os valores de

hematócrito mostraram diminuição quando se compara os animais do controle com os alimentados com dieta suplementada com probiótico sendo essa diferença significativa segundo teste de Tukey ($P=0,007$). Após 84 dias (2ª coleta) nota-se aumento dos valores de hematócrito, mas não diferindo estatisticamente entre os tratamentos. Segundo Urbinati e Carneiro (2001) e Inoue et al. (2005), o aumento do hematócrito é indicador de estresse.

Com relação aos valores de eritrócitos houve aumento nos peixes que receberam 10g de probiótico kg^{-1} de ração, somente na primeira coleta (42 dias), sendo esta diferença significativa ($P=0,001$). Na segunda coleta (84 dias) pode-se observar que esses valores diminuíram em todos os tratamentos não diferindo entre eles. Segundo Martins (2000) o aumento do número dos eritrócitos também está relacionado com o estresse do animal. Como na segunda coleta (84 dias) os valores do número de eritrócitos diminuíram e os de hematócrito aumentaram, provavelmente as células dos animais eram maiores ocorrendo, portanto, aumento de hematócrito e diminuição do número de eritrócitos. Isso foi comprovado pelos valores de VCM que aumentaram na segunda coleta. Segundo Ranzani-Paiva et al. (2004) em situações emergenciais o organismo começa a liberar células imaturas que apresentam quantidade de hemoglobina menor carregando menor quantidade de oxigênio o que pode ser comprovado pela diminuição do CHCM da segunda coleta (84 dias).

Tabela 1 – Valores médios e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros hematológicos de matrinxã *Brycon amazonicus* após 42 dias (1ª coleta) e 84 dias (2ª coleta) de alimentação

Tratamento	Ht		Hb		Er	
	1ª coleta	2ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	1ª coleta	2ª coleta
Controle	42,50±0,55 ^a	43,56±0,63	8,91±0,17	9,68±0,08	3,28±0,10 ^b	2,61±0,43
5g kg⁻¹	36,75±1,53 ^b	44,50±0,58	8,86±0,27	9,90±0,14	3,14±0,10 ^b	2,80±0,13
10g kg⁻¹	38,69±1,22 ^{ab}	42,75±0,37	8,82±0,26	9,34±0,36	3,79±0,10 ^a	2,69±0,13

Ht = hematócrito (%); Hb = taxa de hemoglobina (g 100 mL⁻¹); Er = número de eritrócitos (10⁶ mm⁻³); Letras iguais na coluna não diferem significativamente segundo teste de Tukey

Tabela 2 – Valores médios e erro padrão da média (EPM) dos índices hematimétricos de matrinxã *Brycon amazonicus* após 42 dias (1ª coleta) e 84 dias (2ª coleta) de alimentação

Tratamento	VCM		CHCM	
	1ª coleta	2ª coleta	1ª coleta	2ª coleta
Controle	131,88±3,85 ^a	166,35±4,86	20,72±0,23 ^b	22,33±0,40
5g kg⁻¹	117,46±4,25 ^{ab}	161,53±8,22	24,25±0,85 ^a	22,28±0,44
10g kg⁻¹	102,90±5,59 ^b	162,14±8,86	22,83±0,43 ^{ab}	21,83±0,70

VCM = volume corpuscular médio (fL); CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular Média (%); Letras iguais na coluna não diferem significativamente segundo teste de Tukey

Os valores dos parâmetros hematológicos estão apresentados na Tabela 3. Pode-se observar que na 1ª coleta (42 dias de alimentação) houve diminuição nos valores de leucócitos totais quando comparados o controle com os demais tratamentos, sendo esta diferença significativa (P=0,004). Na segunda coleta (84 dias de alimentação) houve aumento nos valores de leucócitos mas esta diferença não foi significativo (P= 0,45). Tavares-Dias et al. (2008) encontraram valores inferiores para a mesma espécie com valores médios de 13.692,92 leucócitos mm⁻³ de sangue.

Tabela 3 – Valores médios ± erro padrão da média dos valores absolutos de leucócitos de matrinxã *Brycon amazonicus* após 42 dias (1ª coleta) e 84 dias (2ª coleta) de alimentação

		Controle	5g kg ⁻¹	10g kg ⁻¹
Lc	1ª Coleta	30.398,88 ± 3.632,15 ^a	18.688,26 ± 2.403,46 ^b	18.425,55 ± 1435,46 ^b
	2ª Coleta	30.446,89 ± 4.562,49	35.295,21 ± 2.538,92	29.427,80 ± 3.041,33
Lf	1ª Coleta	25.478,73 ± 2599,54 ^a	13.820,40 ± 1629,55 ^b	14.709,70 ± 1489,15 ^{ab}
	2ª Coleta	23.477,15 ± 3.545,21	25.796,69 ± 1487,24	19.557,13 ± 1.822,61
Nt	1ª Coleta	2.682,20 ± 731,72	3.312,79 ± 1.289,43	2.604,72 ± 449,52
	2ª Coleta	3.421,63 ± 616,74	5.425,89 ± 1.049,63	5.770,04 ± 1.337,71
Bs	1ª Coleta	195,59 ± 8,70	199,32 ± 111,35	0,0
	2ª Coleta	19,25 ± 19,25	0,0	0,0
Es	1ª Coleta	94,66 ± 53,85	193,66 ± 66,68	135,78 ± 62,15
	2ª Coleta	962,85 ± 269,23 ^b	1.607,01 ± 525,50 ^{ab}	2.884,01 ± 752,03 ^a
Mn	1ª Coleta	1.947,71 ± 298,07	1.162,09 ± 270,16	975,35 ± 218,56
	2ª Coleta	2.566,01 ± 625,64	2.465,63 ± 335,85	1.216,61 ± 143,61

Letras iguais na linha não diferem significativamente segundo teste de Tukey. Lc = leucócitos; Lf = linfócitos; Nt= neutrófilo; Bs = basófilo; Es = eosinófilo; Mn = monócito.

Com relação aos linfócitos, na 1ª coleta, houve diminuição nos valores quando comparados o grupo controle com os animais tratados com diferentes doses de probiótico, sendo esta diferença significativa ($P=0,02$). Já na 2ª coleta houve um aumento destas células nos peixes do tratamento de 5g e diminuição no tratamentos de 10g quando comparados aos animais do controle não sendo estas diferenças significativas ($P= 0,29$). Estes valores são mais elevados que os encontrados por Tavares-Dias et al. (2008) que encontrou média de $5.680 \text{ Lf. mm}^{-3}$ de sangue.

Os eosinófilos apresentaram diferenças significativas somente na 2ª coleta onde pode-se observar aumento destas células quando comparados os animais do controle com os tratados com probiótico. As outras células sanguíneas, neutrófilo, basófilo e monócito não apresentaram diferença significativa entre os animais dos diferentes tratamentos.

Os valores do cortisol estão apresentados na Figura 1. Apesar dos valores não apresentarem diferença significativas ($P= 0,16$), pode-se observar na 1ª coleta aumento nestes valores quando comparados os animais do controle com os alimentados com dieta suplementada com doses de probiótico. Na 2ª coleta houve diminuição dos valores encontrados nos animais que receberam dieta com 5g de probiótico, mas os animais alimentados com 10g de probiótico continuaram com valores elevados quando comparados a 1ª com a 2ª coleta. Carneiro e Urbinati (2002) trabalhando com matrinxãs após sofrerem o estresse de transporte, quantificaram como nível basal valor de $136,3 \pm 13,93 \text{ ng mL}^{-1}$ ($13,63 \mu\text{g dL}^{-1}$) valores esse próximo dos encontrados neste trabalho. Após 24 horas do transporte, encontraram valores de $142,5 \pm 15,02 \text{ ng mL}^{-1}$ ($14,25 \mu\text{g dL}^{-1}$). Hoshiba et al. (2009) testaram o manejo de captura em matrinxãs e observaram valores acima de 120 ng mL^{-1} ($12,0 \mu\text{g dL}^{-1}$) corroborando aos valores do presente estudo.

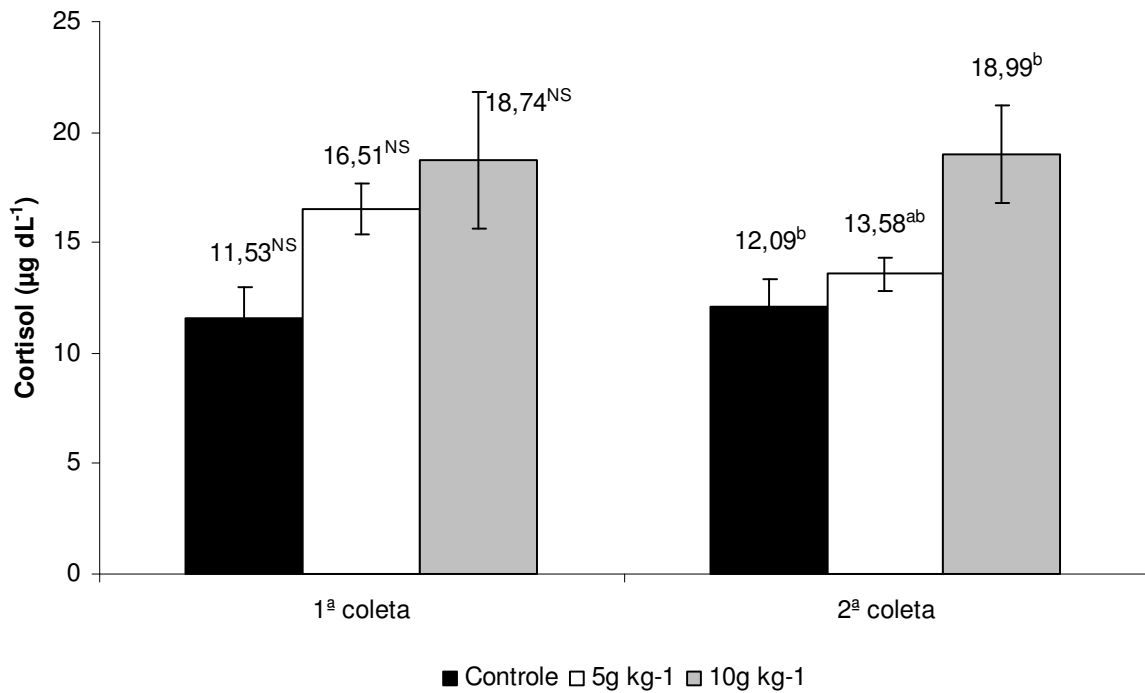


Figura 1- Cortisol plasmático de matrinxã *Brycon amazonicus* alimentados com diferentes doses de probiótico

(Letras diferentes diferem estatisticamente)

Os valores de glicose estão apresentados na Figura 2. Pode-se observar valores inferiores nos animais do grupo controle quando comparados com os demais tratamentos, nas duas coletas. Na 1ª coleta foram encontrados valores superiores no tratamento de 5g de probiótico ($P= 0,002$) e na 2ª coleta no tratamento de 10g de probiótico ($P= 0,007$). Os valores de glicose corroboram aos encontrados por Carneiro e Urbinati (2002) e Hoshiba et al. (2009) que variaram de 40 a 120 mg dL⁻¹ e 80 a 115 mg dL⁻¹, respectivamente. O aumento dos valores de cortisol e glicose no sangue são indicadores muito utilizados para expressar condições de estresse (Morgan e Iwana, 1997, Wendelaar Bonga, 1997, Wells e Pankhurst, 1999). Neste estudo pode-se observar que o probiótico não proporcionou melhora nos níveis de cortisol e glicose, sendo assim não diminuindo os efeitos do estresse.

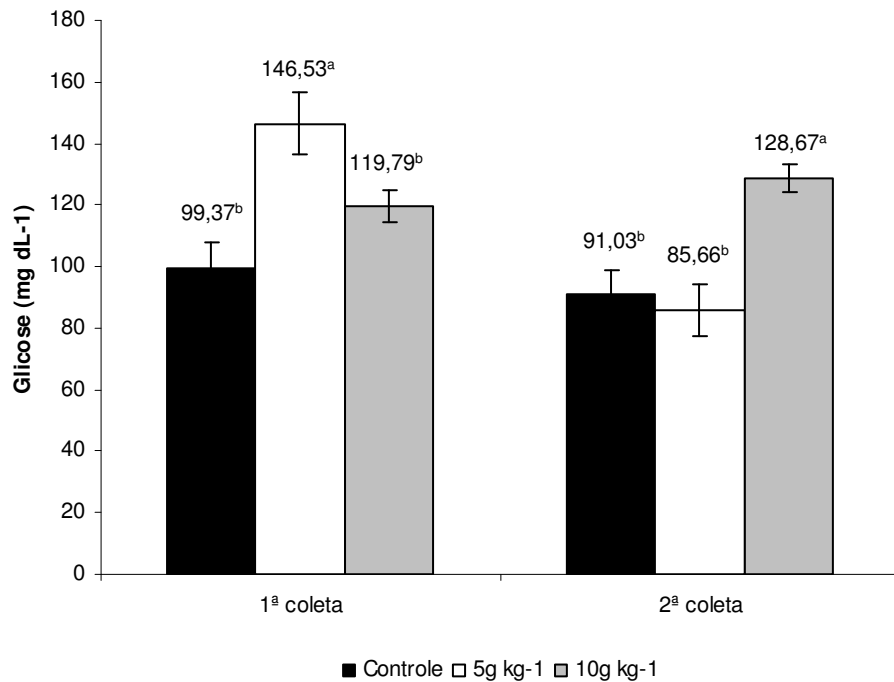


Figura 2- Glicose plasmática de matrinxã *Brycon amazonicus* alimentados com diferentes doses de probiótico (Letras iguais não diferem estatisticamente)

A atividade fagocítica e índice fagocítico dos macrófagos estão representados na Figura 3. A capacidade fagocítica dos macrófagos de matrinxã apresentou diferença significativa ($P=0,0001$) nos animais que receberam dieta com probiótico. Com relação ao índice fagocítico pode-se observar que não houve diferença ($P= 0,07$) entre os tratamentos e entre a 1ª coleta (42 dias) e a 2ª coleta (84 dias).

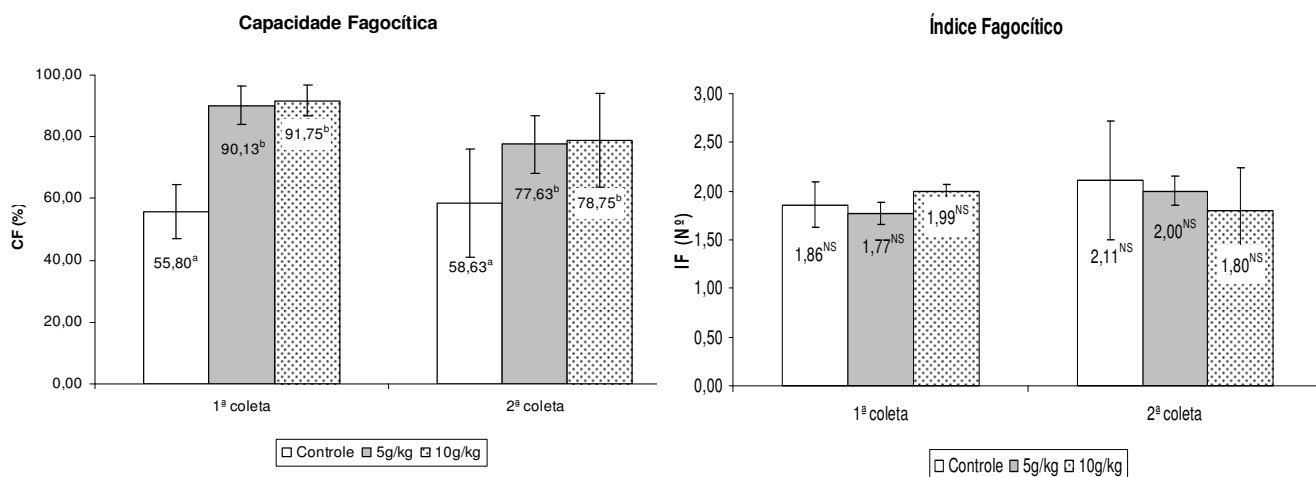


Figura 3 – Capacidade e Índice fagocítico dos macrófagos de matrinxã, *Brycon amazonicus* após 42 dias (1ª coleta) e 84 dias (2ª coleta) de alimentação com probiótico

Os resultados obtidos no teste de capacidade fagocítica mostrou que os probióticos favoreceram a atividade dos macrófagos com maior migração para o local de lesão e capacidade de fagocitar maior número de leveduras. Portanto, os probióticos beneficiam a produção de animais criados em cativeiro pois otimizam a resposta fagocítica deixando os animais teoricamente mais resistentes a doenças. Segundo Copolla e Gil-Turnes (2004), os probióticos têm, além da atividade como promotores de crescimento e reguladores de microbiota das mucosas, efeito imunomodulador, embora a forma de ação seja pouco conhecida. Em trabalho realizado com rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante a engorda, Dias et al. (2009) observaram influência positiva na capacidade fagocítica dos animais suplementados com probióticos. Estes autores verificaram no grupo controle capacidade fagocítica de $48,2 \pm 4,19$ %, enquanto que nos tratamentos com probióticos, observaram variações entre 66 a 93%. Para o índice fagocítico, entretanto, não foram observadas influências significativas, com resultados variando entre 3,39 a 3,93, valores esses acima do presente trabalho. Já, França et al. (2008) trabalhando com a mesma espécie de rã e

mesma bactéria probiótica na fase final da girinagem e pré-engorda (pós-metamorfose até 7g) observaram aumento na capacidade fagocítica dos macrófagos sendo que no grupo controle foi observado percentual de 37,17% enquanto que nos demais tratamentos foi verificada variação de 58,17 a 68,17%. Em relação ao índice fagocítico estes mesmos autores citados anteriormente observaram diferença significativa entre os tratamentos quando comparados ao grupo controle, sendo que estes valores variaram de 3,28 (grupo controle) e 4,34 a 4,76 nos tratamentos com probiótico, valores estes superiores ao do presente estudo. Os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune, apesar dos mecanismos pelos quais os probióticos estimulam a imunidade dos animais ainda não estarem esclarecidos (Cross, 2002). Segundo Coppola e Gil-Turnes (2004), bactérias do gênero *Bacillus* podem estimular a resposta imune e serem utilizadas como imunomoduladores. Esta habilidade das bactérias probióticas em modular a imunidade e aumentar o balanço microbiano de microrganismos entéricos comensais, oferece uma alternativa biologicamente efetiva para melhorar a saúde sem recorrer ao consumo de drogas alopáticas (Kailasapathy e Chin, 2000).

Conclusões

- Os probióticos melhora a imunidade dos animais.

Referências

- Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C. 2002 Transport stress in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei:Characidae), at different densities. *Aquaculture International*, 10: 221-229.
- Castro, J.C. 2003 Uso de aditivos e probióticos em rações animais. In: Ferreira, C.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Teixeira, P.C., França, F.M., Dias, D.C. I Simpósio Brasileiro de

- Ranicultura e II Ciclo de Palestra sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, 34: 12-18.
- Coppola, M.M., Gil-Turnes, C. 2004 Efeito de probiótico na resposta imune *Ciência Rural*, 34 (4): 1297-1303.
- Cross, M.L. 2002 Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34 (4): 245-253.
- Dias, D.C., De Stéfani, M.V., Ferreira, C.M., França, F.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Santos, A.A. 2009 Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research*, 40: 1-8 (DOI 10.1111/j.1365-2109.2009.02390.x).
- Ellis, A.E. 1997 The leukocytes of fish: Review. *Journal of Fish Biology* London, 11: 453-491.
- França, F.M., Dias, D.C, Teixeira, P.C., Marcantônio, A.S., Stéfani, M.V., Antonucci, A.M., Rocha, G.C., Ranzani-Paiva, M.J.T., Ferreira, C.M. 2008 Efeito do probiótico *Bacillus subtilis* no crescimento, sobrevivência e fisiologia de rãs-touro (*Rana catesbeiana*). *Boletim do Instituto de Pesca*, 34 (3): 403-412.
- Fuller, R. 1989 Probiotics in man and animals: A review. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.
- Guzmán, G.A. 1992 Aplicación de probióticos en la acuicultura. In: Suárez, L.E.C., Marie, D.R., Alfaro, R.M. Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Universidade Autónoma de Nuevo León Monterrey: 332-337.
- Hoshiba, M.A., Gonçalves, F.D., Urbinati, E.C. 2009 Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura. *Acta Amazônica*, 39 (2): 445-452.
- Howes, G. 1982 Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei). *Bulletin British Museum (Natural History)*, 43 (1): 1-47.
- Hrube, T.C.; Smith, S.A. *Hematology of fish*. In: Schalm's Veterinary Hematology, 1998. 5ª ed., p.1120-1125.
- Inoue, L.A.K.A., Afonso, L.O., Iwama, G.K., Moraes, G. 2005 Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. *Acta Amazônica*, 35(2): 289 - 295
- Kailasapathy, K., Chin, J. 2000 Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, 78: 80-88.

- Lee, Y. K., Nomoto, K., Salminen, S., Gorbach, S. L. 1999 *Handbook of probiotics*. New York: Wiley, 211p.
- Martins, M.L. 2000 *Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em (Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887) estressados*. 125f. Tese de Doutorado em Aqüicultura, Jaboticabal
- Morgan, J.D., Iwana, G.K. 1997 Measurements of stressed states in the field In: Iwana, G.W., Pickering, A.D., Sumpster, J.P., Schreck, C.B. (Eds). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p. 247-270.
- Oliveira, L.W., Moura, W.L., Matushima, E.R., Egami, M.I. 1997 Detecção citoquímica da mieloperoxidase em eosinófilos e mononucleares azurófilos do sangue de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) Reptilia, Crocodilia. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira para Progresso da Ciência, 49, Belo Horizonte, MG. *Anais...Belo Horizonte: SBPC, 1997. p.878*.
- Oliveira, M.N., Sivierl, K., Alegro, J.H.A., Saad, S.M.I. 2002 Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas*, 38 (1): 1-21.
- Perdigón, G., Holgado, A.P.R. 2000 Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: Fuller, R., Perdigón, G. *Probiotics 3: Immunomodulation by the Gut Microflora and Probiotics*. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000, 213-233p.
- Ranzani-Paiva, M. J. T., Felizardo, N. N. e Luque, J. 2005 Parasitological and hematological analysis of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757 from Guarapiranga reservoir, São Paulo State, Brazil. *Acta Scientiarum Biological Science*. 27(3):231-237.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Santos, A.A., Dias, D.C., Seriani, R., Egami, M. 2008 Hematological and phagocytic response of fat snook, *Centropomus parallelus*, reared in net cages, before and after inoculation with *Sacharomyces cerevisiae*. *Bioikos*, 22: 29-35.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Silva-Souza, A. 2004 Hematologia de peixes Brasileiros In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M.L.P. *Sanidade de Organismos Aquáticos*, Varela, São Paulo. pp. 89-120.
- Ribeiro, C.A.O.; Rouleau, C.; Pelletier, E.; Audet, C.; Tjalve, H. 1999 Distribution kinetics of dietary methylmercury in the Artic Charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Science Technology*., 33: 902 – 907.
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. 1998 *Imunology*. 5ed. London: Mosby, 423 p.

- Romagosa, E., Narahara, M.Y., Borella, M.I., Fenerich-Verani, N. 2001 Seleção e caracterização de fêmeas de matrinxã, *Brycon cephalus*, induzidas à reprodução. *Boletim do Instituto de Pesca*, 27(2): 139 – 147.
- Rosenfeld, G. 1947 Corante pancrônico para hematologia e citologia clínica. Nova constituição dos componentes do May Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantã*, 20: 329-334.
- Sanders, M.E. 1998 Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria *International Dairy Journal*, Amsterdam, 8: 341-347.
- Silva, J.R.M.C., Porto-Neto, L.R., Borges J.C.S., Jensch-Junior B.E. 2005 Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0°C. *Polar Biology*, 28 (4): 326-328.
- Silva, J.R.M.C., Staines, N.A., Hernandez-Blazquez, F.J., Porto-Neto, L.R., Borges J.C.S. 2002 Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of *Notothenia coriiceps*. *Journal of Fish Biology*, 60: 466-478.
- Siwicki, A.K., Morand, M., Klein, P., Studnicka, M., Terech-Majewska, E. 1998 Modulation of non-specific defence mechanisms and protection against diseases in fish. *Acta Veterinaria*, 67:328.
- Tavares-Dias, M., Affonso, E.G., Oliveira, S.R., Marcon, J.L., Egami, M.I. 2008 Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. *Acta Amazônica*, 38 (4): 799-806.
- Urbinati, E.C., Carneiro, P.C. 2001 Metabolic and hormonal responses of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) to transport stress under influence of benzocaine. *Journal AquacultureTropical*, 16 (1): 75-85.
- Wells, R.M.G., Pankhurst, N.W. 1999 Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein a stress indicator in fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30: 276-284.
- Wendelaar Bonga, S.E. 1997 The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77:591-625.
- Zar, J.H. 1999 *Biostatistical Analysis*. 3rd. Edition, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA, 662 p.
- Ziemer, C.J.; Gibson, G. R. 1998 An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *Inst. Dairy J. Amsterdam* 8: 473-479.

Considerações Finais



A busca pela aquicultura sustentável fez surgir novas alternativas para aperfeiçoar a criação de organismos aquáticos, sendo a utilização de bactérias probióticas uma desta, com intuito de diminuir ou mesmo excluir os antibióticos da criação de organismos aquáticos. Os efeitos benéficos da utilização de probióticos vêm sendo divulgado para diversas espécies. A gama de espécies de bactérias que podem ser consideradas como probióticas vem crescendo a cada dia.

No entanto, o fato da maioria dos probióticos exercer efeito imunomodulador positivo nas espécies, inclusive em peixes, é importante a continuidade das pesquisas voltadas ao entendimento das interações entre o intestino-microrganismos, pois a partir disto será possível observar melhora nos parâmetros zootécnicos, que fará com que o empreendimento seja lucrativo.

Neste projeto, pudemos observar vários efeitos benéficos da utilização do probiótico em matrinxã, como a melhora nos parâmetros reprodutivos, como taxa de fertilização e eclosão, quantificação dos efeitos do estresse, atividade fagocítica dos macrófagos, redução nos teores de extrato etéreo no músculo e fígado e melhora no desempenho produtivo. Desta forma, as evidências acumuladas sobre os benefícios dos probióticos em matrinxã, *Brycon amazonicus*, justificam o aprofundamento dos estudos sobre seu modo de ação, a fim de viabilizar a utilização na aquicultura. Sendo assim, nosso grupo de pesquisa dará continuidade nas investigações com outras espécies de peixes.