

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIETAS MICROENCAPSULADAS: PRODUÇÃO E
AVALIAÇÃO PARA ALIMENTAÇÃO DE LARVAS
ALTRICIAIS DE PEIXES DE ÁGUA DOCE**

Natalia de Jesus Leitão
Zootecnista

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIETAS MICROENCAPSULADAS: PRODUÇÃO E
AVALIAÇÃO PARA ALIMENTAÇÃO DE LARVAS
ALTRICIAIS DE PEIXES DE ÁGUA DOCE**

Natalia de Jesus Leitão

Orientadora Profa. Dra. Maria Célia Portella

**Defesa de Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutor em Zootecnia**

2013

Leitão, Natalia de Jesus
L533d Dietas microencapsuladas: produção e avaliação para
alimentação de larvas altriciais de peixes de água doce / Natalia de
Jesus Leitão. – – Jaboticabal, 2013
v, 91 f.: il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientadora: Maria Célia Portella
Banca examinadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati, Maeli Dal-Pai-
Silva, Carlos Raimundo Ferreira Grosso, Renata Guimarães Moreira,
Bibliografia

1. Celularidade muscular. 2. Microencapsulação. 3. Musculatura
esquelética. 4. *Piaractus mesopotamicus*. 5. Trato digestório. I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.3.034

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DIETAS MICROENCAPSULADAS: PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO PARA ALIMENTAÇÃO DE LARVAS ALTRICIAIS DE PEIXES DE ÁGUA DOCE

AUTORA: NATALIA DE JESUS LEITÃO

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA CÉLIA PORTELLA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA CÉLIA PORTELLA
Departamento de Biologia Aplicada - À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. CARLOS RAIMUNDO FERREIRA GROSSO
Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição / FEA / Universidade Estadual de Campinas / Campinas/SP

Profa. Dra. RENATA GUIMARÃES MOREIRA
Departamento de Fisiologia Geral / Instituto de Biociências / USP / Sao Paulo/SP

Profa. Dra. MAELI DAL PAI SILVA
Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu / Botucatu/SP

Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 25 de janeiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Natalia de Jesus Leitão nasceu em São Paulo, SP no dia 06 de novembro de 1984. É graduada em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (2006) e obteve o título de Mestre em Zootecnia pela mesma instituição (2009). Foi bolsista de Iniciação Científica do Programa PIBIC/CNPq e de Mestrado pela FAPESP. Recebeu o “Prêmio Dr. Henrique Francisco Raimo” outorgado pelo Conselho Regional de Medicina Veterinária de São Paulo, pela aprovação em Primeiro Lugar no conjunto de disciplinas profissionalizantes do Curso de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal e o “Prêmio Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal” por ter obtido a maior média entre as disciplinas ministradas durante o Curso de Zootecnia, no ano letivo de 2006 – XLVI Turma de Zootecnia. Desenvolve atividades de pesquisa em aquicultura, atuando principalmente em larvicultura de peixes neotropicais, desenvolvimento de dietas microencapsuladas para larvas, morfologia dos sistemas digestório e muscular de peixes, histologia e biologia molecular.

"O que as vitórias têm de mau é que não são definitivas. O que as derrotas têm de bom é que também não são definitivas"

José Saramago

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora: Profa. Dra. Maria Célia Portella, mais uma vez pela oportunidade, confiança, carinho, amizade, atenção e dedicação;

Aos membros da Banca de Exame de Qualificação: Dra. Margarida Maria Barros, Dra. Marta Verardino De Stéfani, Dra. Janete Aparecida Desidério, Dr. Fernando José Zara por terem avaliado os resultados deste trabalho e terem feito importantes sugestões. Gostaria de agradecer, especialmente, ao Dr. Fernando José Zara por ter disponibilizado seu Laboratório para a realização das análises histológicas;

Aos membros da Banca Examinadora: Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, Dra. Maeli Dal-Pai-Silva, Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso e Dra. Renata Guimarães Moreira pela atenção e sugestões dadas ao trabalho. Em especial, agradeço aos professores Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso, Dra. Maeli Dal-Pai-Silva e Dra. Renata Guimarães Moreira por terem me recebido em seus laboratórios e colaborado na execução do estudo e discussão dos resultados. Sem a colaboração de vocês, a realização deste trabalho não seria possível;

À Juliana Bürguer Rodrigues pela parceria em todas as etapas deste trabalho. Agradeço a você por se tornar uma grande amiga;

Aos colegas do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos: Larissa, Camila, Avatar, Taís, Thyssia, Raphael, Hellen, Strumi, Lidiane, Lígia e Bruna. Agradeço a todos pela disposição em ajudar em coletas e por todos os bons momentos de convivência no laboratório e fora dele;

Aos colegas e funcionários da Unesp, do Caunesp, da Unicamp e da USP que, de certa forma, contribuíram para a realização deste trabalho, compartilhando ideias e momentos de descontração;

Em especial, aos amigos Olívia Cristina C. Menossi, Thiago Mendes de Freitas, Caroline Nebo e Juliana Tomomi Kojima pela grande ajuda na condução da larvicultura.

À Fernanda Regina Carani, pela amizade e auxílio nas análises moleculares;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelas concessões da Bolsa de Estudos e Auxílio à Pesquisa.

Ao meu esposo, Gustavo Maciel Pizzato, por ser meu companheiro e me apoiar em todas as minhas decisões. Por compreender que todo tempo que passamos distantes é importante para a realização de nossos sonhos.

À minha irmã, Amanda de Jesus Leitão, por fazer parte da minha vida.

4.3. <i>Aceitação das dietas</i>	49
4.4. <i>Desenvolvimento do trato digestório</i>	50
5. Conclusões	52
Referências	53
CAPÍTULO 3 – CRESCIMENTO MUSCULAR DE LARVAS DE PACU	
<i>Piaractus mesopotamicus</i> EM DIFERENTES CONDIÇÕES	
NUTRICIONAIS	59
Resumo	60
1. Introdução	61
2. Material e métodos	62
2.1. <i>Dietas</i>	62
2.2. <i>Peixes</i>	64
2.3. <i>Desempenho e eficiência de utilização de proteína</i>	65
2.4. <i>Histologia</i>	66
2.5. <i>Expressão gênica de MyoD e Miogenina</i>	68
2.6. <i>Análises estatísticas</i>	69
3. Resultados	69
3.1. <i>Crescimento, utilização de proteína e composição corporal</i>	69
3.2. <i>Morfologia das fibras musculares</i>	71
3.3. <i>Morfometria das fibras musculares</i>	77
3.4. <i>Expressão relativa dos genes da MyoD e Miogenina</i>	79
4. Discussão	82
5. Conclusões	85
Referências	86
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	
	91

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

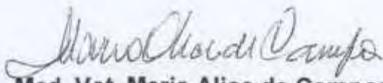
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 007955/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Produção de micropartículas de gel recobertas por proteínas do soro de leite e sua aplicação para alimentação de larvas de peixes**", sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Maria Célia Portella, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 12 de Maio de 2011.

Jaboticabal, 13 de Maio de 2011.



Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA



Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

DIETAS MICROENCAPSULADAS: PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO PARA ALIMENTAÇÃO DE LARVAS ALTRICIAIS DE PEIXES DE ÁGUA DOCE

RESUMO – Este estudo teve como objetivo produzir e avaliar dietas microencapsuladas para larvas altriciais de peixes de água doce pela combinação dos processos de gelificação iônica e coacervação complexa. As microcápsulas foram formuladas para conter níveis de nutrientes baseados na composição de náuplios de artêmia. Cinco dietas microencapsuladas foram produzidas variando apenas o óleo incorporado: oliva, girassol, linhaça, sacha inchi e peixe. As dietas microencapsuladas foram avaliadas utilizando larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* e foram comparadas a dois tratamentos controle, um com náuplios de artêmia e outro com dieta comercial. Para tanto, foram considerados aspectos relacionados à aceitação das dietas, desempenho produtivo, alterações morfológicas do trato digestório e celularidade do músculo esquelético dos animais, além da expressão de genes relacionados com a miogênese e crescimento muscular. As dietas microencapsuladas apresentaram, de modo geral, 550 g kg⁻¹ de proteína bruta, 240 g kg⁻¹ de lipídios e 11 g kg⁻¹ de cinzas, além de teores de umidade superiores a 850 g kg⁻¹. Nenhuma das dietas microencapsulas foi rejeitada pelos animais, entretanto quantidades inferiores aos náuplios de artêmia foram ingeridas (p<0,05). Baixos valores de taxa de crescimento específico foram observados nos animais alimentados com as dietas microencapsulas, o que refletiu em ganho em peso inferior ao proporcionado pelos náuplios de artêmia e pela dieta comercial (p<0,05). Entre as dietas microencapsuladas, aquela produzida com óleo de peixe apresentou os mais baixos índices de crescimento e sobrevivência (p<0,05). As análises histológicas demonstraram atraso no desenvolvimento do intestino, fígado, pâncreas e estômago dos animais alimentados com as dietas microencapsuladas, assim como na musculatura esquelética. Nesses animais, maior frequência de fibras pequenas (diâmetro ≤10 µm) foi observada na camada profunda da musculatura (p<0,05), assim como menores níveis de expressão de MyoD (p<0,05), relacionada ao crescimento muscular.

Palavras-chave: celularidade muscular, microencapsulação, musculatura esquelética, *Piaractus mesopotamicus*, trato digestório

MICROENCAPSULATED DIETS: PRODUCTION AND EVALUATION FOR FEEDING ALTRICIAL FRESHWATER FISH LARVAE

ABSTRACT – This study aimed to produce and evaluate microencapsulated diets for altricial freshwater fish larvae by combining ionic gelation and complex coacervation processes. The microparticles were formulated to contain nutrient levels based on artemia nauplii composition. Five microencapsulated diets were produced varying only the oil source: olive, sunflower, linseed, sachu inchi and fish. Microencapsulated diets were evaluated using pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae and compared to two feed controls, artemia nauplii and commercial diet. Therefore, we considered issues related to attractiveness of diets, growth performance, morphological changes of the digestive tract and skeletal muscle cellularity, and expression of genes related to myogenesis and muscle growth. Microencapsulated diets displayed in general 550 g kg⁻¹ protein, 240 g kg⁻¹ lipid and 11 g kg⁻¹ of ash. Moisture content was higher than 850 g kg⁻¹. Any of the microencapsulated diet was rejected by fish, however lower amounts than artemia nauplii were ingested (p<0.05). The specific growth rates of the animals fed with microencapsulated diets were lower than the control treatments, which also resulted in less weight gain (p<0.05). The comparison amongst the microencapsulated diets revealed that the diet produced with fish oil showed the lowest growth rate and survival (p<0.05). Histological analyzes indicated developmental delay in intestine, liver, pancreas and stomach of fish fed with microencapsulated diets, as well as skeletal muscle fibers in these fish. Higher frequency of small fibers (diameter ≤10 μm) was observed in the deep layer of the epaxial muscle (p <0.05), as well as lower expression levels of MyoD (p<0.05) related to muscle growth.

Keywords: muscle cellularity, microencapsulation, skeletal muscle, *Piaractus mesopotamicus*, digestive tract

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Considerações iniciais

Entre as espécies de peixes de água doce criadas comercialmente, muitas delas possuem larvas altriciais, com desenvolvimento inicial similar ao das larvas de peixes marinhos (PORTELLA; DABROWSKI, 2008). As larvas altriciais são aquelas que possuem reservas de vitelo escassas, que se esgotam logo nos primeiros dias após a eclosão, induzindo as larvas a iniciarem a alimentação exógena ainda sem o sistema digestório completamente diferenciado. Assim, no início do seu desenvolvimento, possuem habilidade limitada em capturar e digerir o alimento. Alimentos adequados para este período devem ser suficientemente atrativos para que as larvas possam percebê-los, suficientemente pequenos para que sejam capazes de ingeri-los e suficientemente nutritivos para fornecer nutrientes e energia para que as larvas completem seu desenvolvimento ontogenético e cresçam (HOLT; WEBB; RUST, 2011).

A alimentação de larvas de peixes criadas nos sistemas semi-intensivo e/ou intensivo baseia-se na utilização de organismos planctônicos, incluindo microalgas, rotíferos e artêmia. Diferente de espécies marinhas, que dependem inicialmente de rotíferos devido ao seu reduzido tamanho, as larvas altriciais de peixes reofílicos são capazes de ingerir organismos maiores, como náuplios de artêmia, desde a primeira alimentação. Estudos mostram que o uso de náuplios de artêmia como primeiro alimento exógeno proporciona altas taxas de crescimento e sobrevivência às larvas de peixes de água doce (PORTELLA; VERANI; CESTAROLLI, 2000; JOMORI et al., 2003 e 2008; TESSER, CARNEIRO; PORTELLA, 2005; LEITÃO et al., 2011; MENOSSI et al., 2012) além de ser economicamente vantajoso (JOMORI et al., 2005). Apesar desses benefícios, a intensificação da larvicultura de peixes trouxe a necessidade de se buscar alternativas mais eficientes que o uso de organismos planctônicos. Nesse sentido, esforços são realizados para desenvolver microdietas formuladas que substituam com eficiência os alimentos vivos.

As vantagens em substituir organismos planctônicos por microdietas na alimentação de larvas de peixes de água doce baseiam-se principalmente em: (1)

microdietas podem ter sua composição nutricional uniforme e adaptada para atender às exigências nutricionais de diferentes espécies; (2) microdietas para larvas de peixes possuem custo elevado quando comparadas com dietas para juvenis, mas ainda são mais econômicas que cultivar organismos vivos para alimentar as larvas (HOLT; WEBB; RUST, 2011); (3) algumas espécies de plâncton natural são carnívoras e podem atacar as larvas de peixes (JOMORI, 2005); (4) organismos planctônicos podem causar infecções bacterianas ou virais, aumentando o risco de doenças (LANGDON, 2003).

A alimentação de larvas de peixes com microdietas tem apresentado bons resultados. Por exemplo, larvas do peixe marinho *Sparus aurata* podem ser criadas com sucesso utilizando dieta microencapsulada composta principalmente de caseína, hidrolisado proteico de peixe e farinha de polvo após curto período de quatro dias de alimentação com rotíferos (YÚFERA; PASCUAL; FERNÁNDEZ-DÍAZ, 1999). Larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) mostram altas taxas de crescimento e sobrevivência quando criadas com dieta microparticulada após 12 dias de co-alimentação com náuplios de artêmia (JOMORI et al., 2008). Entretanto, a maioria dos estudos mostra redução da taxa de crescimento e sobrevivência das larvas quando microdietas são usadas em substituição total ou parcial do alimento vivo (BASKERVILLE-BRIDGES; KLING, 2000; LAZO et al., 2000; LEITÃO et al., 2011; MENOSSI et al., 2012), especialmente quando a transição alimentar é muito precoce e ocorre quando as larvas apresentam aparelho digestório indiferenciado (MENOSSI et al., 2012).

Existem diversos fatores relacionados ao baixo desempenho produtivo de larvas de peixes alimentadas com microdietas nas fases iniciais do desenvolvimento. De maneira geral, estes fatores podem ser reunidos em três categorias: (1) fatores que impactam a ingestão da dieta; (2) fatores que impactam a digestão, assimilação e metabolismo da dieta; (3) fatores que impactam ambos (HOLT; WEBB; RUST, 2011).

A larva precisa ingerir a microdieta antes de digerir e assimilar seus nutrientes, portanto, maximizar sua ingestão deve ser o primeiro objetivo a se buscar quando microdietas para larvas são produzidas. Os principais fatores relacionados à ingestão da microdieta são disponibilidade, aparência, atratividade, e textura da

partícula (ÖNAL; LANGDON, 2000). São as diferenças físicas e químicas entre os alimentos vivos e as microdietas que fazem com que as larvas tenham diferentes respostas frente a cada um desses alimentos.

A movimentação dos organismos vivos na coluna d'água favorece sua percepção e captura pelas larvas de peixes, seja pela visão ou pela ação dos neuromastos livres (MUKAI, 2006). Além disso, os componentes solúveis dos náuplios de artêmia estimulam o comportamento alimentar de larvas de pacu e favorecem a ingestão de microdietas inertes (TESSER; PORTELLA, 2006), assim como os aminoácidos lisina e glicina e o “complexo betaína” funcionam como atrativos químicos estimulando a ingestão de microdietas pelas larvas (TESSER; PORTELLA, 2011). Atrativos em microdietas são importantes para aumentar a percepção das partículas no ambiente aquático, porém o sabor/odor e a textura das microdietas também podem determinar sua aceitação pelas larvas. Por exemplo, larvas de pacu apresentam epitélio olfatório diferenciado com células quimiorreceptoras especializadas no final do período endotrófico (CLAVIJO-AYALA, 2008) e larvas de pintado *Pseudoplatystoma coruscans* exibem botões gustativos no início do período exotrófico, indicando a importância do paladar no comportamento alimentar da espécie (CESTAROLLI, 2005).

A dimensão da partícula é particularmente importante na alimentação inicial de larvas de peixes. Partículas muito grandes podem ser de difícil ingestão e partículas muito pequenas podem não ser identificadas pelas larvas (CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 2001); é o tamanho da abertura da boca que limita o tamanho da presa/partícula que pode ser ingerida (YÚFERA, 2011). De maneira geral, o tamanho ideal da partícula depende do estágio de desenvolvimento e da espécie (FERNÁNDEZ-DÍAZ; PASCUAL; YÚFERA, 1994). Tipicamente, microdietas para larvas de peixes possuem entre 25 e 250 μm de tamanho. A alta relação superfície/volume de partículas tão pequenas invariavelmente resulta em altas taxas de troca entre os nutrientes das partículas e o meio, o que favorece a rápida perda de compostos de baixo peso molecular e hidrossolúveis (LANGDON; BARROWS, 2011).

Em larvas de peixes, a quebra das partículas depende, exclusivamente, da ação de enzimas digestivas e ação mecânica dos movimentos peristálticos

(LANGDON; BARROWS, 2011). A falta do sistema digestório completamente funcional no início do desenvolvimento larval de muitas espécies de peixes sugere que as microdietas para larvas devam conter nutrientes prontamente digestíveis (LAZO; DARIAS; GISBERT, 2011).

Estudos indicam que as larvas se beneficiam da inclusão parcial de hidrolisados proteicos ou aminoácidos livres em suas dietas. O transporte intracelular de aminoácidos envolve numerosos transportadores expressos na membrana da borda estriada dos enterócitos das larvas, enquanto que a absorção de peptídeos ocorre via membrana apical dos enterócitos, importante rota para a absorção de proteínas e peptídeos dietéticos (CONCEIÇÃO; ARAGÃO; RØNNESTAD, 2011). Além disso, os hidrolisados proteicos adicionados em microdietas para larvas também são importantes do ponto de vista de atratividade, estimulando a resposta alimentar (KOLKOVSKI; CZENSNY, DABROWSKI, 2000).

A maior parte das dietas para larvas de peixes é feita por componentes dietéticos insolúveis unidos com ligantes insolúveis; entretanto, larvas de peixes no início do seu desenvolvimento requerem dietas com proteínas solúveis, peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos que são mais facilmente digeridos e absorvidos que proteínas complexas (CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 2001; CONCEIÇÃO; ARAGÃO; RØNNESTAD, 2011). Dessa forma, o maior desafio tecnológico do desenvolvimento da microdieta para larvas de peixes é produzir uma microdieta capaz de reter compostos de baixo peso molecular e nutrientes solúveis em água e fornecê-los às larvas em veículo digestível (YÚFERA et al., 2009). A técnica de microencapsulação tem importante papel neste aspecto.

O processo de microencapsulação consiste em recobrir o conteúdo de interesse por material que o isole, total ou parcialmente, do meio permitindo liberação controlada de seu conteúdo. Diferente das dietas microaglutinadas, que apresentam limitações para reter compostos de baixo peso molecular em meio aquoso, as dietas microencapsuladas são mais estáveis, sendo assim, mais eficientes em reter peptídeos, aminoácidos e vitaminas. Por outro lado, o principal problema de partículas produzidas por este processamento é a baixa digestibilidade das cápsulas por várias espécies de larvas de peixes (CAHU; ZAMBONINO-INFANTE, 2001; LANGDON, 2003).

As dietas microencapsuladas para larvas podem ser produzidas por diferentes processos, como: gelificação iônica externa ou interna, coacervação simples ou complexa e *spray-dryer* (YÚFERA et al., 2009). Dietas produzidas por gelificação iônica externa vêm sendo estudadas no Brasil há dez anos visando à alimentação de larvas de peixes de água doce (MUKAI-CORRÊA, 2003 e 2008; RODRIGUES, 2012) e mostraram boa aceitação por larvas de pacu (MUKAI-CORRÊA, 2008; RODRIGUES, 2012).

O método de gelificação iônica baseia-se na formação de matriz de gel pelo contato entre uma solução de polissacarídeos contendo nutrientes e uma solução iônica. As principais características das partículas produzidas por gelificação iônica externa são conteúdo multinucleado distribuído uniformemente na partícula, recuperação de seu tamanho e formato após a reidratação e teores de sólidos totais de até 12% (MUKAI-CORRÊA, 2008). Proteínas, carboidratos e partículas insolúveis em água podem ser microencapsuladas por gelificação iônica. Porém, este método apresenta restrições na retenção de compostos hidrossolúveis e de baixo peso molecular, como vitaminas e aminoácidos (VILLAMAR; LANGDON, 1993).

Por outro lado, partículas de gel recobertas com proteínas por interação eletrostática, por meio do método de coacervação complexa, apresentam maior estabilidade química (GBASSI et al., 2009) e matriz com menor porosidade em relação àquelas não recobertas. Além disso, partículas produzidas por gelificação iônica seguida de interação eletrostática com proteínas do soro de leite, apresentam altos teores de proteína e de umidade (RODRIGUES, 2012), similares ao observados em rotíferos e náuplios de artêmia usados como alimento inicial de larvas de peixes (BASKERVILLE-BRIDGES; KLING, 2000). Essas características, somadas ao baixo custo e facilidade do método e uso de condições brandas para sua produção, tornam essas partículas interessantes para serem usadas como microdietas para larvas de peixes.

Neste estudo, foram usados dois métodos de microencapsulação combinados, gelificação iônica e coacervação complexa, a fim de produzir microdietas para larvas altriciais de peixes de água doce. A avaliação das dietas microencapsuladas foi realizada utilizando larvas de pacu. Para tanto, foram considerados aspectos relacionados à aceitação das partículas, desempenho

produtivo, alterações morfológicas do trato digestório e celularidade do músculo esquelético das larvas, além da expressão de genes relacionados com a miogênese e crescimento muscular.

2. Referências

BASKERVILLE-BRIDGES, B.; KLING., L. J. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. **Aquaculture Nutrition**, Somerset, v. 6, n. 3, p. 171-182, 2000.

CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 200, n. 1-2, p. 161-180, 2001.

CESTAROLLI, M. A. **Larvicultura do pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassis, 1829): aspectos da alimentação e do desenvolvimento de estruturas sensoriais**. 2005. 110 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.

CLAVIJO-AYALA, J. A. **Ontogenia do sistema sensorial de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characidae: Serrasalminidae)**. 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.

CONCEIÇÃO, L.; ARAGÃO, C.; RØNNESTAD, I. Proteins. In: HOLT, J. G. **Larval Fish Nutrition**. 1. ed. West Sussex: Willey-Blackwell, 2011. cap. 3, p. 83-116.

FERNÁNDEZ-DÍAZ, C.; PASCUAL, E.; YÚFERA, M. Feeding behavior and prey size selection of gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae fed on inert and live food. **Marine Biology**, Berlin, v. 118, n. 2, p. 323-328, 1994.

GBASSI, G. K.; VANDAMME, T.; MARCHIONI, E.; ENNAHAR, S. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 103-105, 2009.

HOLT, G. J.; WEBB, K. A.; RUST, M. B. Microparticulate diets: testing and evaluation success. In: HOLT, J. G. **Larval Fish Nutrition**. 1. ed. West Sussex: Willey-Blackwell, 2011. cap. 13, p. 353-372.

JOMORI, R. K.; DUCATTI, C.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 370-381, 2008.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MARTINS, M. I. E. G.; PORTELLA, M. C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 243, n. 1-4, p. 175-183, 2005.

JOMORI, R. K. **Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* e o uso dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) como indicadores naturais da incorporação do alimento no tecido larval**. 2005. 121 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B.; PORTELLA, M. C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 221, n. 1-4, p. 277-287, 2003.

KOLKOVSKI, S.; CZENSNY, S.; DABROWSKI, K. Use of krill hydrolysate as a feed attractant for fish larvae and juveniles. **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 31, n. 1, p. 81-88, 2000.

LANGDON, C.; BARROWS, R. Microparticulate diets: technology. In: HOLT, J. G. **Larval Fish Nutrition**. 1. ed. West Sussex: Willey-Blackwell, 2011. cap. 12, p. 335-351.

LANGDON, C. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 227, n. 1-4, p. 259-275, 2003.

LAZO, J. P.; DARIAS, M. J.; GISBERT, E. Ontogeny of the digestive tract. In: HOLT, J. G. **Larval Fish Nutrition**. 1. ed. West Sussex: Willey-Blackwell, 2011. cap. 1, p. 5-46.

LAZO, J. P.; DINIZ, M. T.; HOLT, G. J.; FALK, C.; ARNOLD, C. R. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 188, n. 3-4, p. 339-351, 2000.

LEITÃO, N. J.; PAI-SILVA, M. D.; ALMEIDA, F. L. A.; PORTELLA, M. C. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 315, n. 1-2, p. 78-85. 2011.

MENOSSE, O. C. C.; TAKATA, R.; SANCHES-AMAYA, M. I.; FREITAS, T. M.; YÚFERA, M.; PORTELLA, M. C. Alimentação inicial de pacu com dieta microencapsulada produzida experimentalmente e sua relação com o crescimento e estruturas do sistema digestório. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 1, p. 1-10, 2012

MUKAI, Y. Role of free neuromasts in larval feeding of willow shiner *Gnathopogon elongatus caerulescens* Teleostei, Cyprinidae. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 72, n. 4, p. 705-709, 2006.

MUKAI-CORRÊA, R. **Produção de micropartículas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixes: Estudos em Sistema-Modelo com inclusão de micropartículas lipídicas ou emulsão lipídica e Teste *in vivo***. 2008. 151 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

MUKAI-CORRÊA, R. **Preparo e caracterização de microcápsulas obtidas por polimerização iônica para alimentação de larvas de peixe**. 2003. 173 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

ÖNAL, U.; LANGDON, C. Characterization in two microparticulate types for delivery of food to altricial fish larvae. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 159-170, 2000.

PORTELLA, M. C.; DABROWSKI, K. Diets, physiology, biochemistry and digestive tract development of freshwater fish larvae. In: CYRINO, J. E. P.; BUREAU, D. P.; KAPOOR, B. G. **Feeding and Digestive Functions of Fishes**. 1. ed. New Hampshire: Science Publishers, 2008. cap. 6, p. 227-279.

PORTELLA, M. C.; VERANI, J. R.; CESTAROLLI, M. A. Use of live and artificial diets enriched with several fatty acid sources to feed *Prochilodus scrofa* larvae and fingerlings. 1. Effects on survival and growth. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 45-58, 2000.

RODRIGUES, J. B. **Desenvolvimento de micropartículas contendo *Lactobacillus acidophilus* para alimentação de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas Campinas, 2012.

TESSER, M. B.; PORTELLA, M. C. Estimulantes alimentares para larvas de pacu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 9, p. 1851-1855, 2011.

TESSER, M. B.; PORTELLA, M. C. Ingestão de ração e comportamento de larvas de pacu em resposta a estímulos químicos e visuais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 1887-1892, 2006.

TESSER, M. B.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Co-feeding of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) larvae with *Artemia* Nauplii and microencapsulated diet. **Journal of Applied Aquaculture**, Philadelphia, v. 17, n. 2, p. 47-59, 2005.

VILLAMAR, D. F.; LANGDON, C. Delivery of dietary components to larval shrimps (*Penaeus vannamei*) by means of complex microcapsules. **Marine Biology**, Berlin, v. 115, n. 4, p. 635-642, 1993.

YÚFERA, M. Feeding behavior in larval fish. In: HOLT, J. G. **Larval Fish Nutrition**. 1. ed. West Sussex: Willey-Blackwell, 2011. cap. 10, p. 285-305.

YÚFERA, M.; PORTELLA, M. C.; DRUST, S.; PONCELET, D. Microencapsulation and Aquaculture. **Aquaculture Europe**, Oostende, v. 34, n. 3, p. 18-20, 2009.

YÚFERA, M.; PASCUAL, E.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. A highly efficient microencapsulated food for rearing early larvae of marine fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, n. 1-4, p. 249-256, 1999.

**CAPÍTULO 2 – PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE DIETAS MICROENCAPSULADAS
PARA TRANSIÇÃO ALIMENTAR DE LARVAS DE PACU *Piaractus
mesopotamicus***

Natalia de Jesus Leitão ^{a,c}, Juliana Bürger Rodrigues ^b, Carlos Raimundo Ferreira
Grosso ^b e Maria Célia Portella ^{a,c}

^a Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

E-mail: nati_leitao@yahoo.com.br

^b Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Alimentos de Nutrição, 13083-865, Campinas, SP, Brasil.

E-mails: julianaburger@hotmail.com; grosso@fea.unicamp.br

^c Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 14884-900, Jaboticabal,
SP, Brasil.

E-mail: portella@caunesp.unesp.br

Resumo

Dietas microencapsuladas foram produzidas e um experimento de transição alimentar com larvas de pacu foi conduzido para investigar sua eficiência. A produção das microdietas consistiu de um processo em duas etapas baseado na gelificação de pectina cítrica na presença de solução de cloreto de cálcio e na imersão das partículas em solução de concentrado proteico de soro de leite. As dietas foram estudadas por meio de avaliação física (tamanho e forma) e química (composição proximal e perfil de ácidos graxos), atratividade (volume do conteúdo estomacal), desempenho (crescimento e sobrevivência larval) e desenvolvimento do trato digestório (análises histológicas). O experimento de alimentação foi conduzido usando cinco dietas microencapsuladas produzidas com diferentes óleos vegetais (oliva, girassol, linhaça e sacha inchi) e óleo de peixe. Uma dieta comercial e alimento vivo (náuplios de artêmia) foram usados como controles. O método de microencapsulação utilizado nesse estudo produziu dietas com composição química e tamanhos semelhantes ao alimento vivo. As taxas de sobrevivência das larvas de pacu aos 44 dias pós-eclosão variaram de 73,1 a 90,8% com as dietas microencapsuladas, 61,4% com a dieta comercial e 97,5% com o alimento vivo. Entretanto, o desempenho de crescimento das larvas e o desenvolvimento do trato digestório foram afetados negativamente pelo uso das microdietas. Pouco desenvolvimento das dobras epiteliais intestinais, grânulos de proenzima fracamente corados no pâncreas e a ausência de pâncreas intra-hepático foram evidenciados nas larvas alimentadas com as dietas microencapsuladas em comparação aos tratamentos controle. Baseado nas observações do volume do conteúdo estomacal, nenhuma das dietas microencapsuladas foi rejeitada pelos peixes, embora o alimento vivo tenha sido mais atrativo.

Palavras-chave: larvas de peixes, alimentação, gelificação iônica, coacervação complexa, histologia do trato digestório

1. Introdução

Estudos vêm sendo conduzidos para se obter microdietas que possam substituir satisfatoriamente o alimento natural durante a fase larval de alguns peixes neotropicais (Furuya et al. 1999; Portella et al. 2000; Tesser et al. 2005; Jomori et al. 2008; Leitão et al. 2011; Menossi et al. 2012). Nesse contexto, é importante avaliar características da microdieta para explicar o sucesso ou o fracasso do seu uso na larvicultura de peixes (Baskerville-Bridges e Kling 2000). A partícula tem que ser visível e capturável pelas larvas. As larvas precisam ser capazes de digerir, absorver e assimilar os nutrientes, portanto, a digestibilidade e biodisponibilidade dos nutrientes desempenham importantes papéis. Por fim, a composição nutricional das microdietas deve atender às exigências nutricionais das larvas (Kvåle et al. 2006), que mudam rapidamente durante a ontogenia.

As dietas para larvas de peixes marinhos podem conter até 30% de lipídios, incorporados principalmente pelo uso de óleo de pescado de origem marinha, rico em ácidos graxos altamente insaturados (HUFAs) (Cahu e Zambonino-Infante 2001). Porém, entende-se que, para as espécies de água doce, ingredientes vegetais podem ser usados com principal fonte de lipídios em substituição ao óleo de pescado, visto que algumas espécies de peixes, com as espécies de água doce, são mais eficientes em converter α -linolênico e linoleico em HUFAs (Tocher 2003; Agaba et al. 2005).

Os níveis de proteína bruta nas dietas para larvas variam entre 55 e 60%, considerando a alta taxa de crescimento que os animais apresentam nesta fase (Cahu e Zambonino-Infante 2001). Parte dessa proteína pode ser substituída por hidrolisados proteicos, peptídeos ou aminoácidos livres, embora existam dificuldades técnicas para produzir microdietas de pequeno tamanho contendo nutrientes hidrossolúveis (Conceição et al. 2010).

Para substituir o alimento natural durante as fases iniciais do desenvolvimento larval, microdietas podem ser produzidas por diferentes métodos (Langdon 2003; Yúfera et al. 2009). Entre os métodos aplicados, a microencapsulação destaca-se como promissora, pois é capaz de proteger os nutrientes da dieta por uma parede que diminui as perdas para o meio, mas que permite a liberação desses nutrientes

após ingestão para serem digeridos e assimilados dentro do organismo de interesse (Gbassi et al. 2009). A microencapsulação de dietas para aquicultura pode ser obtida por vários processos, como a gelificação iônica externa (Mukai-Corrêa et al. 2005) ou interna (Yúfera et al. 2005), coacervação simples ou complexa (Alvim e Grosso 2010), *spray-dryer*, entre outras.

Mukai-Corrêa et al. (2005) desenvolveu uma dieta microencapsulada com alto teor de umidade (~90%) para larvas de peixes neotropicais pelo método de gelificação iônica externa. Este método consiste na formação de matriz de gel no momento que uma solução de polissacarídeos contendo nutrientes entra em contato com uma solução iônica. Entretanto, devido às dificuldades de se produzir partícula com alto teor proteico, os métodos tiveram que ser aperfeiçoados para se obter maior incorporação de proteína. A combinação dos métodos de gelificação iônica e coacervação complexa proposta por Rodrigues (2012) resultou em partículas com altos teores de umidade e proteína, semelhantes ao alimento natural das larvas de peixes. Essa característica pode tornar essas partículas promissoras para serem usadas como microdietas durante a fase de larvicultura.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o uso de dietas microencapsuladas, produzidas pela combinação dos métodos de gelificação iônica e coacervação complexa, na fase de transição alimentar de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus*, espécie de peixe neotropical, cujas larvas apresentam características altriciais. Neste estudo, as dietas microencapsuladas produzidas com diferentes fontes lipídicas foram comparadas a uma dieta comercial e a náuplios de artêmia em relação à composição nutricional, aceitação pelas larvas, desempenho e alterações morfológicas do trato digestório.

2. Material e métodos

2.1. Produção das dietas microencapsuladas

As dietas microencapsuladas foram produzidas na Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, Laboratório de Controle de Qualidade. As micropartículas

foram formuladas para conter níveis de umidade, proteína, lipídios e cinzas, baseados na composição dos náuplios de artêmia¹ (Bio Artêmia, Grossos, Brasil). A maior parte da proteína foi proveniente do concentrado proteico de soro de leite (Lacprodan, Porteña, Argentina). Concentrado proteico de peixe (CPSP 90, Sopropêche, Le Portel, França) foi usado principalmente como atrativo.

As dietas (M-OO; M-OG; M-OL; M-OSi e M-OP) foram produzidas variando-se apenas a fonte de óleo para que diferissem em relação ao perfil de ácidos graxos. Os óleos utilizados foram: óleo de oliva, óleo de girassol, óleo de linhaça, óleo de sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) e óleo de peixe (*“menhaden oil”*), respectivamente. Todos os óleos vegetais foram extraídos a frio. A Tabela 1 mostra a composição de ácidos graxos dos óleos utilizados na produção das dietas microencapsuladas experimentais.

¹ Composição aproximada dos náuplios recém-eclodidos: 200 g kg⁻¹ de matéria seca, 550 g kg⁻¹ de proteína bruta, 130 g kg⁻¹ de lipídios e 56 g kg⁻¹ de cinzas.

Tabela 1. Composição de ácidos graxos dos óleos utilizados na produção das dietas microencapsuladas.

Ésteres de Ácidos Graxos	Óleos				
	Oliva	Girassol	Linhaça	Sacha inchi	Peixe
Saturados					
C 10:0	-	-	-	-	-
C 12:0	0,01	-	0,01	-	0,13
C 13:0	0,16	-	-	-	0,07
C 14:0	0,01	0,04	-	-	5,33
C 15:0	-	0,16	-	-	0,81
C 16:0	17,06	3,63	6,15	4,08	25,84
C 18:0	2,33	4,14	5,61	3,26	6,82
C 19:0	-	-	-	-	-
C 20:0	-	0,37	-	-	-
C 21:0	-	0,05	-	-	-
C 22:0	-	1,25	-	-	-
C 23:0	-	0,10	-	-	-
C 24:0	-	0,45	-	-	-
∑ Saturados	19,56	10,20	11,77	4,37	39,00
Monoinsaturados					
C16:1n9	1,62	-	-	-	0,57
C18:1n9	62,69	86,43	21,35	11,39	24,27
C20:1n9	0,35	0,23	0,10	0,27	1,39
∑ Monoinsaturados	64,66	86,66	21,45	11,66	26,23
Polinsaturados					
C16:2n4	-	0,02	-	-	-
C16:3n4	-	0,04	-	-	-
C18:2n6	12,27	2,93	14,72	34,78	1,99
C18:3n3	0,80	0,04	52,07	46,22	-
C18:4n3	-	0,03	-	-	-
C20:4n6	-	0,02	-	-	-
C20:5n3	0,43	0,01	-	-	10,67
C22:5n3	-	-	-	-	0,83
C22:6n3	-	-	-	-	21,28
∑ Polinsaturados	13,50	3,10	66,78	81,00	34,77
∑ n-3/n-6	0,10	0,03	3,54	1,33	16,47

Valores representam as médias das amostras em triplicata e são apresentados como porcentagem do total de ésteres de ácidos graxos.

A preparação das dietas microencapsuladas foi baseada nos métodos descritos por Rodrigues (2012) e consistem na combinação dos processos de gelificação iônica e coacervação complexa. Pectina cítrica de baixo teor de esterificação não-amidada (2 g de pectina cítrica CPKelco, Limeira, Brasil) foi dissolvida em 100 mL de água aquecida à 40°C. Após atingir temperatura ambiente, a solução de pectina foi emulsificada com o óleo (1,65 g do óleo utilizado) e com

minerais e vitaminas (0,05 g de mistura mineral e vitamínica Fri-Ribe, Pitangueiras, Brasil). A emulsão foi pulverizada usando atomizador duplo fluido (1,5 mm) com fluxo de ar comprimido ($0,125 \text{ kgf cm}^{-2}$), posicionado a 12 cm da solução de cloreto de cálcio (2%, pH 4,0) sob agitação magnética constante. As partículas foram mantidas em agitação por 30 minutos para garantir completa gelificação. As partículas úmidas foram recolhidas em peneiras (malha com abertura de $125 \mu\text{m}$), lavadas em água (pH 4,0) e dispersas em 67 mL de solução proteica pH 4,0 (10,96 g de concentrado proteico de soro de leite e 0,05 g de concentrado proteico de peixe); as partículas foram mantidas sob agitação magnética constante por 30 minutos. Posteriormente, as partículas foram recolhidas em peneiras (malha com abertura de $125 \mu\text{m}$) e lavadas em água (pH 4,0). As partículas úmidas foram congeladas à -4°C , liofilizadas (Edwards Pirani 501, Crawley, West Sussex, Reino Unido) e acondicionadas em frascos protegidos de luz.

2.2. Métodos analíticos

Análises de composição proximal: Três amostras de cada dieta foram caracterizadas em relação à umidade (secagem a 105°C *overnight*), proteína bruta (LECO FP 528 nitrogen analyser, LECO Instruments, St Joseph, Michigan, EUA), lipídio (Bligh e Dyer, 1959), cinzas (incineração em mufla a 550°C por 8 horas) e energia bruta (bomba calorimétrica de Parr), de acordo como a metodologia da AOAC (2006). O fator de correção do nitrogênio usado no cálculo da proteína das dietas microencapsulas foi de 6,38, relativo à proteína do soro de leite. O conteúdo de lipídio das dietas microencapsuladas foi analisado após o rompimento das microcápsulas com 2% (p/p) de citrato de sódio e digestão enzimática com pepsina (0,3 mg/g; 4 horas) e pancreatina (0,3 mg/g; 12 horas), para a completa solubilização de seus componentes.

Análises de ácidos graxos: Os lipídios totais foram extraídos das dietas microencapsuladas pelo método de Bligh e Dyer (1959). A extração dos lipídios totais foi feita após rompimento das partículas e solubilização de seus componentes, como anteriormente descrito. Os lipídios totais dos peixes aos 44 dpe foram extraídos macerando o tecido com solução de clorofórmio-metanol-água (2:1:0,5)

(Folch et al. 1957) adaptada por Parrish (1999). Os lipídios extraídos dos peixes foram separados em lipídios polares (fosfolipídios) e lipídios neutros (triglicerídeos) usando coluna de sílica ativada (Yang 1995). Todas as análises foram feitas em triplicata.

Os lipídios totais extraídos de cada amostra e os óleos usados para a preparação das dietas microencapsuladas foram esterificados pelo método de Hartman e Lago (1973). A separação dos ésteres de ácidos graxos foi realizada por meio de cromatografia de gás (Varian 3600, Walnut Creek, USA) de acordo com o procedimento 2-66 (AOAC, 2006). Utilizou-se coluna capilar Agilent DB-23 (50% cyanopropyl-methylpolysiloxane) com as seguintes dimensões: 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. A temperatura da coluna foi programada para 110°C por 5 min, de 110 a 215°C à 5°C min⁻¹ e 215°C por 24 min. O volume injetado foi de 1 µL e gás hélio foi usado como carreador.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos separados foram identificados pela comparação de seus tempos de retenção com os tempos de retenção de padrões conhecidos (Sigma Supelco; Bellefonte, EUA²). Uma mistura padrão de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) também foi usada com referência para a identificação dos ácidos graxos ("PUFA-3 from Menhaden Oil", Sigma Supelco; Bellefonte, EUA³). Os padrões foram diluídos em éter de petróleo e injetados na quantidade de 1 µL.

2.3. Morfologia e microestrutura das partículas

A morfologia das microcápsulas reidratadas foi observada em microscópio óptico (Jenaval, Carl Zeiss, Toronto, Canadá) com captação de imagens por câmara

² Ácido caproico (C6:0); ácido enântico (C7:0); ácido caprílico (C8:0); ácido pelargônico (C9:0); ácido cáprico (C10:0); ácido undecanoico (C11:0); ácido láurico (C12:0); ácido tridecanoico (C13:0); ácido mirístico (C14:0); ácido pentadecanoico (C15:0); ácido palmítico (C16:0); ácido esteárico (C18:0); ácido nonadecanoico (C19:0); ácido araquídico (C20:0); ácido heneicosanoico (C21:0); ácido bênico (C22:0); ácido tricosanoico (C23:0); ácido lignocérico (C24:0).

³ Ácido mirístico (C14:0); ácido palmítico (C16:0); ácido palmitoleico (C16:1); C16:2n4; C16:3n4; ácido esteárico (C18:0); ácido margaroleico (C17:1); ácido cis-vacênico (C18:1n-7); ácido oleico (C18:1n-9); ácido linoléico (C18:2n-6); ácido α-linolênico (C18:3n-3); ácido γ-linolênico (C18:3n-4); ácido estearidônico (C18:4n-3); ácido gadoleico (C20:1n-9); ácido araquidônico (C20:4n-6); ácido eicosatetraenoico (C20:4n-3); ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3); ácido docosapentaenoico (C22:5n-3) e ácido docosahexaenoico (C22:6n-3).

digital, usando objetiva 12,5 X, optovar 1,25 X e o programa EDN-2 – “Microscopy Image Porcessing System”. A microestrutura das partículas liofilizadas foi observada em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol (T300, Japão), utilizando-se potência de 15 kV. As amostras foram previamente fixadas em “stubs” com fita metálica dupla face e recobertas com fina camada de ouro (40 mA/150 s) por meio do vaporizador Baltzer SCD50 (Baltec, Liechtensten).

2.4. Distribuição de tamanho das partículas

O diâmetro das partículas foi determinado em micrômetros (μm) utilizando-se o medidor de tamanho Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Três amostras de cada dieta microencapsulada liofilizada foram suspensas em água pH 7,0. O diâmetro das partículas reidratadas foi determinado imediatamente após reidratação e após 1 hora de agitação constante (homogeneizador de soluções AP 22 Phoenix, Araraquara, Brasil). Os resultados de distribuição de tamanho são apresentados como $d(0,1)$, $d(0,5)$ e $d(0,9)$, correspondentes aos diâmetros das partículas determinadas nos 10^o, 50^o e 90^o percentil, respectivamente, da curva de distribuição das partículas.

2.5. Alimentação das larvas

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, durante os meses de dezembro de 2010 e janeiro de 2011. Após a abertura da boca (quatro dias pós-eclosão, 4 dpe), larvas de pacu foram transferidas para tanques com volume útil de 50 L em sistema de água em fluxo contínuo. Aeração constante foi mantida para assegurar adequada oxigenação da água. Cada tanque continha aproximadamente 1000 larvas (20 larvas L^{-1}). A temperatura e o oxigênio dissolvido foram monitorados e registrados diariamente e as demais variáveis de qualidade de água semanalmente, a fim de manter segura e estável as condições ambientais: 29,8 °C; 5,1 mg L^{-1} O_2 ; 30,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ NH_3 ; 205,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ NO_3 ; n.d. NO_2 ; pH 8,2 e condutividade de 162,5 $\mu\text{S cm}^{-1}$, valores considerados adequados para a criação de peixes (Boyd

1999). Alta vazão (200 mL min^{-1}) permitiu a renovação total de água dos tanques a cada 4 horas. Os tanques foram mantidos nas condições de fotoperíodo natural.

Náuplios de artêmia foram fornecidos às larvas como primeiro alimento exógeno; inicialmente 250 náuplios larvas⁻¹ por dia e a cada três dias dobrou-se a quantidade. As dietas microencapsuladas foram introduzidas a partir de 16 dpe; neste momento, as larvas foram reestocadas nos tanques com densidade de 10 larvas L⁻¹. Por três dias, as larvas foram co-alimentadas com náuplios de artêmia em quantidades decrescente (1500, 750 e 250 náuplios larva⁻¹).

Cinco dietas experimentais (M-OO; M-OG; M-OL; M-OSi e M-OP) e uma dieta comercial (Hatchfry Encapsulon, Argent, EUA) foram randomicamente atribuídas a 24 tanques com quatro réplicas por tratamento. A dieta Hatchfry Encapsulon, testada anteriormente com larvas de pacu (Tesser e Portella 2003, Tesser et al. 2005), foi usada como controle para comparação com as dietas microencapsuladas experimentais. Náuplios de artêmia também foram usados como controle em quatro tanques adicionais.

Cinco vezes ao dia (8:00, 11:00, 14:00, 17:00 e 20:00 h), 0,5 g de dieta microencapsulada foi oferecida por tanque, totalizando 2,5 g de dieta por tanque diariamente. O tratamento controle com alimento vivo recebeu diariamente 2000 náuplios larva⁻¹, com a intenção de manter a mesma quantidade em peso seco de náuplios de artêmia e de dieta microencapsulada. A circulação da água foi interrompida por 30 minutos após o fornecimento das dietas para evitar dispersão e possível perda. Diariamente, os resíduos acumulados no fundo dos tanques foram removidos por sifonamento e as larvas mortas foram retiradas e os dados registrados.

Cem larvas foram amostradas aos 16 dpe para as medições iniciais de comprimento e peso úmido. Amostras de vinte e cinco juvenis por tanque foram coletadas aos 23, 30, 37 e 44 dpe. Os animais foram anestesiados e eutanasiados em solução de benzocaína ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), fixados em formalina 10% por 24 horas e preservados em etanol 70%. O comprimento total foi obtido utilizando-se paquímetro digital Starrett modelo 799A-6/150 (precisão 0,1 mm) e o peso individual foi determinado utilizando-se balança analítica digital Chyo modelo JS-110 (precisão 0,1 mg). Aos 44 dpe, todos os juvenis em cada tanque foram contados e a taxa de

sobrevivência calculada, descontando-se o número de larvas e juvenis amostrados ao longo do experimento. A taxa de canibalismo aparente (C) foi obtida a partir dos dados percentuais da taxa de sobrevivência aos 44 dpe (S) e os dados percentuais dos animais contabilizados como mortos (M) em cada tanque durante todo o experimento, de acordo com a seguinte expressão: $C = 100 - (S + M)$.

2.6. Volume do conteúdo estomacal

A observação do conteúdo estomacal foi feita para determinar a ingestão das dietas microencapsuladas e dos náuplios de artêmia pelos pacus. Três tanques de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente para a realização deste ensaio. Aos 44 dpe, 50 pacus por tanque foram amostrados e classificados nas seguintes categorias, de acordo com o volume de alimento presente no estômago: 0%, <50%, >50%, 100% (Figura 1).

Pacus mantidos em jejum por 12 horas foram alimentados com as dietas microencapsuladas ou com náuplios de artêmia. Para cada tanque foi fornecido 0,5 g da dieta microencapsulada ou 400 náuplios de artêmia; quantidade equivalente à fornecida em cada uma das alimentações durante o experimento. Após 30 minutos, os pacus foram abatidos em gelo e seus tratos digestórios dissecados. As observações foram feitas usando um estereomicroscópio Olympus modelo SZ2-ILST. O volume do conteúdo estomacal foi expresso em porcentagem de juvenis dentro de cada categoria.

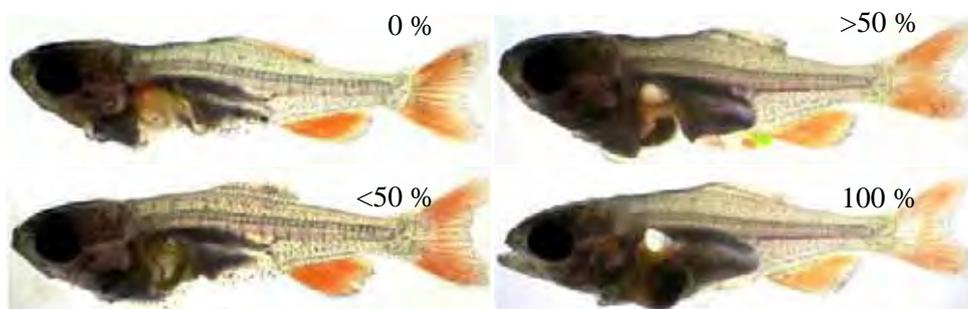


Figura 1. Classificação dos pacus aos 44 dpe em uma escala de 0 a 100%, de acordo com o volume de alimento presente no estômago.

2.7. Análises histológicas

Amostras de larvas e juvenis para as análises histológicas foram tomadas aos 16 e 44 dpe, respectivamente. Cinco animais foram retirados de cada tanque antes da primeira alimentação do dia. Os animais foram anestesiados, abatidos em benzocaína (0,2 g L⁻¹) e, posteriormente, dissecados para a coleta do trato digestório. A cabeça, cauda e região dorsal da musculatura foram seccionadas e descartadas; a secção contendo o trato digestório foi preservada em paraformaldeído 4%. As amostras (n = 10 por tratamento; amostras representativas do comprimento médio das larvas do tratamento) foram incluídas em *Historesina*® (Leica, Germany) segundo recomendações do fabricante com modificações. As amostras foram retiradas da solução de fixação, lavadas em água e pré-infiltradas por 4 horas com solução de glicol-metacrilato + ativador (embedding kit, Leica) e água destilada (1:1 v/v), em seguida seguiu-se com o método indicado. O uso da água em substituição ao etanol teve a intenção de preservar o conteúdo lipídico das estruturas.

Secções sagitais (4 µm) foram obtidas com a utilização de micrótomo LEICA modelo RM 2245, utilizando-se navalhas de vidro e, posteriormente, coradas com Hematoxilina de Harris e Floxina 0,5% (HF) para as observações morfológicas. As mucinas neutras no trato digestivo e o glicogênio hepático foram identificados pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS) e as mucinas ácidas foram identificadas pela técnica de coloração com Azul de Alcian pH 2,5. A presença de grânulos de zimogênio no pâncreas foi confirmada pelo método eosina-orange G- floxina (EOF) (Menossi et al., 2012) e a presença de inclusões lipídicas no fígado e intestino pela coloração com Sudan negro B (solução etanólica 3,5%) (Zambonino-Infante et al. 2008). As amostras coradas com Azul de Alcian pH 2,5 e com Sudan negro B foram contracoradas com Floxina 0,5% e Vermelho neutro 1%, respectivamente.

2.8. Análises estatísticas

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado. Cada tratamento foi aleatoriamente atribuído a quatro tanques experimentais (n = 4). Larvas foram

amostradas de todos os tanques nos períodos de coleta e médias dos parâmetros zootécnicos em cada tanque foram obtidas; as médias foram usadas nas análises estatísticas. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SAS versão 9.0 (*SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA*). Os tratamentos foram comparados entre si em cada período de coleta. A normalidade dos erros (Cramer Von Mises) e a homogeneidade das variâncias (Brown-Forsythe) foram testadas para assegurar as pressuposições das análises. Valores expressos em porcentagem (taxas de sobrevivência e canibalismo) foram transformados (arcoseno) antes da análise de variância. Dados de peso, comprimento, sobrevivência e canibalismo foram analisados usando ANOVA e diferenças devido à dieta foram consideradas significativas a 5% de probabilidade; as médias foram estudadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados de volume do conteúdo estomacal foram transformados (arcoseno) e, posteriormente, analisados pelo programa GraphPad InStat 3.06 (*GraphPad Software, San Diego, California, EUA*) utilizando o teste de comparação múltipla Student-Newman-Keuls, com confiança de 95%.

3. Resultados

3.1. Análises das dietas e peixes

A composição proximal das dietas microencapsuladas produzidas por gelificação iônica seguida por coacervação complexa foi semelhante (Tabela 2). A análise proximal revelou baixos teores de matéria seca e elevados teores de proteína nas dietas, similares aos náuplios de artêmia.

O teor de lipídios das dietas microencapsuladas experimentais foi acima do desejado (130 g kg^{-1} , nos náuplios de artêmia) e variou de 234 a 244 g kg^{-1} . Em contraste, a quantidade de cinzas das dietas foi menor que o nível alvo (56 g kg^{-1}) e atingiu seu maior valor (12 g kg^{-1}) na dieta M-OG (Tabela 2).

A Tabela 3 mostra a composição de ácidos graxos das dietas microencapsuladas. A maior e a menor quantidade de PUFA foram observadas nas dietas M-OSi e M-OG, produzidas com óleo de sacha inchi e óleo de girassol,

respectivamente. Alta quantidade de ácido α -linolênico foi fornecida pelo óleo de linhaça (Tabela 1), com relação n-3/n-6 próximo de 4 na dieta M-OL (Tabela 3). Embora a dieta M-OSi apresentasse alta quantidade de ácido α -linolênico, a relação n-3/n-6 foi próxima de 1 devido a alta quantidade de ácido linoléico presente na dieta. Relações n-3/n-6 próximas de zero foram observadas nas dietas M-OG e M-OO.

Tabela 2. Composição proximal dos náuplios de artêmia e das dietas microencapsuladas usadas na transição alimentar de larvas de pacu.

Dieta	Proteína (g kg ⁻¹)	Lipídio (g kg ⁻¹)	Cinzas (g kg ⁻¹)	Matéria seca (g kg ⁻¹)	Energia Bruta (kcal kg ⁻¹)
Artêmia	547	130	56	217	-
Comercial ¹	525	170	134	904	4049
M-OO ²	555	240	11	142	4830
M-OG ³	551	241	12	141	4658
M-OL ⁴	529	244	11	133	4837
M-OSi ⁵	552	234	11	139	5026
M-OP ⁶	547	237	11	144	4868

¹ Dieta Hatchfry Encapsulon, Argent, EUA

² M-OO: Dieta microencapsulada produzida com óleo de oliva

³ M-OG: Dieta microencapsulada produzida com óleo de girassol

⁴ M-OL: Dieta microencapsulada produzida com óleo de linhaça

⁵ M-OSi: Dieta microencapsulada produzida com óleo de sachá inchi

⁶ M-OP: Dieta microencapsulada produzida com óleo de peixe ("menhaden oil")

Ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) (principalmente ácido oleico) foram encontrados em maior quantidade nas dietas M-OO e M-OG produzidas com os óleos de oliva e girassol, respectivamente (Tabela 3). O óleo de peixe forneceu à dieta M-OP as maiores quantidades dos ácidos araquidônico (ARA), eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA), embora os valores tenham sido bastante inferiores aos identificados no óleo de peixe usado no preparo da dieta (Tabela 1). A maior proporção de ácidos graxos saturados foi encontrada na dieta M-OP, devido à presença de grande quantidade de ácido palmítico.

Tabela 3. Composição de ácidos graxos das dietas microencapsuladas produzidas pela combinação dos processos de gelificação iônica e coacervação complexa.

Ésteres de Ácidos Graxos	Dietas Microencapsuladas				
	M-OO	M-OG	M-OL	M-OSi	M-OP
Saturados					
C 10:0	-	-	-	-	0,15
C 12:0	-	0,75	-	-	0,49
C 13:0	-	0,97	-	-	0,07
C 14:0	-	0,61	0,63	-	8,92
C 15:0	-	0,08	-	-	1,30
C 16:0	16,34	4,79	8,12	5,41	37,43
C 18:0	1,74	5,87	6,01	3,46	9,30
C 19:0	0,85	-	-	-	-
C 20:0	0,25	0,23	-	-	0,42
C 21:0	-	-	-	-	-
C 22:0	-	0,64	-	-	-
C 23:0	0,41	0,03	-	-	-
C 24:0	-	0,20	-	-	-
Σ Saturados	19,58	14,17	14,76	8,87	58,08
Monoinsaturados					
C 16:1n9	1,56	0,17	-	-	7,87
C 18:1n9	66,44	82,27	20,73	10,68	23,56
C 20:1n9	-	0,16	-	0,21	1,07
Σ Monoinsaturados	68,00	82,59	20,73	10,89	32,5
Polinsaturados					
C 16:2n4	0,16	0,05	-	-	-
C 16:3n4	-	0,06	-	-	-
C 18:2n6	11,29	2,91	13,90	34,65	1,16
C 18:3n3	0,57	0,12	50,61	45,60	0,57
C 18:4n3	-	0,05	-	-	0,39
C 20:4n6	-	0,02	-	-	0,99
C 20:5n3	0,41	-	-	-	2,38
C 22:5n3	-	-	-	-	0,40
C 22:6n3	-	-	-	-	2,34
Σ Polinsaturados	12,43	3,22	64,51	80,25	8,23
Σ n-3/n-6	0,09	0,06	3,64	1,32	2,83

Dietas microencapsuladas produzidas com óleo de oliva (M-OO), óleo de girassol (M-OG), óleo de linhaça (M-OL), óleo de sacha inchi (M-OSi), óleo de peixe (M-OP).

Os ácidos graxos dos juvenis de pacu (44 dpe) foram separados em fração neutra e polar a fim de identificar os ácidos graxos direcionados para o armazenamento energético (neutros) e aqueles constituintes das membranas celulares (polares).

Na fração lipídica neutra dos juvenis alimentados com a dieta M-OO, M-OL e M-OSi, foram encontradas altas porcentagens dos PUFA's (principalmente linoleico e

linolênico), enquanto que altas porcentagens de MUFAs foram observadas nos juvenis alimentados com a dieta M-OG (Tabela 4). De maneira geral, o monoinsaturado encontrado em maior porcentagem nos tecidos dos peixes foi o ácido oleico seguido do palmitoleico.

A fração polar do tecido dos peixes apresentou pouca variação em função do alimento fornecido (Tabela 5). As quantidades de EPA e DHA, assim como o total dos HUFAs foram similares em todos os tratamentos.

Tabela 4. Composição de lipídios neutros dos pacus aos 16 e 44 dpe de alimentação.

Ésteres de Ácidos Graxos	Tratamentos				
	M-OO	M-OG	M-OL	M-OSi	M-OP
Saturados					
C 12:0	0,32	0,40	0,21	0,18	-
C 14:0	0,42	8,88	0,40	3,26	10,31
C 15:0	-	0,86	0,16	0,49	-
C 16:0	8,43	17,16	9,29	16,83	11,14
C 17:0	0,17	0,72	0,13	0,56	-
C 18:0	3,67	5,90	2,65	5,69	4,14
C 20:0	0,21	0,47	0,24	0,47	1,02
C 22:0	0,36	0,32	0,12	0,27	1,16
Σ Saturados	13,58	34,71	13,21	27,76	27,77
Monoinsaturados					
C 16:1n9	0,36	5,77	1,49	3,03	1,59
C 17:1	0,16	0,26	0,20	0,22	-
C 18:1n9	34,56	59,17	45,11	26,77	59,35
C 20:1n9	0,24	1,73	0,28	0,72	1,14
Σ Monoinsaturados	35,32	66,93	47,08	30,74	62,07
Polinsaturados					
C 18:2n6	13,47	5,60	21,73	18,03	7,06
C 18:3n3	37,20	0,76	19,08	20,44	1,17
C 20:4n6	-	-	-	0,87	0,96
C 20:5n3	-	0,67	-	1,81	2,70
C 22:5n3	-	0,33	-	0,56	1,35
C 22:6n3	-	0,73	-	2,60	5,77
Σ Polinsaturados	50,68	8,09	40,80	44,30	19,02

Larvas alimentadas com dieta comercial Hatchfry Encapsulon (Argent) e dietas microencapsuladas produzidas com óleo de oliva (M-OO), óleo de girassol (M-OG), óleo de linhaça (M-OL), óleo de sacha inchi (M-OSi), óleo de peixe (M-OP).

Tabela 5. Composição de fosfolipídios dos pacus aos 16 e 44 dpe de alimentação.

Ésteres de Ácidos Graxos	Tratamentos				
	M-OO	M-OG	M-OL	M-OSi	M-OP
Saturados					
C 12:0	-	-	-	-	0,14
C 14:0	8,48	0,08	-	-	3,54
C 15:0	0,82	-	-	-	0,44
C 16:0	19,33	7,56	9,52	9,23	13,54
C 17:0	0,73	0,09	1,10	1,04	0,40
C 18:0	9,66	6,91	10,79	10,79	3,92
C 20:0	0,54	0,30	-	1,36	0,48
C 22:0	0,25	0,70	-	-	0,15
Σ Saturados	39,82	15,64	21,42	22,42	22,62
Monoinsaturados					
C 16:1n9	3,37	0,59	-	-	5,83
C 17:1	0,28	0,10	-	-	0,37
C 18:1n9	44,98	69,63	54,68	52,92	46,34
C 20:1n9	1,32	0,93	-	1,02	1,07
Σ Monoinsaturados	49,95	71,25	54,68	53,94	53,61
Polinsaturados					
C 18:2n6	4,46	5,23	7,86	9,89	5,79
C 18:3n3	0,57	0,31	2,46	2,59	1,02
C 20:4n6	3,34	2,77	3,62	3,30	1,50
C 20:5n3	0,52	0,58	1,75	1,39	4,77
C 22:5n3	0,64	0,65	1,56	1,25	1,28
C 22:6n3	3,35	4,01	7,20	6,41	8,90
Σ Polinsaturados	12,87	13,55	24,45	24,84	23,26

Larvas alimentadas com dieta comercial Hatchfry Encapsulon (Argent) e dietas microencapsuladas produzidas com óleo de oliva (M-OO), óleo de girassol (M-OG), óleo de linhaça (M-OL), óleo de sacha inchi (M-OSi), óleo de peixe (M-OP).

3.2. Microestrutura, morfologia e tamanho das microcápsulas

A ultraestrutura das partículas indica que as dietas microencapsuladas produzidas com diferentes fontes de óleo apresentaram formatos semelhantes e mantiveram-se íntegras após o processo de liofilização (Figura 2). As partículas liofilizadas exibiram contorno esférico, superfície rugosas, porém sem fissuras, e glóbulos de lipídios no material de parede. Partículas com superfície menos rugosa foram observadas nas dietas M-OL e M-OSi.

Ocorreu leve aglomeração entre as partículas após o processo de liofilização. Entretanto, esta aglomeração não comprometeu a integridade das partículas e sua dispersão na água após reidratação.

A observação das partículas, por microscopia óptica, mostra a formação de matriz multinucleada com parede definida e contínua ao redor da partícula (Tabela 6). O conteúdo lipídico apresentou-se uniformemente disperso na matriz de pectina; gotas lipídicas de tamanhos variáveis ocuparam toda a sua extensão. As partículas produzidas foram de formatos variados, com tendência ao formato esférico ou aproximadamente esférico.

As dietas microencapsuladas experimentais não apresentaram variação de tamanho durante uma hora de reidratação (Tabela 6). A distribuição de tamanho das partículas se dá em ampla faixa, compreendida entre 90 a 750 μm . O tamanho úmido $d(0,5)$ variou de 250 a 300 μm .

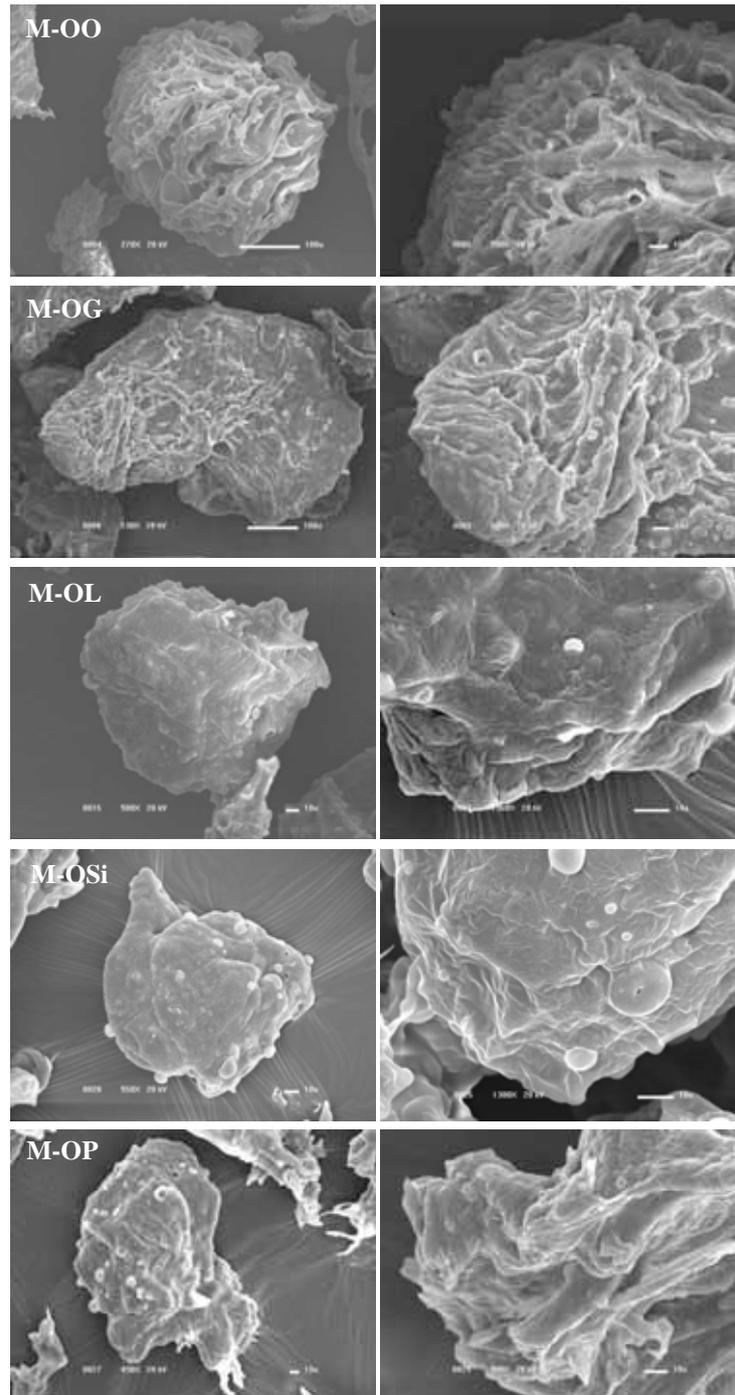
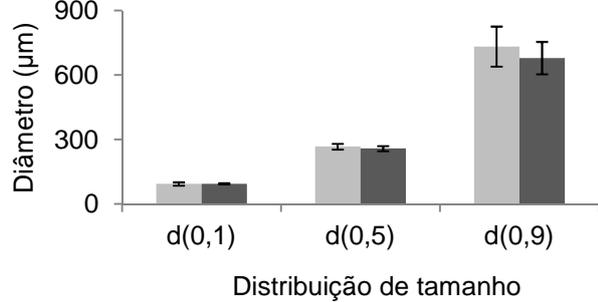
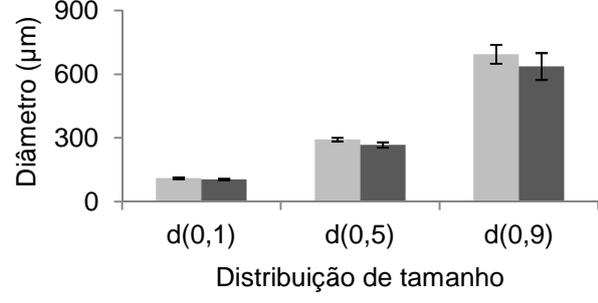
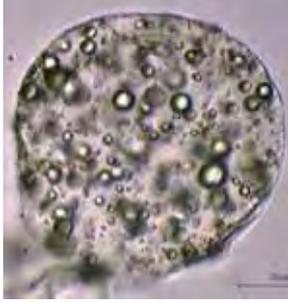
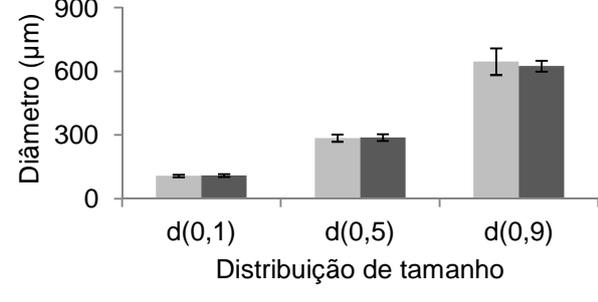
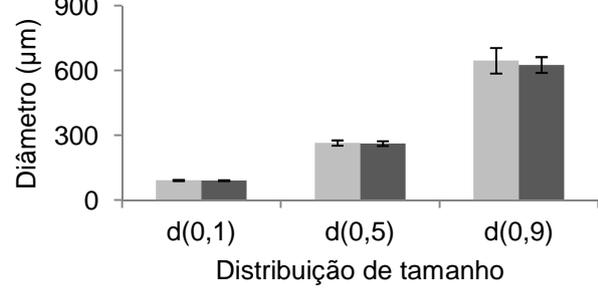


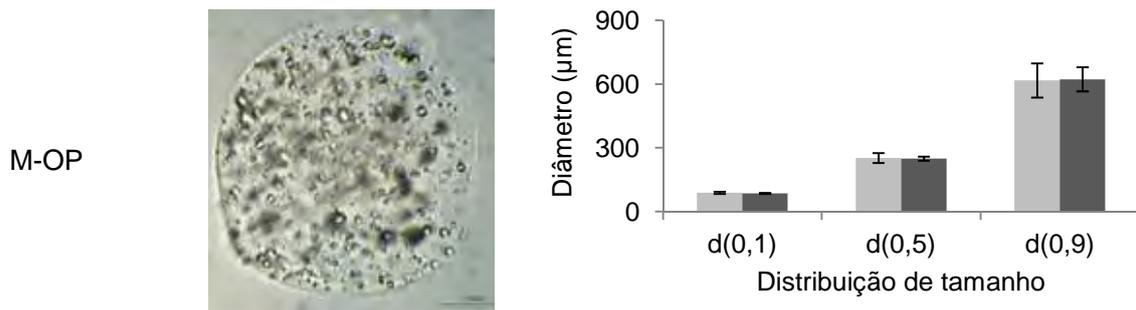
Figura 2. Morfologia externa das microcápsulas obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A coluna da esquerda mostra o aspecto geral da microcápsula e coluna da direita mostra o detalhamento da parede da microcápsula. Dietas microencapsuladas produzidas com óleo de oliva (M-OO), óleo de girassol (M-OG), óleo de linhaça (M-OL), óleo de sacha inchi (M-OSi), óleo de peixe (M-OP).

Tabela 6. Morfologia e distribuição de tamanho das dietas produzidas pela combinação dos processos de gelificação iônica e coacervação complexa após hidratação.

Dietas	Morfologia ¹	Distribuição de tamanho ²
M-OO		
M-OG		
M-OL		
M-OSi		

Continua...

Continuação Tabela 6.



Dietas microencapsuladas produzidas com óleo de oliva (M-OO), óleo de girassol (M-OG), óleo de linhaça (M-OL), óleo de sacha inchi (M-OSi), óleo de peixe (M-OP).

¹ Morfologia obtida por microscopia óptica das dietas microencapsuladas reidratadas após liofilização.

² Distribuição de tamanho das dietas microencapsuladas liofilizadas (n=3) determinada imediatamente após contato com água (barras claras) e após 1 hora de reidratação (barras escuras); d(0,1), d(0,5) e d(0,9) correspondem aos diâmetros das partículas determinadas nos 10^o, 50^o e 90^o percentil, respectivamente, da curva de distribuição das partículas.

3.3. Alimentação das larvas e juvenis

Ocorreu diferença ($p < 0,05$) entre as médias de peso e comprimento desde a primeira semana de alimentação com as dietas microencapsuladas (Tabela 7). Os juvenis de pacu mantidos com alimentação à base de náuplios de artêmia eram maiores e mais pesados que os juvenis alimentados com as dietas microencapsuladas ($p < 0,05$). Os juvenis alimentados com a dieta comercial passaram satisfatoriamente pela transição alimentar e apresentaram peso e comprimento superiores aos juvenis alimentados com as demais dietas microencapsuladas ($p < 0,05$). Entretanto, pacus alimentados com as dietas microencapsuladas experimentais tiveram pequeno ganho em peso dos 16 aos 44 dpe. A dieta M-OP produziu juvenis menores e mais leves comparados às demais dietas microencapsuladas experimentais testadas ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. Peso úmido e comprimento total dos pacus. Valores representam média±desvio padrão de quatro réplicas.

Dieta	Artêmia	Comercial	M-OO	M-OG	M-OL	M-OSi	O-OP
<i>Peso (mg)</i>							
23 dpe	69,1±1,5 A	49,5±7,1 B	22,1±1,5 C	23,3±2,9 C	25,4±3,2 C	26,7±3,2 C	21,2±1,7 C
30 dpe	175,6±2,1 A	107,0±3,2 B	29,2±2,4 C	29,8±2,2 C	31,8±3,4 C	29,7±1,4 C	29,2±0,8 C
37 dpe	198,5±3,0 A	170,9±7,9 B	30,2±3,4 C	33,1±6,4 C	33,9±2,7 C	31,7±4,5 C	31,8±1,5 C
44 dpe	250,5±4,1 A	211,3±3,0 B	38,5±2,1 C	42,3±3,7 C	37,9±2,7 CD	38,5±4,1 C	32,1±4,5 D
<i>Comprimento (mm)</i>							
23 dpe	18,0±0,1 A	16,3±0,4 B	14,3±0,8 C	14,9±0,7 C	14,6±0,6 C	14,5±0,5 C	14,2±0,3 C
30 dpe	22,5±0,1 A	19,2±0,6 B	14,7±0,1 C	14,7±0,4 C	14,9±0,2 C	14,6±0,2 C	14,3±0,3 C
37 dpe	23,4±0,3 A	22,0±0,3 B	14,8±0,4 C	15,1±0,7 C	14,7±0,3 C	14,6±0,3 C	14,7±0,5 C
44 dpe	24,7±0,4 A	23,1±0,3 B	15,6±0,4 C	15,8±0,3 C	15,1±0,5 CD	15,8±0,5 C	14,6±0,6 D

Dieta comercial Hatchfry Encapsulon (Argent, EUA) e dietas microcapsuladas produzidas com óleo de oliva (M-OO), óleo de girassol (M-OG), óleo de linhaça (M-OL), óleo de sacha inchi (M-OSi), óleo de peixe (M-OP).

Teste de Tukey foi realizado com as médias das repetições. Tratamentos com letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

As maiores taxas de sobrevivência ($p>0,05$) ocorreram no tratamento controle com náuplios de artêmia (97,5%) e com o uso das dietas microencapsuladas M-OG (90,8%), M-OSi (90,2%) e M-OO (88,9%) (Figura 3). Entre as dietas microencapsuladas produzidas com óleos vegetais, a dieta M-OL foi a única que proporcionou sobrevivência inferior (86,6%) a obtida com náuplios de artêmia ($p<0,05$). Entre os juvenis alimentados com a dieta comercial e com a dieta M-OP ocorreu maior mortalidade devido à alta incidência de canibalismo, por isso os valores de sobrevivência reduziram para 61,4 e 73,1%, respectivamente.

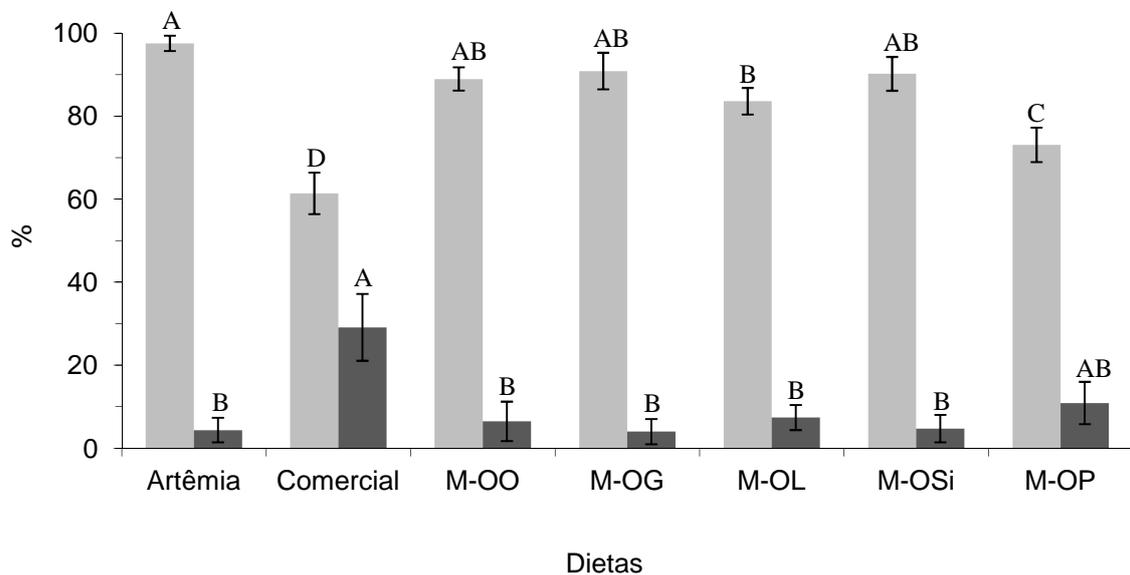


Figura 3. Taxas de sobrevivência e canibalismo aparente dos pacus aos 44 dpe. Barras claras representam os valores médios de sobrevivência e barras escuras representam os valores médios de canibalismo. A taxa de canibalismo aparente foi calculada a partir dos dados percentuais de sobrevivência e do total de larvas mortas retiradas diariamente dos tanques. Tratamentos com letras iguais entre as colunas claras ou entre as colunas escuras não diferem estatisticamente ($p>0,05$). Teste de Tukey foi realizado com as médias de quatro repetições.

Dieta comercial Hatchfry Encapsulon (Argent, EUA) e dietas microencapsuladas produzidas com óleo de oliva (M-OO), óleo de girassol (M-OG), óleo de linhaça (M-OL), óleo de sacha inchi (M-OSi) e óleo de peixe (M-OP).

Aos 44 dpe, os juvenis de pacu ingeriram grandes quantidades de náuplios de artêmia e se alimentaram avidamente nos tanques. A maioria dos juvenis analisados ($p<0,05$) apresentou estômago totalmente repleto por náuplios de artêmia (Tabela 8).

Tabela 8. Volume do conteúdo estomacal de larvas de pacu aos 44 dpe. Cinquenta larvas por tanque foram amostradas e classificadas (0%, <50%, >50% e 100%) de acordo com o volume de alimento presente no estômago.

Dieta	0%	< 50%	> 50%	100%
Artêmia	-	2,7 ± 1,3 B	33,3 ± 1,3	64,0 ± 2,3 A
Comercial	-	22,0 ± 3,5 A	76,7 ± 2,9	1,3 ± 0,7 B
M-OO	-	41,3 ± 10,5 A	58,0 ± 10,6	0,7 ± 0,7 B
M-OG	-	39,0 ± 13,4 A	61,0 ± 13,4	0,0 ± 0,0 B
M-OL	-	59,0 ± 14,3 A	40,3 ± 14,5	0,7 ± 0,7 B
M-OSi	-	68,3 ± 1,5 A	31,7 ± 1,5	0,0 ± 0,0 B
M-OP	-	62,0 ± 15,5 A	37,0 ± 14,5	0,0 ± 0,0 B

O volume do conteúdo estomacal foi pontuado de acordo com a Figura 1.

Valores (média ± desvio padrão) representam a porcentagem de larvas dentro de cada categoria de volume do conteúdo estomacal por tratamento. Teste de comparação múltipla Student-Newman-Keus foi realizado com as médias de cada categoria. Tratamentos com letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

Dieta comercial Hatchfry Encapsulon (Argent, EUA) e dietas microencapsuladas produzidas com óleo de oliva (M-OO), óleo de girassol (M-OG), óleo de linhaça (M-OL), óleo de sacha inchi (M-OSi) e óleo de peixe (M-OP).

O volume do conteúdo estomacal indicou que nenhuma das dietas microencapsuladas foi rejeitada pelos juvenis aos 44 dpe (Tabela 8). Entretanto, quantidades limitadas de dietas microencapsuladas experimentais foram ingeridas; 39,0 a 68,3% dos juvenis possuíam estômago com repleção menor que 50% ($p > 0,05$) de microcápsulas. Em contraste, apenas 2,7% das larvas alimentadas com náuplios de artêmia foram classificadas nesta categoria.

A maioria dos juvenis (76,7%) alimentados com a dieta comercial apresentou volume do conteúdo estomacal pontuado em >50% aos 44 dpe (Tabela 8). Entretanto, este valor não diferiu de nenhum dos outros tratamentos alimentares ($p > 0,05$).

3.4. Análises histológicas

Intestino

Aos 16 dpe, as larvas de pacu exibiram dobras intestinais epiteliais curtas e abundantes (Figura 4A). A coloração HF identificou enterócitos com borda estriada. Foram identificadas áreas supranucleares com vesículas absorptivas no citoplasma

dos enterócitos; grande quantidade de vesículas foi observada na região proximal do intestino. O método de coloração por Sudan negro B evidenciou conteúdo lipídico preenchendo parte do interior das vesículas (Figura 4B). O intestino apresentou células mucosas (caliciformes) secretoras de mucinas ácidas (Figura 4C) e neutras (Figura 4D), evidenciadas respectivamente, pela reação positiva ao azul de Alcian pH 2,5 e ao PAS.

As vesículas absorptivas no citoplasma dos enterócitos aparentaram diminuição dos 16 dpe para os 44 dpe (Figuras 4A e 5A). Aos 44 dpe, os enterócitos apresentaram-se adequadamente desenvolvidos em todos os tratamentos. Descamação do epitélio intestinal não foi observada. As porções intestinais exibiram células mucosas secretoras de mucinas ácidas (azul de Alcian pH 2,5 positivas) (Figura 5B) e neutras (PAS positivas) (Figura 5C). As células mucosas foram qualitativamente mais abundantes nas secções distais do intestino.

Os pacus dos tratamentos controle (náuplios de artêmia e dieta comercial) exibiram intestino com numerosas dobras epiteliais (Figura 5A). Vesículas com conteúdo lipídico, detectado pelo Sudan negro B, foram observadas principalmente com o uso da dieta comercial (Figura 5D).

Notaram-se dobras epiteliais estreitas no intestino dos pacus alimentados com as dietas microencapsuladas experimentais (Figura 5E). O método do Sudan negro B evidenciou vesículas com conteúdo lipídico em todos os tratamentos, exceto no tratamento M-OL (Figura 5F).

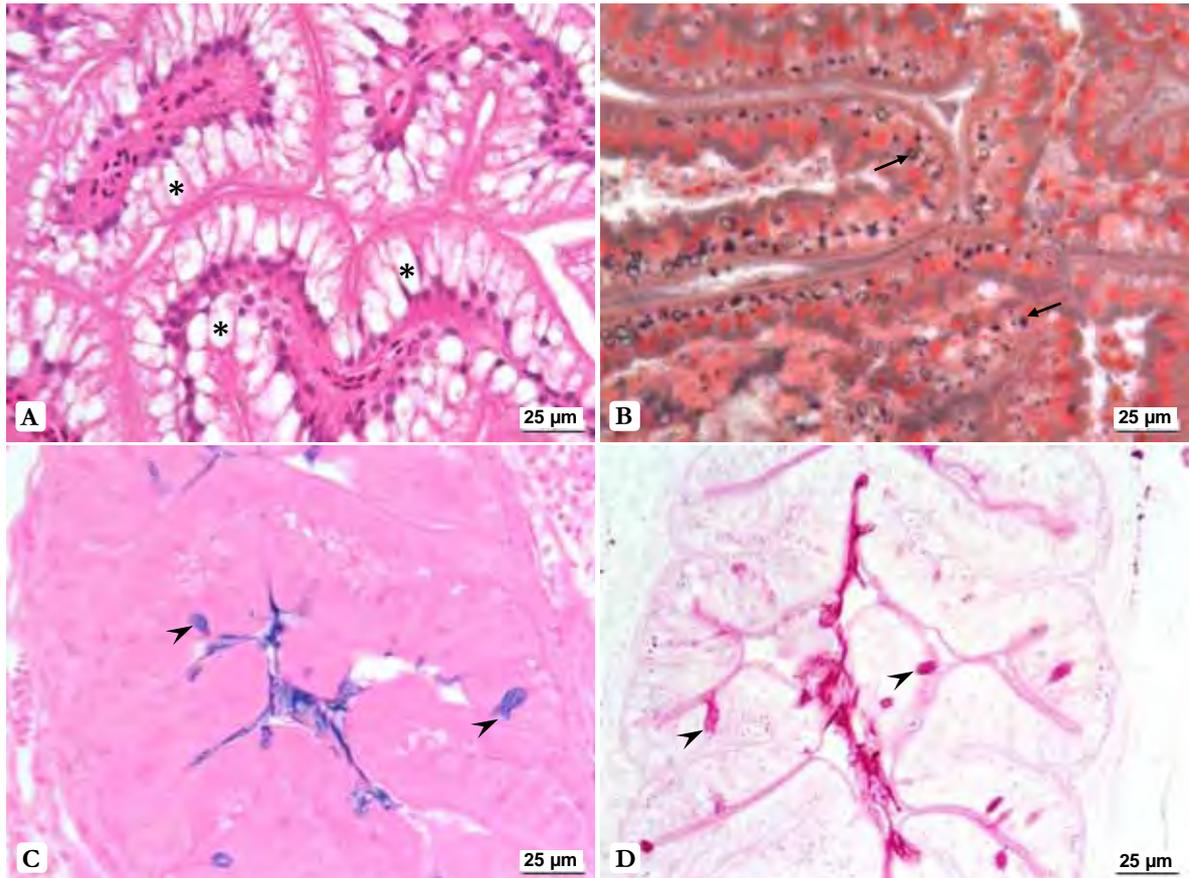


Figura 4. Secções histológicas do intestino de larvas de pacus aos 16 dpe. (A) Dobras epiteliais da região proximal do intestino. Citoplasma supranuclear preenchido com grandes vesículas. (B) Conteúdo lipídico no interior das vesículas supranucleares. (C) Células caliciformes secretoras de mucinas ácidas. (D) Células caliciformes secretoras de mucinas neutras. Colorações: HF (A). Sudan negro B contracorado com vermelho neutro (B). Azul de Alcian pH 2,5 contracorado com floxina (C). PAS (D).

Vesículas (asterisco). Inclusões lipídicas (seta). Células caliciformes (cabeça de seta).

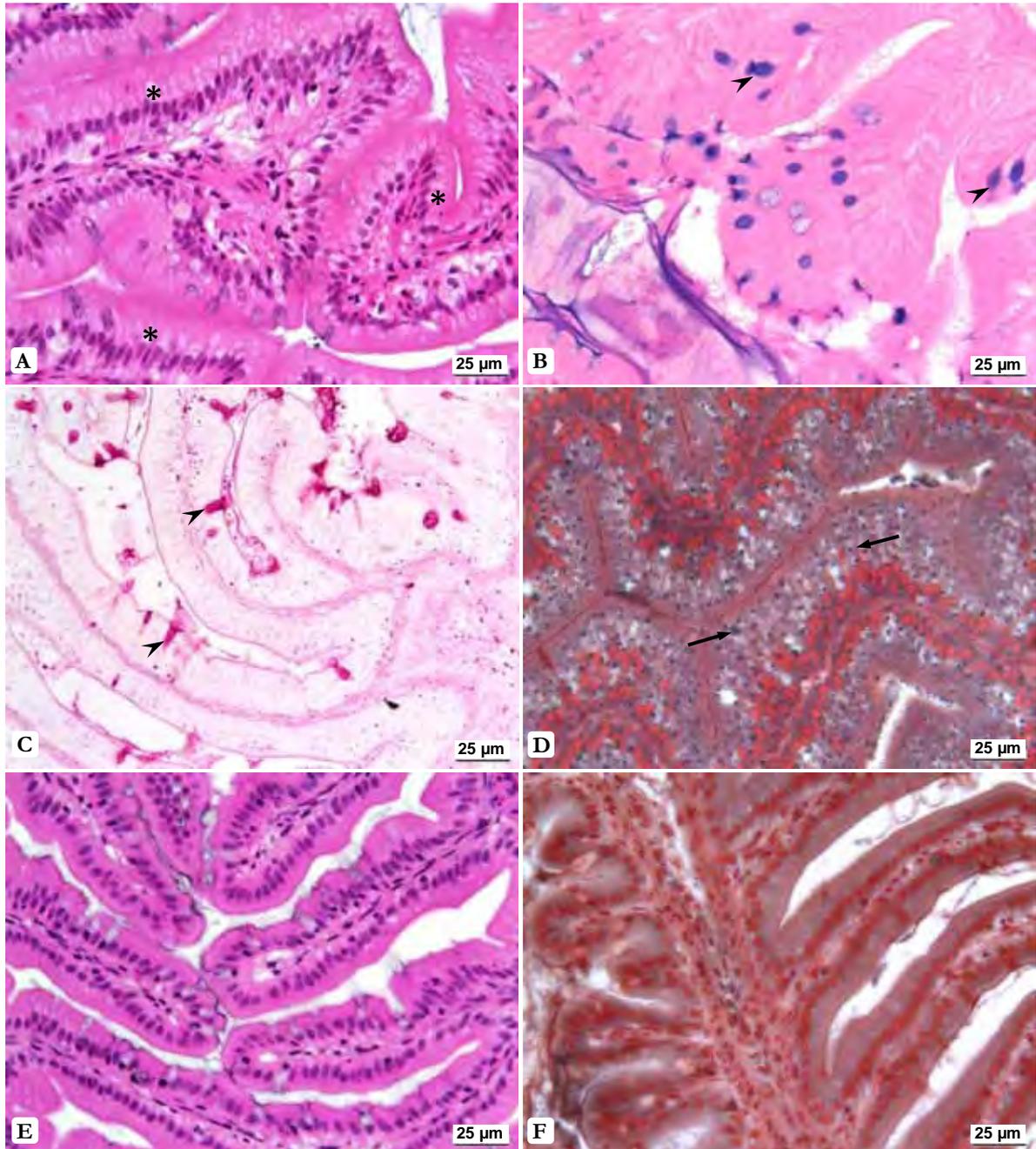


Figura 5. Secções histológicas do intestino de juvenis de pacus aos 44 dpe. (A) Artêmia. Intestino proximal exibindo dobras epiteliais e enterócitos com vesículas supranucleares. (B) Artêmia. Células caliciformes secretoras de mucinas ácidas. (C) M-OG. Células caliciformes secretoras de mucinas neutras. (D) Dieta comercial. Vesículas citoplasmáticas preenchidas por conteúdo lipídico. (E) M-OO. Intestino com dobras epiteliais estreitas. (F) M-OL. Citoplasma sem inclusões lipídicas. Colorações: HF (A e E). Azul de Alcian pH 2,5 contracorado com floxina (B). PAS (C). Sudan negro B contracorado com vermelho neutro (D e F).

Vesículas (asterisco). Inclusões lipídicas (seta). Células caliciformes (cabeça de seta).

Fígado

No início do período de transição alimentar, aos 16 dpe, o hepatócito das larvas mostrou citoplasma acidófilo, com núcleos deslocados para a periferia das células e nucléolos evidentes (Figura 6A). O tecido hepático exibiu vasos sanguíneos preenchidos por células sanguíneas. Nutriente de reserva foi identificado no citoplasma dos hepatócitos; glicogênio foi detectado em áreas reativas ao PAS (Figura 6B).

Aos 44 dpe, as secções do tecido hepático exibiram espessos vasos sanguíneos repleto de hemácias entre os hepatócitos (Figura 7A). No citoplasma dos hepatócitos foram identificadas áreas de depósitos de glicogênio (PAS positivas) e algumas inclusões lipídicas, detectadas pelo método de coloração por Sudan negro B (Figura 7B). No tratamento com a dieta comercial, principalmente acúmulo de lipídios foi detectado no citoplasma dos hepatócitos (Figura 7C).

As observações histológicas revelaram que aos 44 dpe, os pacus alimentados com as dietas microencapsuladas M-OG e M-OL possuíam hepatócitos com núcleos basofílicos e estreitos capilares sinusóides entre os cordões de hepatócitos (Figura 7D). Grandes áreas com estoque de glicogênio foram detectadas pelo PAS. No tratamento M-OSi, áreas com estoque de glicogênio foram abundantes (Figura 7E), enquanto que nos tratamentos M-OO e M-OP, predominaram áreas com inclusões lipídicas (7F).

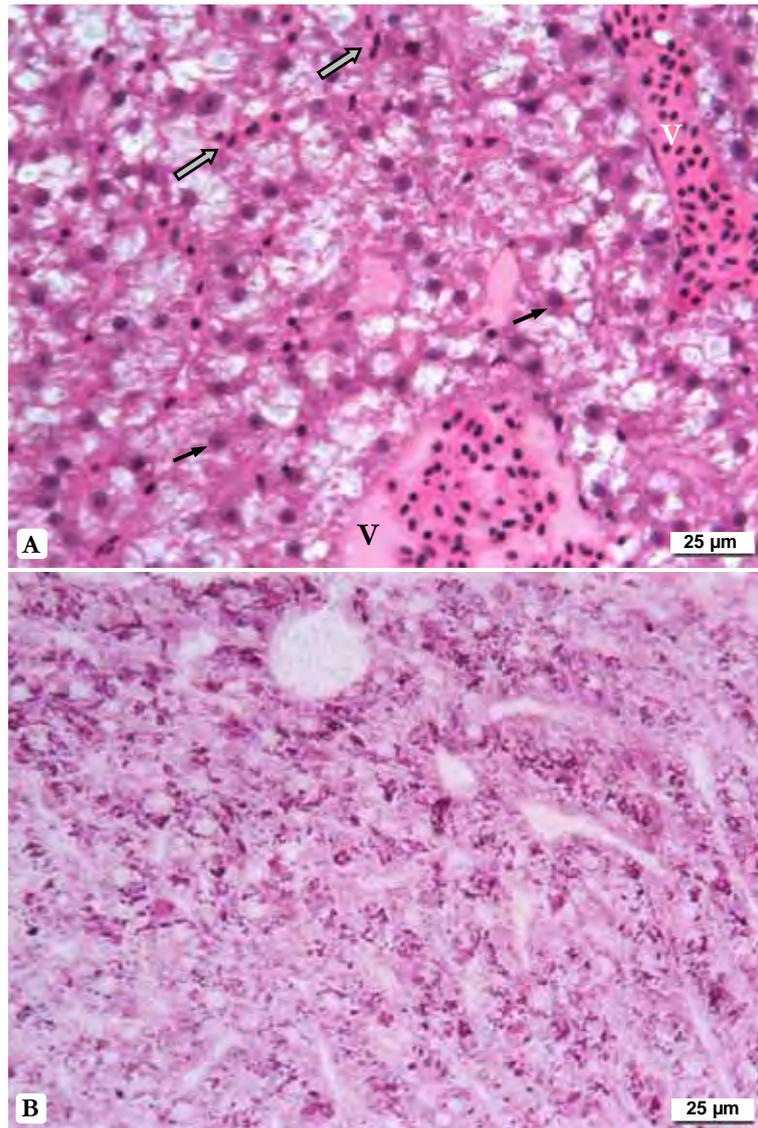


Figura 6. Secções histológicas do fígado de larvas de pacus aos 16 dpe. (A) Hepatócitos com citoplasma acidófilo, com núcleos deslocados para a periferia das células. Estreitos capilares sinusóides entre os cordões de hepatócitos. Presença de vasos sanguíneos preenchidos por células sanguíneas. (B) Áreas de estoque de glicogênio. Colorações: HF (A). PAS (B).

Núcleos (seta). Capilares sinusóides (seta cinza)

V: Vasos sanguíneos

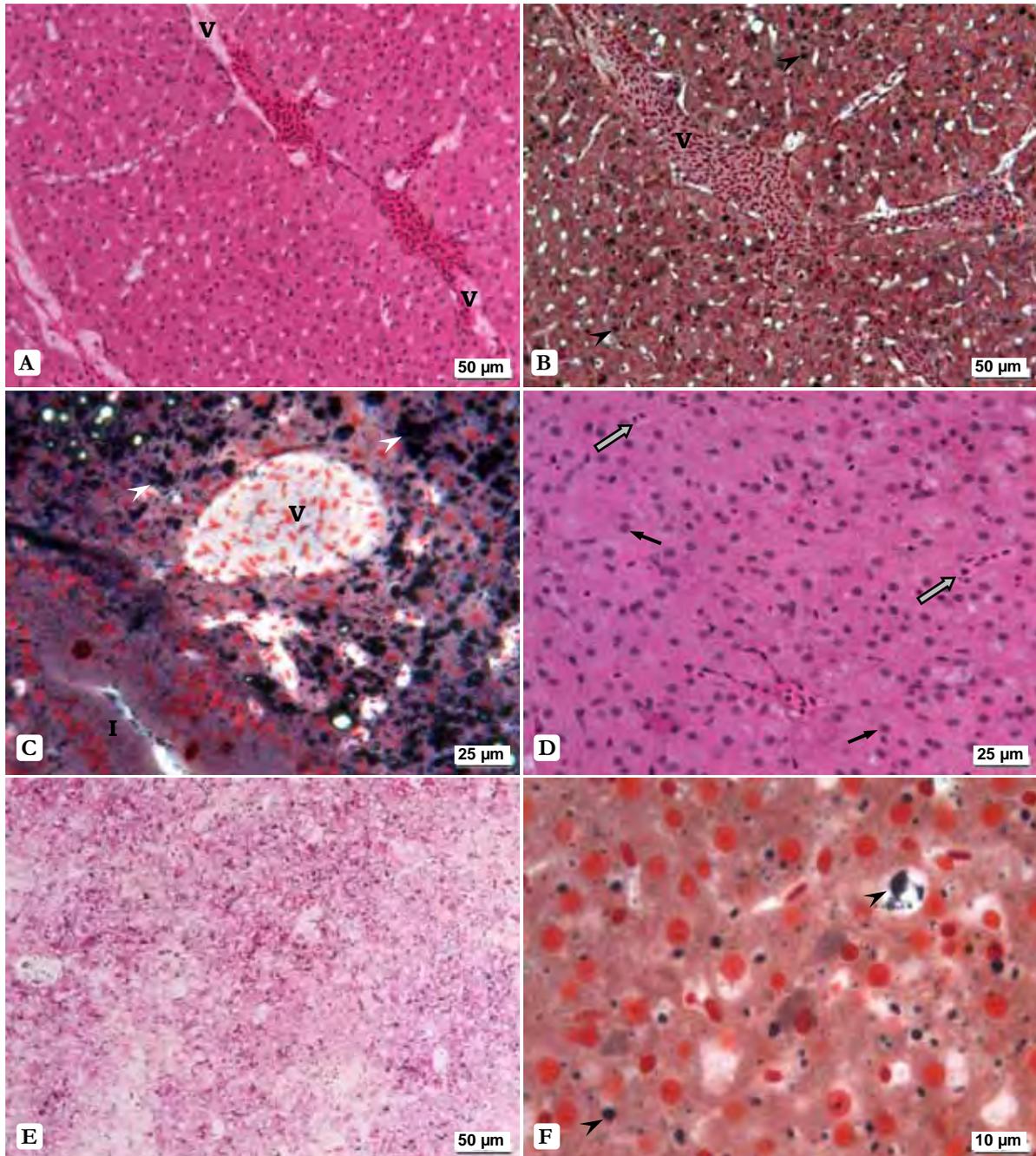


Figura 7. Secções histológicas do fígado de juvenis de pacus aos 44 dpe. (A) Artêmia. Espessos vasos sanguíneos repleto de hemácias. (B) Artêmia. Inclusões lipídicas no citoplasma dos hepatócitos. (C) Dieta comercial. Acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos. (D) M-OG. Hepatócitos com núcleos basofílicos e estreitos capilares sinusóides entre os cordões de hepatócitos. (E) M-OSi. Áreas com estoque de glicogênio. (F) M-OP. Vesículas preenchidas em parte por lipídios. Colorações: HF (A e D). Sudan negro B contracorado com vermelho neutro (B, C e F). PAS (E).

Núcleos (seta). Capilares sinusóides (seta cinza). Inclusões lipídicas (cabeça de seta). V: Vasos sanguíneos. I: Intestino.

Pâncreas

Aos 16 dpe, duas porções pancreáticas foram observadas. Logo acima do fígado, observou-se grande porção de pâncreas, composta por ácinos, ductos excretores e vasos com hemácias no seu interior, caracterizando o pâncreas exócrino (Figura 8A). As secções histológicas evidenciaram pequenas porções de tecido pancreático espalhado pelo mesentério, principalmente entre os cecos pilóricos, caracterizando o pâncreas difuso (Figura 8B). Nessas porções, não foram observados ductos excretores. Células pancreáticas basofílicas contendo grânulos acidofílicos de proenzima foram coradas pelo método EOF (Figura 8A e 8B).

Aos 44 dpe, nos tratamentos controle com artêmia e dieta comercial, ilhotas pancreáticas endócrinas (corpúsculos de Brockman) foram identificadas como arranjo celular menos corado disperso no tecido pancreático (Figura 9A). As células da porção exócrina possuíam núcleos grandes e com forte basofilia, ductos excretores e grânulos de proenzima reativos ao EOF. Regiões de pâncreas intra-hepático foram observadas (Figura 9B). Grânulos de proenzima foram detectados pela coloração EOF em todas as regiões de pâncreas.

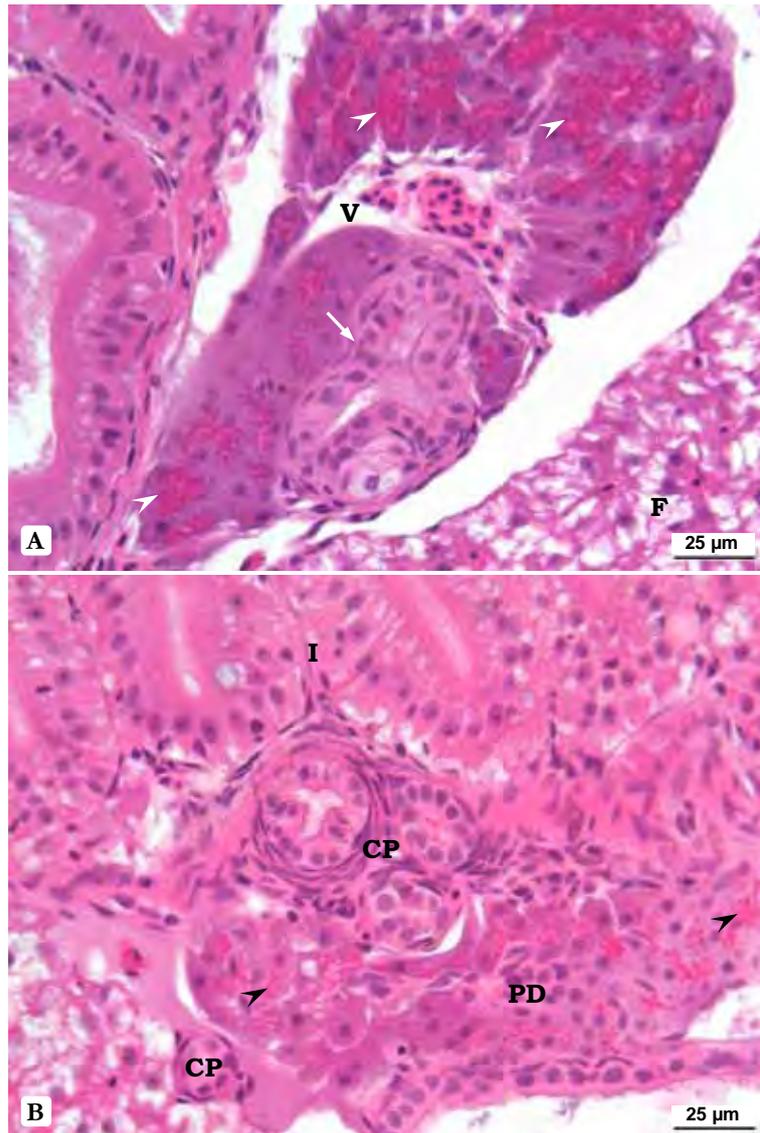


Figura 8. Secções histológicas do pâncreas de larvas de pacus aos 16 dpe. (A) Porção de pâncreas exócrino, composta por ácinos, ductos excretores e vasos com células sanguíneas. Grânulos acidófilos de proenzima no citoplasma dos ácinos. (B) Pequenas porções de pâncreas difuso localizadas próximo aos cecos pilóricos. Grânulos acidófilos de proenzima no citoplasma dos ácinos. Coloração: EOF.

Ductos excretores (seta). Grânulos de proenzima (cabeça de seta).

V: Vasos sanguíneos. F: Fígado. I: Intestino. PD: Porções de pâncreas difuso. CP: Cecos pilóricos.

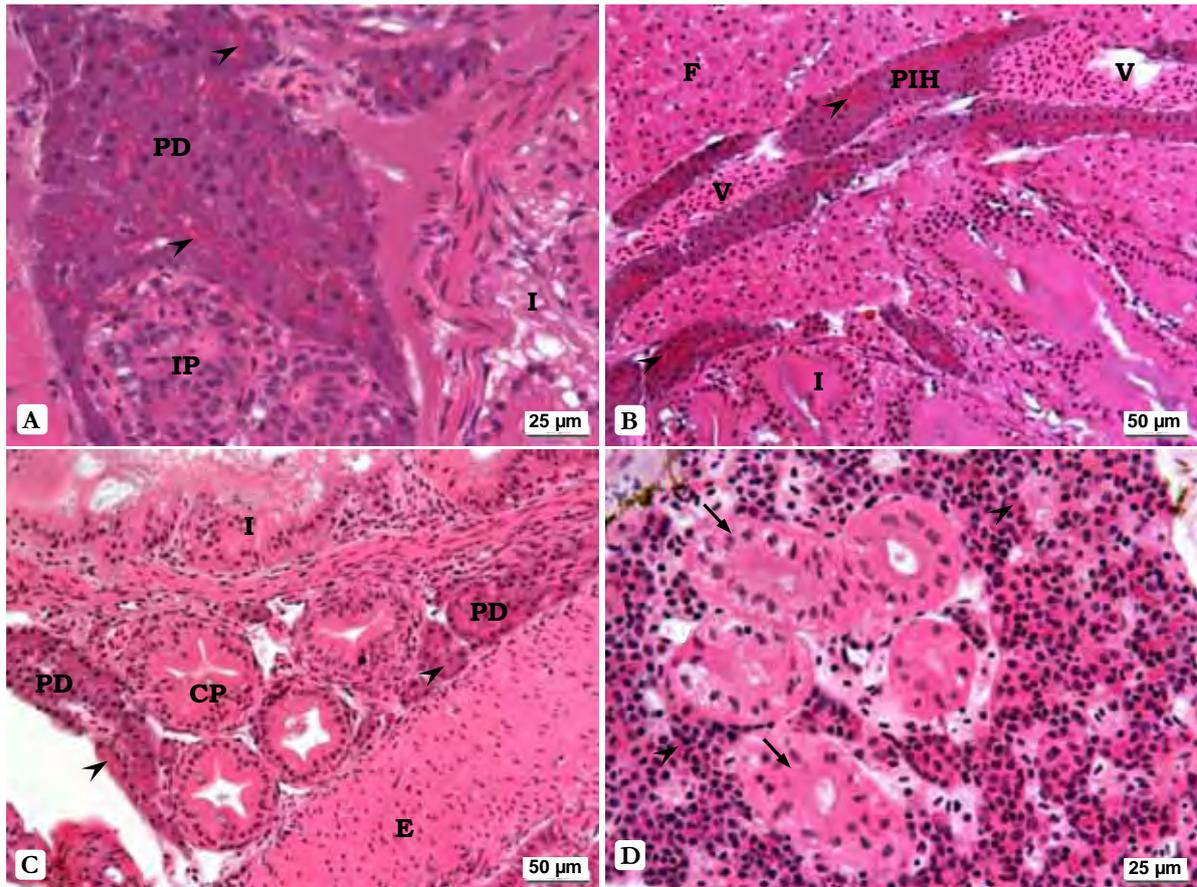


Figura 9. Seções histológicas do pâncreas de larvas de juvenis aos 44 dpe. (A) Dieta comercial. Ilhotas pancreáticas e grânulos de proenzima corados intensamente. (B) Artêmia. Porção de pâncreas intra-hepático com grânulos acidófilos de proenzima corados intensamente. (C) M-OSi. Porções de pâncreas difuso pelo mesentério próximo aos cecos pilóricos e grânulos de proenzima corados fracamente. (D) M-OP. Pâncreas exócrino com ductos e grânulos de proenzima corados fracamente. Coloração: EOF.

Ductos excretores (seta). Grânulos de proenzima (cabeça de seta).

PD: Porções de pâncreas difuso. IP: Ilhotas pancreáticas. I: Intestino. F: Fígado. PIH: Porções de pâncreas intra-hepático. V: Vasos sanguíneos. CP: Cecos pilóricos. E: Estômago.

O tecido pancreático dos peixes dos tratamentos com as dietas microencapsuladas era semelhante entre si. As seções histológicas mostraram regiões de pâncreas difuso pelo mesentério (Figura 9C) e regiões de tecido pancreático exócrino com alguns ductos (Figura 9D). Em ambas as regiões, granulações foram evidenciadas pelo método EOF. A intensidade dos grânulos de proenzima foi menor comparada aos pacus alimentados com náuplios de artêmia e dieta comercial. Não foi observado pâncreas intra-hepático nos pacus alimentados com as dietas microencapsuladas experimentais.

Estômago

Larvas de pacu aos 16 dpe tinham estômago separado em duas regiões distintas, a cárdica e a pilórica. A região cárdica caracterizou-se como glandular, com glândulas gástricas túbulo-alveolares, ocorrendo abaixo do epitélio cilíndrico simples e alto (Figura 10A). A região pilórica apresentou ausência de glândulas gástricas, compondo a região aglandular do estômago; epitélio cilíndrico simples com núcleos alongados constituiu a camada mucosa da região (Figura 10B).

Nenhuma das dietas microencapsuladas proporcionou mudanças na morfologia do estômago dos pacus após 28 dias de alimentação (44 dpe). A porção glandular exibiu camada composta por glândulas gástricas multicelulares com finas granulações coradas pelo PAS (Figura 11A). A camada mucosa da porção aglandular apresentou altas dobras epiteliais. O epitélio apresentou-se constituído por camada única de células cilíndricas com um núcleo em posição central (Figura 11B). A região apical das células epiteliais mostrou secreção de mucinas neutras, coradas fortemente pelo PAS (Figura 11C).

Ao final do experimento, os juvenis alimentados com náuplios de artêmia e dieta comercial mostraram camadas do estômago espessas. As porções mais profundas de glândulas gástricas consistiram de células secretoras poligonais, com núcleo e nucléolo arredondados (Figura 11D). Apesar do notável desenvolvimento das glândulas gástricas, não foram observados grânulos acidófilos no citoplasma dessas células, que poderia indicar secreção de pepsinogênio.

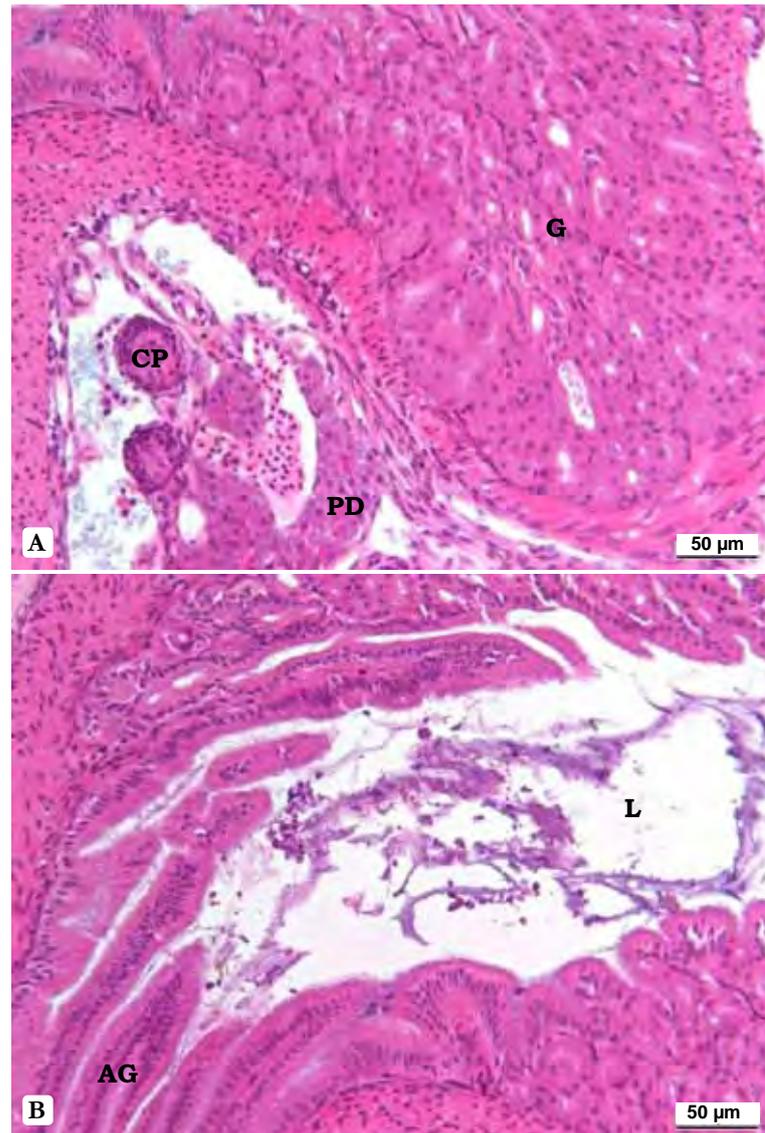


Figura 10. Secções histológicas do estômago de larvas de pacus aos 16 dpe. (A) Região glandular (G) com glândulas gástricas multicelulares abaixo de um epitélio cilíndrico simples. (B) Região aglandular (AG) com epitélio cilíndrico simples e núcleos alongados (seta pontilhada). Coloração: EOF.

L: Lúmen estomacal. PD: Porções de pâncreas difuso. CP: Cecos pilóricos.

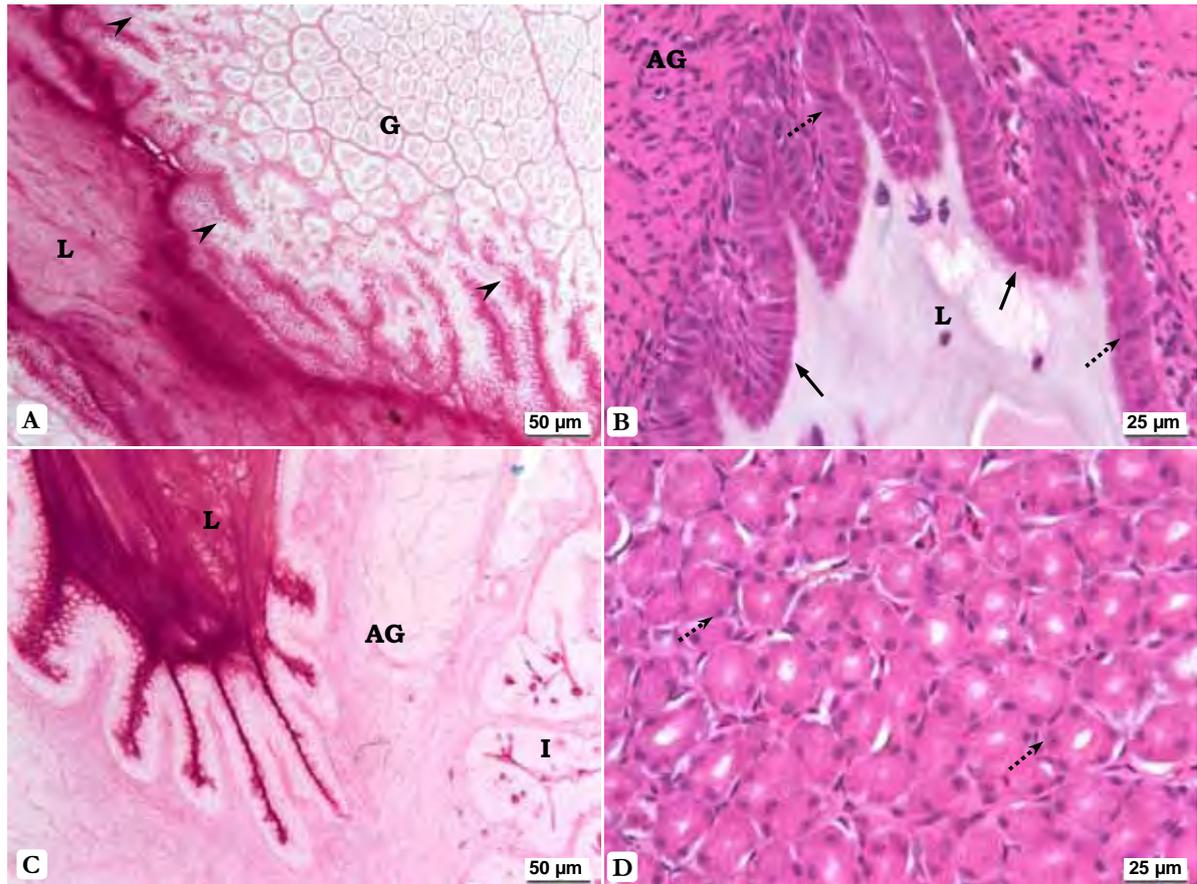


Figura 11. Seções histológicas do estômago de juvenis de pacus aos 44 dpe. (A) M-OL. Porção glandular composta por glândulas gástricas multicelulares e com finas granulações (cabeça de seta). Lúmen estomacal repleto por mucinas neutras. (B) M-OG. Porção aglandular com altas dobras epiteliais (seta) e epitélio cilíndrico simples e núcleos (seta pontilhada) em posição central. (C) M-OL. Porção aglandular com mucinas neutras secretadas na região apical das células epiteliais e no lúmen estomacal. (D) Artêmia. Glândulas gástricas compostas por células poligonais com núcleos (seta pontilhada). Colorações: PAS (A e C). EOF (B e D).
G: Região glandular. AG: Região aglandular. L: Lúmen estomacal. I: Intestino.

4. Discussão

4.1. Caracterização das dietas

A formação das micropartículas consistiu de um processo em duas etapas, no qual o óleo e a mistura vitamínica e mineral foram gelificados com pectina cítrica na presença de solução de cloreto de cálcio e, depois as micropartículas foram imersas em solução de concentrado proteico de soro de leite. A análise proximal mostrou que, independente do óleo utilizado, as micropartículas exibiram elevado teor de proteína ($\sim 550 \text{ g Kg}^{-1}$) e lipídios ($\sim 240 \text{ g Kg}^{-1}$) e baixo conteúdo de matéria seca

(~140 g Kg⁻¹). As micropartículas eram parcialmente esféricas com distribuição homogênea de lipídios e apresentaram tamanhos compatíveis ao alimento vivo, rotíferos (80 a 280µm) e náuplios de artêmia (350 a 530µm) (Emmerson 1984; Yúfera et al. 1984). Os resultados mostram que o método de microencapsulação utilizado nesse estudo pode produzir partículas que mimetizem o alimento vivo de larvas de peixes em termos de macronutrientes e tamanho.

O alimento vivo de larvas de peixes criadas intensivamente consiste basicamente de rotíferos e náuplios de artêmia, sendo o primeiro mais comumente usado na larvicultura de peixes marinhos (Portella e Dabrowski 2008). Esses alimentos vivos possuem conteúdo de proteína e lipídio alto e de matéria seca baixo. De acordo com Baskerville-Bridges e Kling (2000), o conteúdo de proteína, lipídio e matéria seca dos náuplios de artêmia é de 601; 193 e 88 g Kg⁻¹, similar ao obtido nas micropartículas deste estudo. O baixo conteúdo de matéria seca das micropartículas pode facilitar a sua digestão pelas larvas de peixes, uma vez que dietas mais úmidas podem ser mais facilmente digeridas (Kolkovski 2001).

Neste estudo, diferentes óleos vegetais e óleo de peixe marinho foram usados na preparação das micropartículas e resultaram em diferenças na composição de ácidos graxos das dietas. Ácido linolênico e linoleico foram identificados em maiores proporções nas dietas M-OSi e M-OL, produzidas com os óleos vegetais de sacha inchi e linhaça, respectivamente. O óleo de peixe garantiu à dieta M-OP as maiores quantidades dos ácidos graxos docosaexaenóico (DHA, 22:6n-3), eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e araquidônico (ARA, 20:5n-6). Entretanto, independente da fonte de óleo utilizada, a fração polar dos ácidos graxos nos juvenis no final do experimento apresentou pouca variação. Os peixes tropicais de água doce são eficientes em sintetizar HUFAs a partir de precursores n-3 e n-6 com 18 carbonos (ácidos linolênico e linoléico) (Agaba et al. 2005). Por isso, entende-se que óleos vegetais usados neste estudo, podem ser usados como fonte de lipídeos em dietas para peixes de água doce, sem comprometer o desempenho dos animais.

4.2. Crescimento somático e sobrevivência

Nenhuma das dietas microencapsuladas produzidas e avaliadas foi eficiente para criar larvas de pacu na transição alimentar. Essas dietas proporcionaram aumento efetivo do peso e comprimento, os quais foram diferentes dos observados no início do experimento. No entanto, o crescimento das larvas foi muito inferior ao obtido com uso do alimento vivo e com a dieta comercial. Os resultados confirmam estudos anteriores com larvas de pacu que mostraram que dietas microencapsuladas, produzidas por gelificação iônica externa (Mukai-Corrêa 2008) ou interna (Menossi et al. 2012) não foram eficientes quando usadas durante a fase de transição alimentar, pois proporcionaram baixas taxas de crescimento e sobrevivência.

Existem diversos motivos que podem explicar o insucesso de alimentar peixes durante o desenvolvimento larval com dietas formuladas. De acordo com Langdon (2003), o primeiro refere-se ao sistema digestório das larvas, que geralmente não está totalmente desenvolvido e pode não possuir enzimas digestivas suficientemente ativas para a digestão eficiente das dietas. O segundo motivo é que as larvas dependem da movimentação da presa ou de estímulos visuais para induzir o comportamento alimentar. O tamanho das partículas deve ser o suficiente para que as larvas possam detectá-las. E por último, o terceiro que está relacionado com a composição bioquímica da dieta, na qual os nutrientes podem estar ausentes ou presentes em quantidades ou razões subótimas em comparação a outros nutrientes. Infelizmente, pouco se sabe sobre as exigências nutricionais de larvas de peixes de água doce (Portella e Dabrowski 2008). Em revisão recente sobre microdietas para larvas de peixes, Holt et al. (2011) também discutem algumas questões que resultam no baixo crescimento de larvas criadas em sistemas intensivos de produção. Muitos dessas questões estão relacionados com a ingestão do alimento (disponibilidade, aparência, atratividade a curta ou longa distância e textura), digestão (metabolismo, digestão e assimilação) e suporte de nutrientes (reservas maternas, exigência em nutrientes, lixiviação e formulação).

Neste estudo, as diferenças nas taxas de sobrevivência e no crescimento entre os tratamentos podem ser, em grande parte, devido à qualidade da proteína

dietética. A qualidade de uma proteína refere-se a sua capacidade de fornecer os aminoácidos necessários para o organismo; o fato de um determinado alimento ser uma fonte rica de proteínas não implica que seja suficiente para sustentar o crescimento ou a manutenção do organismo (Tirapegui e Rogero 2007). Embora o nível proteico das microcapsulas produzidas com proteína do soro de leite tenha sido semelhante ao nível proteico dos náuplios de artêmia, o escore químico da proteína do soro de leite em comparação aos náuplios de artêmia, determinado em estudo anterior por Rodrigues (2012), mostra que os aminoácidos arginina, histidina, glicina, tirosina e fenilalanina são limitantes. O valor nutricional de determinada proteína pode diferir substancialmente de acordo com a composição de aminoácidos (indispensáveis) e a digestibilidade (Tirapegui e Rogero 2007). A deficiência ou o desbalanceamento de aminoácidos e a relação entre os nutrientes das dietas podem ocasionar diminuição do crescimento e prejudicar o desenvolvimento dos peixes (Cahu e Zabonino Infante, 2001; Conceição et al. 2011; Takata 2011). Os peixes não possuem exigência em proteína, mas sim em mistura balanceada de aminoácidos indispensáveis e dispensáveis (Wilson 2002) para a adequada formação de seus tecidos e regulação de seus sistemas fisiológicos (Finn e Fyhn 2010). As larvas de peixes possuem um enorme potencial de crescimento e exibem taxas de crescimento muito maiores que peixes juvenis e adultos. Entretanto, para que possam expressar todo seu potencial, proteína de alta qualidade deve ser fornecida em quantidade suficiente (Conceição et al. 2011).

O baixo desempenho das larvas de pacu alimentadas com a dieta M-OP (produzida com óleo de peixe), em comparação às demais dietas microencapsuladas, pode ter sido consequência da oxidação lipídica da dieta. Entre todos os óleos usados neste estudo, o óleo de peixe apresentou maior proporção de ácidos graxos altamente insaturados. Entretanto, a quantidade dos altamente insaturados na dieta M-OP foi de aproximadamente um terço da quantidade verificada no óleo de peixe. Os ácidos graxos insaturados são as estruturas mais susceptíveis ao processo oxidativo (Ferrari 1998). São diversas as consequências nutricionais da oxidação lipídica: destruição parcial dos ácidos graxos insaturados; degradação de vitaminas lipossolúveis e carotenóides; destruição parcial da vitamina C (co-oxidação); formação de compostos de Maillard, capazes de reagir com

biomoléculas (especialmente proteínas), diminuindo a absorção destas; formação de lipídios oxidados que são antagonistas de diversos nutrientes, como tiamina, ácido ascórbico, vitamina B12, tocoferóis, vitamina A, proteínas, lisina e aminoácidos sulfurados; e formação de ácidos graxos livres (Kirk 1984; Kanner 1994; Ramalho e Jorge 2006). Em estudo recente, Sæle et al. (2012) demonstraram que os ácidos graxos livres dietéticos afetam a sobrevivência de peixes nos estágios iniciais do desenvolvimento: dietas com diferentes graus de lipídios hidrolisados foram fornecidas a larvas de *Gadus morhua* por 30 dias e observou-se correlação positiva entre a quantidade de ácidos graxos livres nas dietas e mortalidade das larvas, embora nenhum efeito no crescimento tenha sido verificado.

Embora a dieta comercial tenha proporcionado crescimento satisfatório às larvas, a menor taxa de sobrevivência e a maior taxa de canibalismo aparente foram observadas neste tratamento. Em estudo anterior, o fornecimento desta mesma dieta após transição alimentar estimulou o comportamento canibal de larvas de pacu, que resultou em taxas de canibalismo superior a 50% (Rodrigues 2012). Os dados do presente estudo sugerem que o crescimento das larvas de pacu alimentadas com a dieta comercial pode ter sido favorecido pelo elevado canibalismo que apresentaram. Esta hipótese foi sugerida por Curnow et al. (2006), que relacionaram o rápido crescimento em larvas de barramundi (*Lates calcarifer*), após finalizada a oferta de artemia, com a alta incidência de canibalismo.

4.3. Aceitação das dietas

Embora nenhuma dieta tenha sido rejeitada pelos juvenis de pacu, o alimento vivo foi mais atrativo, sendo ingerido em maior quantidade ($p < 0,05$). O estímulo químico dos náuplios de artêmia favorece o comportamento alimentar de larvas de pacu (Tesser e Portella 2006), que, a partir do final do período endotrófico, apresentam epitélio olfatório diferenciado com células quimiorreceptoras especializadas, neuromastos maduros, nadadeiras peitorais diferenciadas e vesícula gasosa insuflada, o que lhes possibilita perceber, identificar, perseguir e capturar o alimento (Clavijo-Ayala 2008).

O crescimento reduzido dos juvenis alimentados com as dietas microencapsuladas não foi consequência da ingestão reduzida dessas dietas. Comparadas à dieta comercial, todas as demais dietas formuladas foram igualmente ingeridas pelos peixes ($p > 0,05$). A aceitação das dietas microencapsuladas pode ter sido favorecida pelas suas características físicas e químicas. A facilidade de dispersão das micropartículas liofilizadas na água possibilitou sua ingestão pelas larvas. Além disso, a inclusão do hidrolisado de peixe no material de parede das micropartículas pode ter funcionado como estimulante alimentar. O hidrolisado de peixe contém mais de 3% de aminoácidos livres em sua composição (informações fornecidas pelo fabricante) e esses aminoácidos estimulam o comportamento alimentar em peixes (Kolkovski et al. 1997) e aumentam a ingestão de dietas microencapsuladas por larvas de pacu, principalmente glicina, lisina e arginina (Tesser e Portella 2011).

4.4. Desenvolvimento do trato digestório

O intestino anterior é o principal sítio de digestão proteolítica extracelular durante o período larval, devido ao pH alcalino e presença de tripsina pancreática, enquanto que no intestino posterior as proteínas são absorvidas por pinocitose. Depois do início da digestão proteica no estômago, ocorre redução da atividade pinocítica e inicia-se digestão intracelular pelas enzimas citosólicas (Zambonino Infante e Cahu 2001). A redução das vesículas absorptivas dos 16 para os 44 dpe no epitélio intestinal das larvas de pacu provavelmente resultou do início da secreção de HCl e pepsinogênio pelas glândulas gástricas (Ash 1985). As primeiras glândulas gástricas são observadas em larvas de pacu menores que 7 mg. Entretanto, a definição das regiões glandular e aglandular só é observada nas larvas em estágio mais avançado de desenvolvimento (15–25 mg), após 15 dias do início da alimentação exógena (Jomori 2005). A diferenciação do estômago é um importante evento durante o desenvolvimento gastrointestinal do peixe, principalmente do ponto de vista da adaptação a dietas formuladas e da habilidade em digerir e assimilar seus nutrientes (Govoni et al. 1986). Dessa maneira, entende-se que as larvas

usadas neste estudo (20 mg; 16 dpe) estavam aptas para aproveitar com eficiência dietas formuladas.

As glândulas gástricas dos peixes teleósteos, além de sintetizarem pepsinogênio e HCl (Smith 1989), secretam também mucopolissacarídeos neutros que atuam como tampão (Scoocco et al. 1996). Os resultados do presente estudo mostram que o epitélio gástrico dos pacus aos 16 e 44 dpe secretam apenas mucinas neutras e não secretam mucinas ácidas, ao contrário do que foi observado em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Ostaszewska et al. 2011), pike *Esox lucius* L. e bagre europeu *Silurus glanis* L. (Petrinic et al. 2005).

Células mucosas secretoras de mucinas ácidas e neutras foram observadas em todo tubo intestinal dos pacus (16 e 44 dpe), e a quantidade de células pareceu aumentar da região proximal para a distal. As mucinas, particularmente as sulfomucinas favorecem o transporte intestinal de proteínas ou os produtos de sua degradação (Segner et al. 1994). Mas o número de células mucosas nos peixes pode variar com o tipo de proteína dietética, apresentando aumento com o uso de proteínas vegetais (Ostaszewska et al. 2011).

Neste estudo, as larvas alimentadas com as dietas microencapsuladas mostraram significativamente menor crescimento e, no caso das dietas M-OL e M-OP, menor sobrevivência que as larvas alimentadas com os náuplios de artêmia. As observações histológicas do trato digestório são consideradas bons indicadores da condição nutricional do peixe (Green e McCormick 1999). O pouco desenvolvimento das dobras epiteliais intestinais, os grânulos de proenzima fracamente corados no pâncreas e a ausência de pâncreas intra-hepático, assim como o atraso no espessamento da camada glandular do estômago nesses peixes indicam má condição nutricional.

A análise histológica comparativa e subjetiva constatou grânulos de proenzima corados mais intensamente no citoplasma dos ácinos pancreáticos das larvas e juvenis de pacu alimentados com náuplios de artêmia em relação aos alimentados com as dietas microencapsuladas. Estudos anteriores mostram que a alimentação influencia a secreção de enzimas pancreáticas em larvas de peixes: a incorporação de níveis moderados de hidrolisados proteicos nas dietas para larvas estimulou a secreção de enzimas pancreáticas (Cahu et al. 1997) e náuplios de

artêmia parecem aumentar o número de grânulos de proenzima na área citoplasmática dos ácinos (Ostaszewska et al. 2005).

As informações disponíveis na literatura indicam que os mecanismos de digestão e assimilação do alimento exógeno são similares em todas as larvas de peixes. Na seção proximal do intestino, os lipídios são hidrolisados para ácidos graxos e monoglicerídeos e absorvidos pelos enterócitos (De Silva e Anderson 1995). O acúmulo de lipídios nos enterócitos é descrito como um estoque temporário, o qual pode ser resultante da inabilidade em mobilizá-los (Serasquete et al. 1995). Baskerville-Bridges e Kling (2000) descrevem a presença de abundantes vesículas lipídicas nos enterócitos de larvas de *Gadus morhua* alimentados com dietas microparticuladas com alto conteúdo de ácidos graxos altamente insaturados e relaciona com a ineficiente utilização desses lipídios dietéticos pelas larvas. Neste estudo, as larvas de pacu alimentadas com náuplios de artêmia apresentaram crescimento e sobrevivência significativamente superiores, em comparação à dieta comercial. Neste tratamento, as observações histológicas comparativas mostraram maior quantidade de lipídios nos enterócitos, que pode indicar a baixa utilização dos lipídios desta dieta. De acordo com Assimacopoulos-Jeannet (2004), o excesso de lipídios dietético pode causar aumento da concentração de ácidos graxos livres e resultar em deposição de lipídios no fígado, como observado com o uso da dieta comercial.

5. Conclusões

Embora as larvas de pacu usadas para a avaliação das dietas microencapsuladas já apresentassem sistema digestório apto para aproveitar com eficiência alimentos formulados, as dietas microencapsuladas testadas foram incapazes de suportar crescimento e garantir desenvolvimento adequado das larvas. Entretanto, o método de microencapsulação (gelificação iônica seguida de coacervação complexa) usado no presente estudo possibilitou a produção de microdietas semelhantes ao alimento vivo em termos de tamanho e composição. Essas dietas, embora nutricionalmente deficientes, foram satisfatoriamente aceitas pelos peixes. Os resultados desse estudo abrem novas perspectivas para

investigações futuras sobre a adequação nutricional das microdietas para que possam atender as exigências das larvas de peixes, principalmente com respeito à qualidade e disponibilidade da proteína dietética.

Referências

- Agaba, M.K., Tocher, D.R., Zheng, X., Dickson, C.A., Dick, J.R., Teale, A.J., 2005. Cloning and functional characterization of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 142, 342–352.
- Alvim, I.D., Grosso, C.R.F., 2010. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 30, 1069–1076.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 2006. 18th ed. Gaithersburg, Maryland.
- Ash, R., 1985. Protein digestion and absorption. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, G.R. (Eds.), *Nutrition and feeding in fish*, Academic Press, Orlando, pp. 69–93.
- Assimacopoulos-Jeannet, F., 2004. Fat storage in pancreas and in insulin-sensitive tissues in pathogenesis of type 2 diabetes. *Int. J. Obesity* 28, 53–57.
- Baskerville-Bridges, B., Kling, L.J., 2000. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. *Aquac. Nutr.* 6, 171–182.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Boyd, C.E., 1999. *Water quality in warm water fish pond*. Alabama: Auburn University. 482p.
- Cahu C., Zambonino Infante J., 1997. Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? *Aquacult. Int.* 5, 151–160.
- Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161–180.
- Clavijo-Ayala, J.A., 2008. Ontogenia do sistema sensorial de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characidae:Serrasalminidae). Tese, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 53 pp.

- Conceição, L.E.C., Aragão, C., Richard, N., Engrola, S., Gavaia, P., Mira, S., Dias, J., 2010. Novel methodologies in marine fish larval nutrition. *Fish Physiol. Biochem.* 36, 1–16.
- Conceição, L., Aragão, C., Rønnestad, I., 2011. Proteins. In: Holt, J.G. (Ed.), *Larval fish nutrition*. Wiley-Blackwell, West Sussex, pp. 83–116.
- Curnow, J., King, J., Bosmans, J., Kolkovski, S., 2006. The effect of reduced *Artemia* and rotifer use facilitated by a new microdiet in the rearing of barramundi *Lates calcarifer* (BLOCH) larvae. *Aquaculture* 257, 204–213.
- De Silva, S.S., Anderson, T.A., 1999. *Fish nutrition in aquaculture*. Chapman and Hall, London.
- Emmerson, W.D., 1984. Predation and energetics of *Penaeus indicus* (Decapoda: Penaeidae) larvae feeding on *Brachionus plicatilis* and *Artemia nauplii*. *Aquaculture* 38, 201–209.
- Ferrari, C.K.B., 1998. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. *Rev. Nutr.* 11, 3–14.
- Finn, R.N., Fyhn, H.J., 2010. Requirement for amino acids in ontogeny of fish. *Aquac. Res.* 41, 684–716.
- Folch, J., Less, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–503.
- Furuya, V.R.B., Hayashi, C., Furuya, W.M., Soares, C.M., Galdioli, E.M., 1999. Influência de plâncton, dieta artificial e sua combinação, sobre o crescimento e sobrevivência de larvas de curimatá (*Prochilodus lineatus*). *Acta Sci.* 21, 699–703.
- Gbassi, G.K., Vandamme, T., Marchioni, E., Ennahar., S., 2009. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 103–105.
- Govoni J.J., Boehlert G.W., Watanabe, Y., 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Environ. Biol. Fishes* 16, 59–77.
- Green B.S., McCormick M.I., 1999. Influence of larval feeding history on the body condition of *Amphiprion melanops*. *J. Fish Biol.* 55, 1273–1289.
- Hartman, L., Lago, R.C.A., 1973. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. *Laboratory Practice*, London, 475–476.

- Holt, G.J., WEBB, K.A.; Rust, M.B., 2011. Microparticulate diets: testing and evaluation success. In: Holt, J.G. (Ed.), Larval fish nutrition. Wiley-Blackwell, West Sussex, pp. 353–372.
- Jomori R.K., 2005. Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* e o uso dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) como indicadores naturais da incorporação do alimento vivo no tecido larval. Tese, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 122 pp.
- Jomori, R.K., Ducatti, C., Carneiro, D.J., Portella, M.C., 2008. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. *Aquac. Res.* 39, 370–381.
- Kanner, J., 1994. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Sci.* 36, 169–189.
- Kirk, J.R., 1984. Biological availability of nutrients in processed foods. *J. Chem. Educ.* 61, 364–367.
- Kolkovski S., Koven, W.M., Tandler A., 1997. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* 155, 193–205.
- Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles – implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200, 181–201.
- Kvåle, A., Yúfera, M., Nygard, C., Aursland, K., Harboe, T., Hamre, K., 2006. Leaching properties of three different microparticulate diets and preference of the diets in cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture* 251, 402–415.
- Langdon, C., 2003. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. *Aquaculture* 227, 259–275.
- Leitão, N.J., Pai-Silva, M.D., Almeida, F.L.A., Portella, M.C., 2011. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. *Aquaculture* 315, 78–85.
- Menossi, O.C.C., Takata, R., Sanches-Amaya, M.I., Freitas, T.M., Yúfera, M., Portella, M.C., 2012. Alimentação inicial de pacu com dieta microencapsulada produzida experimentalmente e sua relação com o crescimento e estruturas do sistema digestório. *Rev. Bras. Zootec.* 41, 1–10.

- Mukai-Correa, R., Prata, A.S., Alvim, I.D., Grosso, C., 2005. Caracterização de microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por gelificação iônica. *Braz. J. Food Technol.* 8, 73–80.
- Mukai-Correa, R., 2008. Produção de micropartículas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixes: estudos em sistema-modelo com inclusão de micropartículas lipídicas ou emulsão lipídica e teste *in vivo*. Tese, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, 151 pp.
- Ostaszewska, T., Dabrowski, K., Czuminiska, K., Olech, W., Olejniczak, M., 2005. Rearing of pike-perch larvae using formulated diets – first success with starter feeds. *Aquac. Res.* 36, 1167–1176.
- Ostaszewska, T., Dabrowski, K., Kwasek, K., Verri, T., Kamaszewski, M., Sliwinski, J., Napora-Rutkowski, L., 2011. Effects of various diet formulations (experimental and commercial) on the morphology of the liver and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquac. Res.* 42, 1796–1806.
- Parrish, C.C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In: Arts, M.T., Wainman, B.C. (Eds.), *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer, New York, pp. 4–20.
- Petrinec, Z., Nejedli, S., Kuzir, S., Opaèak, A., 2005. Mucosubstances of the digestive tract mucosa in northern pike (*Esox lucius* L.) and european catfish (*Silurus glanis* L.). *Vet. Arhiv.* 75, 317–327.
- Portella, M.C., Verani, J.R., Cestarolli, M.A., 2000. Use of live and artificial diets enriched with several fatty acid sources to feed *Prochilodus scrofa* larvae and fingerlings. 1. Effects on survival and growth. *J. Aquac. Trop.* 15, 45–58.
- Portella, M.C., Dabrowski, K., 2008. Diets, physiology, biochemistry and digestive tract development of freshwater fish larvae. In: Cyrino, J.E.P., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Eds.), *Feeding and digestive functions in Fishes*, Science Publisher, Academic Press, New Hampshire, pp. 227–279.
- Ramalho, V.C., Jorge, N., 2006. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim. Nova* 29, 755–760.
- Rodrigues, J.B., 2012. Desenvolvimento de micropartículas contendo *Lactobacillus acidophilus* para alimentação de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Tese,

- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, 112 pp.
- Sæle, Ø., Nordgreen, A., Olsvik, P.A., Hjelle, J.I., Harboe, T., Hamre, K., 2012. Toxic effects of dietary hydrolyzed lipids: an in vivo study on fish larvae. *Br. J. Nutr.* 20, 1–11.
- Scocco, P., Menghi, G., Ceccarelli, P., 1996. Glycohistochemistry of the *Tilapia* spp. stomach. *J. Fish Biol.* 49, 584–593.
- Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W., 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Mar. Biol.* 119, 471–486.
- Serasquete, M.C., Polo, A., Yúfera, M., 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 130, 79–92.
- Smith, L.S., 1989. Digestive functions in teleost fishes. In: Halver, J.E. (Ed.), *Fish nutrition*, Academic Press, San Diego, pp 331–421.
- Takata, R.T., 2011. Dietas desbalanceadas em aminoácidos indispensáveis e a adoção de estratégias na utilização de nutrientes para o pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Tese, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 94 pp.
- Tesser, M.B., Portella, M.C., 2003. Degradation analysis of microencapsulated diet in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) larvae intestine through scanning electron microscopy (SEM). *Acta Sci. Anim. Sci.* 25, 49–52.
- Tesser, M.B., Carneiro, D.J., Portella, M.C., 2005. Co-feeding of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) larvae with *Artemia* nauplii and microencapsulated diet. *J. Appl. Aquac.* 17, 47–49.
- Tesser, M.B., Portella, M.C., 2006. Ingestão de ração e comportamento de larvas de pacu em resposta a estímulos químicos e visuais. *Rev. Bras. Zootec.* 35, 1887–1892.
- Tesser, M.B., Portella, M.C., 2011. Estimulantes alimentares para larvas de pacu. *Rev. Bras. Zootec.* 40, 1851-1855.

- Tirapegui, J., Rogero, M.M., 2007. Metabolismo de proteínas. In: de Angelis, R.C., Tirapegui, J. (Eds.), Fisiologia da nutrição humana. Aspectos básicos, aplicados e funcionais, Atheneu, Rio de Janeiro, pp.69–109.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11, 107–184.
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Ng, W.K., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquaculture* 1, 10–57.
- Yang, Z., 1995. Development of a gas chromatographic method for profiling neutral lipids in marine samples. MSc Thesis. Memorial University of Newfoundland St. John's.
- Yúfera, M., Rodríguez, A., Lubián, L.M., 1984. Zooplankton ingestion and feeding behavior of *Penaeus kerathurus* larvae reared in the laboratory. *Aquaculture* 42, 217–224.
- Yúfera, M., Fernández-Días, C., Pascual, E., 2005. Food microparticules for larval fish prepared by internal gelation. *Aquaculture* 248, 253–262.
- Yúfera, M., Portella, M.C., Drust, S., Poncelet, D., 2009. Microencapsulation and aquaculture. *Aquac. Europe* 34, 18–20.
- Wilson, R.P., 2002. Amino acids and proteins. In: Halver, J.E. (Ed.), *Fish nutrition*, third ed. Academic Press, New York, pp. 145–175.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Phys. C* 130, 477–487.
- Zambonino Infante, J.L., Gisbert, E., Serasquete, C., Navarro, I., Gutiérrez, J., Cahu, C., 2008. In: Cyrino, J.E.P., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Eds.), *Feeding and digestive functions in fishes*, Science Publisher, Academic Press, New Hampshire, pp. 281–384.

CAPÍTULO 3 – CRESCIMENTO MUSCULAR DE LARVAS DE PACU *Piaractus mesopotamicus* EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS

Natalia de Jesus Leitão^{a,c}, Fernanda Regina Carani^b, Fernanda Losi Alves de Almeida^b, Maeli Dal-Pai-Silva^b e Maria Célia Portella^{a,c}

^a Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

E-mail: nati_leitao@yahoo.com.br

^b Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Morfologia, 18618-000, Botucatu, SP, Brasil.

E-mails: fcarani@gmail.com, fernandalosi@gmail.com, maeli@ibb.unesp.br

^c Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

E-mail: portella@caunesp.unesp.br

Normas para submissão ao periódico "Aquaculture"

Resumo

Larvas de pacu ($20,0 \pm 6,5$ mg) foram alimentadas por quatro semanas com náuplios de artêmia e com dietas formuladas: dieta comercial e dietas microencapsuladas contendo óleo de girassol (M-OG) ou óleo de peixe (M-OP). As dietas microencapsuladas foram formuladas para conter níveis de macronutrientes baseados na composição de náuplios de artêmia. A produção das microcapsulas foi feita combinando-se os processos de gelificação iônica e coacervação complexa e utilizando-se concentrado proteico de soro de leite como principal fonte proteica. As taxas de crescimento e eficiência proteica foram afetadas pelo tipo de dieta utilizada, sendo que as dietas M-OG e M-OP proporcionaram menor crescimento. Essa redução do crescimento somático causou diminuição do diâmetro médio e da frequência de fibras grandes (>40 μm) no compartimento profundo do músculo e, também, resultou em diminuição nos níveis de expressão de MyoD e Miogenina. O músculo epaxial dos juvenis alimentados com as dietas M-OG e M-OP mostrou sinais de atrofia. Os náuplios de artêmia e a dieta comercial proporcionaram desenvolvimento normal da musculatura, com fibras profundas em modelo de distribuição em mosaico. Entretanto, o limitado fornecimento de náuplios de artêmia reduziu a taxa de crescimento dos juvenis a partir da terceira semana de alimentação e modificou expressão de MyoD e Miogenina. Este estudo demonstra que diferenças nas taxas de crescimento dos juvenis de pacu provocadas pela alimentação alteram os níveis de expressão de MyoD e Miogenina, que por sua vez, estão relacionadas a mudanças na dinâmica do crescimento muscular.

Palavras-chave: celularidade muscular, expressão gênica de Fatores de Regulação Miogênica (MRFs), hiperplasia e hipertrofia, peixe.

1. Introdução

A larvicultura da maioria das espécies de peixes neotropicais e marinhos, assim como de crustáceos e bivalves, é dependente de organismos vivos para alimentação, tais como microalgas, rotíferos e artêmia. A diminuição do uso desses organismos e, conseqüentemente a introdução precoce de dietas formuladas para alimentação inicial de larvas, têm sido o principal desafio da larvicultura intensiva (Cahu e Zambonino Infante 2001). Para algumas espécies de peixes, a alimentação na fase larval com dietas formuladas é bem sucedida, entretanto, para a maioria das espécies, esta prática ainda representa um desafio (Portella e Dabrowski 2008).

Dietas potencialmente substitutas de alimentos vivos devem ser estáveis na água, palatáveis, nutricionalmente completas e digestíveis pelas larvas (Langdon 2003). Diversos estudos têm sido conduzidos com diferentes dietas e espécies aquícolas a fim de encontrar formulações e processamentos que possam substituir com eficiência os alimentos vivos (Baskerville-Briges e Kling 2000; Robin e Vincent 2003; Papadakis et al. 2009, Rodrigues 2012). Está bem estabelecido que dietas formuladas de boa qualidade nutricional podem substituir parcialmente o alimento vivo, mas grande parte das dietas usadas para sua substituição precoce causa atraso no crescimento das larvas. O Capítulo 2 desta Tese mostra que a substituição do alimento vivo por dietas microencapsuladas na larvicultura do pacu diminui o crescimento das larvas, mas não demonstra como esta alteração interfere na dinâmica de crescimento do músculo esquelético. Neste estudo, foram escolhidas dietas que favorecem e que prejudicam o crescimento das larvas a fim de determinar como a alimentação com dietas nutricionalmente inadequadas pode provocar mudanças nos mecanismos de crescimento muscular.

O tecido muscular esquelético, na maioria dos teleósteos, representa mais de 60% da massa corporal. Esta musculatura é formada, principalmente, por fibras brancas profundas e de contração rápida (até 90%), cobertas por fina camada superficial de fibras vermelhas de contração lenta que se localizam sob a pele; essas duas camadas são separadas por outra camada de fibras musculares intermediárias (Sänger e Stoiber 2001).

O espessamento do músculo esquelético nos peixes ocorre tanto por hipertrofia (aumento no diâmetro das fibras musculares) como por hiperplasia (recrutamento de novas fibras musculares), não só durante o desenvolvimento embrionário, mas também por grande parte da vida pós-eclosão (Johnston et al. 2010). Por representar a maior parte da massa muscular nos peixes, alterações no crescimento do músculo branco podem levar a alterações no crescimento somático dos animais. A maior parte dessas alterações está relacionada com a contribuição relativa da hiperplasia e hipertrofia das fibras sobre as características de celularidade muscular (distribuição das fibras musculares em tamanhos) (Rowlerson e Veggetti 2001). Já foi demonstrado que no músculo branco de larvas de peixes, as alterações na celularidade muscular estão relacionadas a variações por diversos fatores, como temperatura de incubação dos ovos (Hall e Johnston 2003; Assis et al. 2004; Macqueen et al. 2008; Johnston et al. 2009) e temperatura de criação (Alami-Durante et al. 2000). Modificações da celularidade do músculo branco também ocorrem em larvas após transição alimentar precoce (Leitão et al. 2011) e em função da composição da dieta em juvenis (Alami-Durante et al. 2010; Campos et al. 2010).

O objetivo deste estudo foi avançar no entendimento dos efeitos da nutrição larval sobre a celularidade do músculo esquelético (contribuição relativa da hiperplasia e hipertrofia para o crescimento muscular) e na expressão de genes relacionados ao crescimento muscular (MyoD e miogenina).

2. Material e métodos

2.1. Dietas

Para compor os tratamentos, foram utilizadas quatro diferentes dietas, sendo duas produzidas experimentalmente. Foram usados como controle náuplios de artêmia e a dieta comercial⁴. As duas dietas microencapsuladas experimentais foram produzidas de maneira idêntica, exceto pela fonte de óleo utilizada: óleo de girassol (M-OG) ou óleo de peixe (M-OP).

⁴ Hachtfry Encapsulon, Argent, EUA.

A preparação das dietas microencapsuladas experimentais foi feita na Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, Laboratório de Controle de Qualidade. As dietas foram produzidas pela combinação dos processos de gelificação iônica e coacervação complexa de acordo com metodologia proposta por Rodrigues (2012). As partículas foram formadas usando uma emulsão de pectina⁵ (2%, p/p) atomizada em solução de cloreto de cálcio⁶ (2%, p/p). Posteriormente, as partículas foram recobertas com proteínas do soro de leite⁷ e hidrolisado de peixe⁸. Os óleos e a mistura mineral e vitamínica⁹ foram emulsificados junto com a pectina. As partículas foram secas em liofilizador (Edwards Pirani 501, Crawley, West Sussex, Reino Unido) e acondicionadas em frascos protegidos da luz e mantidas à 4°C.

Todas as dietas foram caracterizadas em relação à umidade (secagem a 105°C por 24 horas), proteína bruta (LECO FP 528 nitrogen analyser, LECO Instruments, St Joseph, Michigan, EUA), lipídios (Bligh e Dyer, 1959) e cinzas (incineração em mufla a 550°C por 8 horas), de acordo como a metodologia da AOAC (2006) (Tabela 1).

O fator de correção do nitrogênio usado no cálculo da proteína da dieta comercial e dos náuplios de artêmia foi de 6,25. Para as dietas microencapsuladas experimentais utilizou-se o fator de 6,38, relativo à proteína do soro de leite. Foram feitas adaptações na metodologia de Bligh e Dyer (1959) para a determinação dos valores de lipídios das dietas microencapsuladas experimentais; as microcápsulas foram rompidas com citrato de sódio (2% p/p), submetidas à digestão enzimática com pepsina (0,3 mg/g; 4 horas) e, posteriormente, com pancreatina (0,3 mg/g; 12

5 Pectina cítrica de baixo teor de esterificação não-amidada, CPKelco, mBrasil.

6 Cloreto de cálcio anidro P.A. Dinâmica, Brasil

7 Concentrado proteico de soro de leite, Lacprodan, Argentina.

8 CPSP 90, Sopropêche, França.

9 Premix, Fri-Ribe, Brasil. Ácido fólico 1 mg, ácido pantotênico 20 mg, antioxidante BHT 125 mg, colina 150 mg, cobre 10 mg, ferro 100 mg, iodo 5 mg, manganês 70 mg, selênio 0,15 mg, vitamina A 3000 UI.kg⁻¹, vitamina B1 6 mg, vitamina B12 20 mg, vitamina B2 8 mg, vitamina B6 3 mg, vitamina C 350 mg, vitamina D3 3000 UI.kg⁻¹, vitamina E 200 mg, vitamina K 6 mg, zinco 150 mg, niacina 100 mg, biotina 0,10 mg.

horas), para a completa solubilização dos componentes das microcápsulas. Após, seguiu-se com a metodologia padrão.

O diâmetro das micropartículas reidratadas (pH 7,0) foi determinado automaticamente por meio do equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). O diâmetro $d(0,5)$ das micropartículas reidratadas foi de 272 μm ; $d(0,5)$ corresponde à frequência de 50% das partículas de menor diâmetro. A dieta comercial usada como controle apresentou diâmetro de 250-400 μm (segundo indicações do fabricante).

Tabela 1. Composição centesimal (g.Kg^{-1} , base seca) dos náuplios de artêmia e das dietas microencapsuladas fornecidas como alimento para os juvenis de pacu.

Dieta	Artêmia	Comercial	M-OG	M-OP
Umidade, g kg^{-1}	783	96	859	856
Proteína, g kg^{-1}	547	525	551	547
Lipídios, g kg^{-1}	130	170	241	237
Cinzas, g kg^{-1}	56	134	12	11

Dieta comercial Hatchfry Encapsulon (Argent, EUA) e dietas microencapsuladas produzidas com óleo de girassol (M-OG) e óleo de peixe (M-OP).

2.2. Peixes

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal.

Foram utilizados larvas de pacu (16 dias após eclosão, dpe) com peso úmido médio de $20,0 \pm 6,5$ mg, alimentadas apenas com náuplios de artêmia desde o início da alimentação exógena. Os peixes foram estocados (10 larvas L^{-1}) em 16 tanques de polietileno, com 50 litros de água proveniente de poço artesiano em fluxo contínuo e aeração artificial constante. Os resíduos acumulados no fundo dos tanques foram sifonados diariamente.

Os peixes foram alimentados com náuplios de artêmia ou com as diferentes dietas formuladas: dieta comercial e as outras duas dietas microencapsuladas

experimentais produzidas utilizando os óleos de girassol (M-OG) ou peixe (M-OP). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições por grupo experimental.

Foram oferecidos 2,5 g de dieta microencapsulada por tanque diariamente, divididos em cinco refeições, durante todo o experimento. O grupo alimentado apenas com artêmia recebeu 2000 náuplios peixe⁻¹ diariamente por todo o experimento. Essa quantidade foi estabelecida a fim de manter a mesma quantidade em peso seco de náuplios de artêmia e de dieta microencapsulada oferecida. Os peixes foram co-alimentados com náuplios de artêmia em quantidades decrescentes (1500, 750 e 250 náuplios peixe⁻¹) nos três primeiros dias de alimentação.

A circulação da água foi interrompida por 30 minutos após o fornecimento dos alimentos para evitar dispersão e possível perda das dietas. A temperatura da água foi mantida em $30,1 \pm 0,4$ °C, a concentração de oxigênio dissolvido em $5,1 \pm 0,2$ mg L⁻¹ e o fotoperíodo foi o natural durante todo o período experimental.

2.3. Desempenho e eficiência de utilização de proteína

Os peixes de cada tanque (n = 25) foram coletados no início e semanalmente durante 28 dias. Os peixes foram anestesiados e eutanasiados em solução de benzocaína (0,2 g L⁻¹), fixados em formalina 10% e preservados em etanol 70%, para posterior mensuração do peso. O ganho em peso corporal (GP) e as taxas de crescimento específico (TCE) e eficiência proteica (TEP) foram calculados de acordo com as seguintes expressões:

$$GP = P_F - P_I$$

$$TCE = 100 \times (\ln P_F - \ln P_I) / d$$

$$TEP = \text{ganho em peso corporal (mg)} / \text{proteína bruta consumida (mg)}$$

sendo, P é o peso individual dos peixes; F e I representam valores final e inicial; d é o número de dias entre as biometrias.

Para as análises de composição corporal, 50 peixes de cada tanque foram coletados após quatro semanas de alimentação. Os peixes inteiros foram analisados

quanto à umidade (secagem a 105°C por 24 horas), proteína bruta (LECO, nitrogênio x 6,25) e lipídio (Bligh e Dyer, 1959).

2.4. Histologia

Larvas e juvenis de pacu foram anestesiados e eutanasiados em benzocaína (0,2 g L⁻¹) no início e após 28 dias de alimentação, respectivamente. Fragmentos do músculo esquelético da região dorsal (n = 10 peixes por grupo experimental) foram fixados em solução de Karnovsky por 24 horas, lavados em tampão fosfato de Sorensen (pH 7,2) e preservados em solução etanólica 70%. As amostras foram incluídas em Historesina® (Leica, Heidelberg, Nussloch, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Cortes histológicos transversais (4 µm) foram obtidos com a utilização de micrótomo (Leica, RM 2245, Heidelberg, Nussloch, Alemanha) utilizando-se navalhas de vidro e, posteriormente, corados com Hematoxilina de Harris e Floxina 0,5%.

Para avaliar o grau de hipertrofia e hiperplasia das fibras, a celularidade muscular foi estudada no quadrante epaxial direito do compartimento profundo do músculo esquelético do pacu. Utilizando sistema de análise de imagens (Leica IM50, Heidelberg, Nussloch, Alemanha), o menor diâmetro de uma população de 200 fibras do compartimento profundo foi individualmente determinado para não permitir os erros que poderiam ocorrer caso algum exemplar não tivesse sido seccionado exatamente em corte transversal (Dubowitz, 1985). O diâmetro médio das cinco maiores fibras (“diâmetro máximo”) foi determinado com o intuito de quantificar a hipertrofia máxima das fibras musculares (Alami-Durante et al., 2010). Fibras musculares foram distribuídas em cinco classes de diâmetro (D , µm): $D \leq 10$, $10 < D \leq 20$, $20 < D \leq 30$, $30 < D \leq 40$ e $D > 40$ (Assis et al. 2004 e Leitão et al. 2011).

2.5. Expressão gênica de *MyoD* e *Miogenina*

Os peixes no início e no final do experimento foram anestesiados e eutanasiados em gelo. Dez peixes de cada tanque foram dissecados; os peixes foram seccionados para separar a região dorsal (maior parte da musculatura) da

cabeça, cauda e cavidade abdominal. Amostras do músculo esquelético (mínimo de 50 mg de tecido) foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, estocadas a -80°C .

As amostras de RNA total do músculo do pacu foram isoladas utilizando o reagente *TRIzol* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), seguindo-se as indicações do fabricante. As amostras de RNA total foram analisadas em espectrofotômetro do tipo “*NanoVue Measuring Nucleic Acids and Proteins*” (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) a 230, 260 e 280 nm. A pureza das amostras de RNA foi assegurada pelas razões A_{230}/A_{280} e A_{260}/A_{280} nm de no mínimo 1,8. A integridade das amostras de RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 nM EDTA) acrescido do corante *GelRed*[®] (Biotium, Hayward, CA, EUA). Os géis foram visualizados usando Foto UV 450 DNA Transilluminator (Fotodyne Incorporated) e a integridade do RNA total extraído foi confirmada pela presença das bandas referentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S.

Para remoção do possível resíduo de DNA genômico contaminante, alíquotas de 2 μg de RNA total foram tratadas com a enzima *DNase I – Amplification Grade* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante. O RNA total purificado foi submetido à reação de transcrição reversa utilizando-se o *High Capacity cDNA Synthesis Kit* (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), em volume final de 100 μL , de acordo com protocolo do fabricante.

A avaliação quantitativa da expressão gênica dos MRFs MyoD e Miogenina na musculatura esquelética do pacu foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR) utilizando-se o equipamento *ABI 7300 Real-time PCR System* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA). Amostras de cDNA (20 $\text{ng}/\mu\text{L}$) foram amplificadas em duplicata usando *Power SYBR Green PCR Master Mix 2x* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) e 400 nM de cada *primer* (Tabela 2), em reação com volume final de 25 μL . Uma amostra sem cDNA foi usada como controle negativo para verificar a ausência de amplificação de contaminantes. As condições de

termociclagem universal para qPCR foram: 10 min a 95°C, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e anelamento/extensão a 60°C por 1 min.

Os pares de *primers* para os genes da MyoD, Miogenina e RNA ribossomal 18S (RNAr 18S) foram os mesmos utilizados por Almeida et al. (2010), em estudos com musculatura esquelética de pacu em diferentes estágios do desenvolvimento (Tabela 2). O RNAr 18S foi usado como gene de referência para normalizar os dados de expressão gênica quantitativa. Este gene não apresentou variação na expressão relativa entre as amostras analisadas, semelhante ao observado por Almeida et al. (2010).

Para cada amostra, foi gerado um gráfico de amplificação, que mostra o aumento da fluorescência (ΔRn) ao longo de cada ciclo da PCR. Ao término de cada PCR, foi feita a análise da Curva de Dissociação dos fragmentos amplificados, o que permitiu avaliar a especificidade de cada conjunto de *primers*.

O nível basal de fluorescência *baseline* e o limiar de detecção de fluorescência *threshold* foram ajustados manualmente para MyoD, Miogenina e RNAr 18S, gerando um *ciclo threshold* (*Ct*) para cada amostra.

Tabela 2. *Primers* usados na qPCR para os genes MyoD, Miogenina e RNAr 18S na musculatura esquelética de pacu.

Gene	No. Acesso GenBank	Sequência (5'-3')
MyoD	FJ686692	Forward: CGCCATCAGCTACATCGAG Reverse: ATCCAGGACGGGGTAGTAGG
Miogenina	FJ810421	Forward: TCCCAGACCAGAGGTTTTATGAA Reverse: TCTTGGTATCCTGCTTGGTCAA
RNAr 18S	GQ337002	Forward: CGGAATGAGCGTATCCTAAACC Reverse: GCTGCTGGCACCAGACTTG

Foi usado o método do *Ct* comparativo ($\Delta\Delta Ct$) para a quantificação relativa (Livak e Schmittgen, 2001) da expressão dos genes da MyoD e Migenina. Para cada amostra foi obtido o valor de *Ct* para o gene-alvo e para o gene de referência a partir da média dos *Cts* de cada duplicata. A diferença entre os *Cts* foi calculada para cada amostra: $\Delta Ct = (Ct_{gene\ alvo} - Ct_{gene\ de\ referência})$. Todos os valores foram

normalizados pelo valor de ΔCt do calibrador por meio da seguinte expressão $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{gene\ obtido\ para\ cada\ amostra} - \Delta Ct_{calibrador})$. O calibrador escolhido foi a amostra de pacu que obteve o menor valor de expressão relativa. Foi utilizada uma amostra do grupo alimentado com a dieta M-OG para o gene da MyoD e uma amostra do grupo alimentado com náuplios de artêmia para o gene da Miogenina. A quantificação relativa da expressão gênica de MyoD e Miogenina em cada amostra foi calculada em relação à expressão gênica do calibrador ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), expressa em unidades arbitrárias e normalizadas em relação ao gene de referência RNAr 18S.

2.6. Análises estatísticas

As análises de variância e os testes de Cramer Von Mises e Brown-Forsythe foram realizados usando o software SAS versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) com os dados transformados em arco-seno (TCE, TEP e frequência das fibras musculares em classes de diâmetro) ou não transformados (demais parâmetros). As análises de variância foram realizadas com as médias de cada grupo experimental para ganho em peso corporal, taxa de crescimento específico, taxa de eficiência proteica, composição corporal e níveis de expressão gênica; e foram realizadas com indivíduos para os diâmetros das fibras musculares. Para os resultados que apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$), as médias foram estudadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3. Resultados

3.1. Crescimento, utilização de proteína e composição corporal

Os náuplios de artêmia proporcionaram os maiores valores de ganho em peso e taxa de eficiência proteica aos pacus entre todas as dietas testadas ($p < 0,05$) (Tabela 3), enquanto os menores valores de ganho em peso e taxa de eficiência proteica foram encontrados nos pacus alimentados com dietas microencapsuladas experimentais. A dieta produzida com óleo de peixe (M-OP) promoveu menor ganho

em peso em comparação com a dieta produzida com óleo de girassol (M-OG) ($p < 0,05$). Em contraste, a taxa de eficiência proteica não diferiu entre as duas dietas microencapsuladas experimentais ($p > 0,05$).

Baixos valores médios de TCE foram verificados ao longo de todo período experimental nos pacus alimentados com as dietas microencapsuladas experimentais (Tabela 3); estes valores alcançaram no máximo $5\% \text{ mg dia}^{-1}$ nos pacus do tratamento M-OG. As baixas taxas de crescimento específico refletiram no baixo ganho em peso observado nos pacus dos tratamentos M-OG e M-OP. As taxas de crescimento específico dos pacus alimentados com náuplios de artêmia e com dieta comercial não diferiram entre si ($p > 0,05$), exceto na terceira semana de alimentação (Tabela 3). Nesta semana, a TCE dos tratamentos com náuplios de artêmia e com as dietas M-OG e M-OP não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$). Na última semana de avaliação, a menor TCE ocorreu no tratamento M-OP ($p < 0,05$); os demais tratamentos não diferiram entre si ($p > 0,05$).

O maior teor médio de proteína bruta foi observado na carcaça dos juvenis alimentados com náuplios de artêmia por todo experimento; este valor diferiu ($p < 0,05$) apenas dos juvenis alimentados com a dieta comercial (Tabela 3). Os maiores teores de umidade ocorreram nas carcaças dos peixes alimentados com as dietas microencapsuladas experimentais, sendo o maior teor verificado nos pacus alimentados com a dieta M-OG ($p < 0,05$). O maior teor de lipídios foi encontrado na carcaça dos juvenis alimentados com a dieta comercial ($p < 0,05$).

Tabela 3. Crescimento, utilização de proteína e composição corporal dos juvenis de pacu alimentados com diferentes dietas.

Dietas	Artêmia	Comercial	M-OG	M-OP
<i>Crescimento</i>				
GP (mg)	230,5±4,1 A	191,3±3,0 B	22,3±3,7 C	12,1±4,5 D
TCE (% mg dia ⁻¹)				
Semana 1	17,7±0,3 A	12,9±2,0 A	2,1±1,8 B	0,8±1,2 B
Semana 2	13,4±0,5 A	11,0±2,0 A	3,6±2,2 B	4,6±0,8 B
Semana 3	1,8±0,4 B	6,7±0,9 A	1,3±2,1 B	1,2±0,9 B
Semana 4	3,3±0,5 A	3,0±0,6 A	5,0±3,1 A	0,2±0,3 B
<i>Eficiência de proteína</i>				
TEP	2,68±0,03 A	1,90±0,11 B	0,25±0,04 C	0,12±0,06 C
<i>Composição corporal final (g kg⁻¹)</i>				
Umidade	849,9±1,7 C	844,6±2,6 D	891,8±2,8 A	878,7±1,4 B
Proteína bruta	736,7±17,0 A	703,6±17,7 B	723,9±12,9 AB	708,4±9,3 AB
Lipídios	56,1±3,5 B	109,4±9,6 A	72,8±6,3 B	73,2±8,3 B

Dieta comercial Hatchfry Encapsulon (Argent, EUA) e dietas microencapsuladas produzidas com óleo de girassol (M-OG) e óleo de peixe (M-OP).

Valores expressos como médias±desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

3.2. Morfologia das fibras musculares

No início do experimento, larvas de pacu com 20 mg de peso úmido apresentaram fibras musculares distribuídas em três camadas distintas (Figura 1A); uma camada formada por fibras pequenas e arredondadas localizada mais superficialmente, logo abaixo da epiderme; uma camada mais profunda, composta por fibras maiores e de formato variável, compondo a maior parte da massa muscular; uma camada intermediária disposta entre as camadas superficial e profunda, próxima ao nervo da linha lateral. As fibras musculares superficiais mostraram-se mais acidófilas em comparação às demais, reagindo mais intensamente à Floxina.

A camada profunda apresentou aparência tipicamente em mosaico em corte transversal, caracterizado por fibras de diferentes diâmetros (Figura 1B). Observaram-se fibras com núcleos localizados perifericamente (fibras maduras), embora, em algumas delas, o núcleo estivesse no centro na fibra muscular (fibras imaturas). Uma concentração de fibras musculares de pequeno diâmetro foi identificada na região imediatamente abaixo da nadadeira dorsal (zona de proliferação de mioblastos) (Figura 1C).

No músculo esquelético dos pacus em corte transversal notou-se uma bainha de tecido conjuntivo envolvendo cada fibra muscular, caracterizando o endomísio e outra agrupando as fibras em fascículos (Figura 1B). Uma espessa bainha de tecido conjuntivo foi observada circundando todo o músculo, logo abaixo da derme (Figura 1C). Capilares foram identificados nos espaços do tecido conjuntivo, reconhecíveis pelas hemácias com núcleos basófilos contidas no seu interior (Figura 1D).

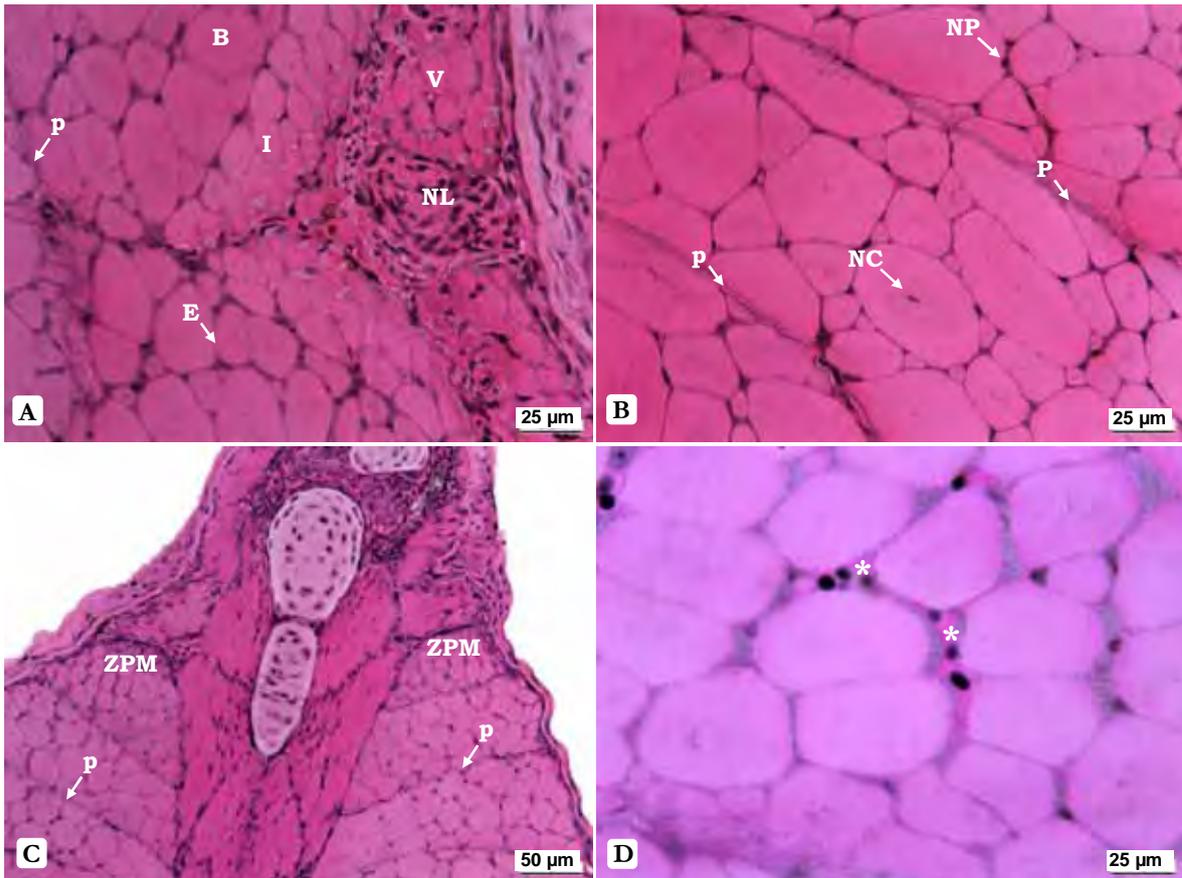


Figura 1. Secções transversais do músculo esquelético de larvas pacu no início do experimento. (A) Fibras musculares distribuídas em três camadas distintas: V. Superficial, B. Profunda e I. Intermediária. (B) Camada profunda com aparência em mosaico, formada por fibras de diferentes tamanhos. Núcleos periféricos e alguns núcleos centrais. (C) Fibras de pequeno diâmetro localizadas na região abaixo da nadadeira dorsal, caracterizando uma zona de proliferação de mioblastos (ZPM). (D) Detalhe de capilar com células sanguíneas no seu interior (asteriscos), localizados nos espaços do tecido conjuntivo. Coloração HF.

E: Endomísio. P: Tecido conjuntivo análogo ao perimísio dos mamíferos. NL: Nervo da linha lateral. NP: Núcleo periférico. NC: Núcleo central.

Observou-se espessamento das camadas musculares dos agora juvenis de pacus após 28 dias de alimentação com náuplios de artêmia e com a dieta comercial. Nesta fase, a morfologia do músculo esquelético foi similar nos peixes desses dois grupos. Fibras musculares com núcleos periféricos foram identificadas em todas as camadas musculares (Figura 2A e B). Fibras menores e com formato arredondado foram observadas na camada superficial e na intermediária (Figura 2A). A camada profunda caracterizou-se por um mosaico de fibras poligonais de diferentes diâmetros, compondo a maior parte da musculatura (Figura 2B). Fibras pequenas e de formato circular localizaram-se na zona de proliferação de mioblastos

na região dorsal do músculo epaxial (Figura 2C). Capilares mais espessos e repletos de hemácias foram observados próximos à camada superficial (Figura 2D).

Não foi possível perceber espessamento das camadas musculares nos pacus alimentados com as dietas microencapsuladas M-OG e M-OP, que apresentaram morfologia semelhante às larvas no início do experimento (Figura 3 A). Adicionalmente, o músculo epaxial em corte transversal mostrou sinais de atrofia. Em geral, as fibras musculares mostraram formas variadas, endomísio delgado, sarcoplasma retraído e núcleos periféricos bastante evidentes (Figura 3B e 3C). Muitas fibras pequenas e irregulares foram observadas entre fibras maiores. Em alguns casos, houve atrofia mais severa com perda de massa muscular, produção de tecido conjuntivo no espaço intersticial, localização periférica extrema dos núcleos e fragmentação do sarcoplasma (Figura 3D). Sinais de atrofia foram observados nas fibras musculares das três camadas, mas em maior grau na camada profunda.

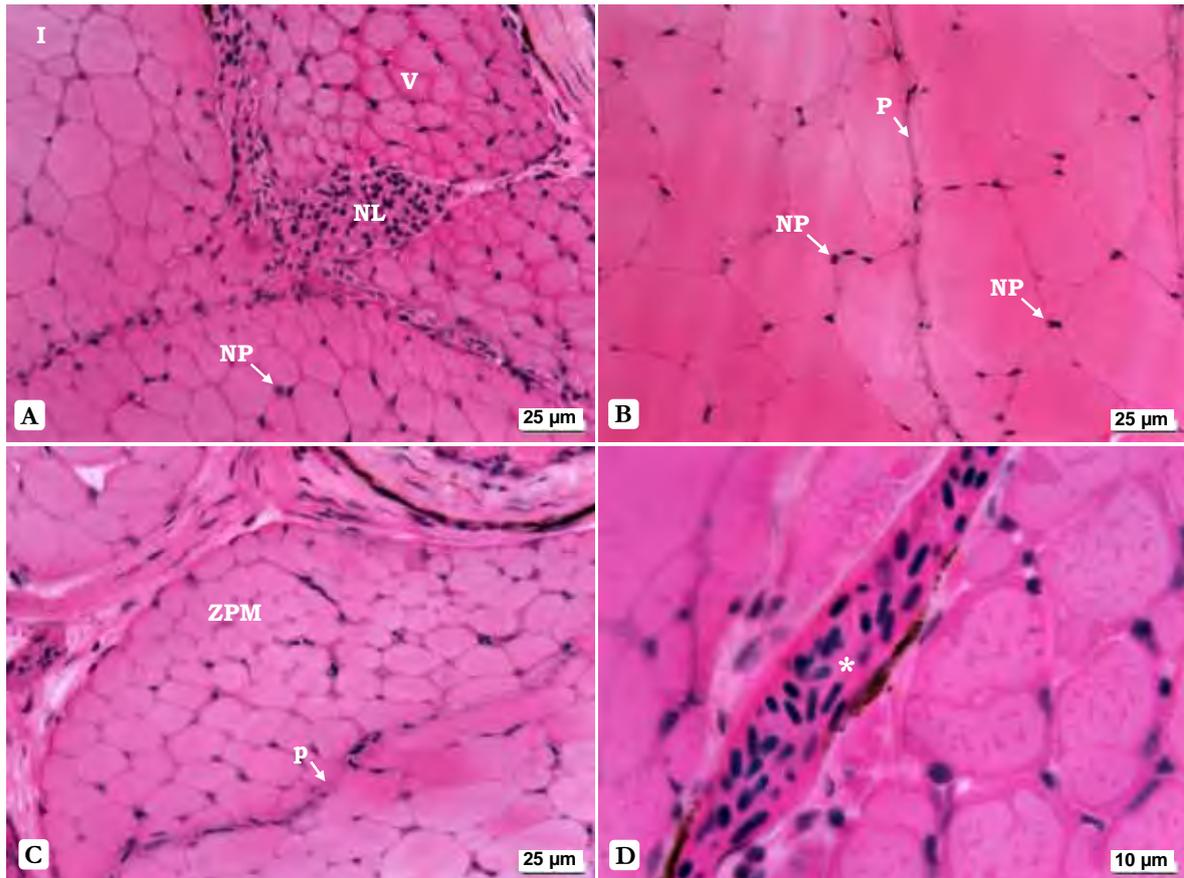


Figura 2. Secções transversais do músculo esquelético de larvas de pacu no final do experimento: tratamentos controle com náuplios de artêmia e dieta comercial. (A) Náuplios de artêmia. Camadas superficial e intermediária formada por fibras menores, arredondadas e multinucleadas. Núcleos localizados periféricamente às fibras. (B) Náuplios de artêmia. Camada profunda formada por fibras poligonais de diferentes diâmetros. Fibras com diversos núcleos localizados periféricamente. (C) Náuplios de artêmia. Zona de proliferação de mioblastos (ZPM) na região dorsal do músculo epaxial formada por fibras pequenas e circulares. (D) Dieta comercial. Detalhe de capilar repleto por células sanguíneas localizados na camada superficial da musculatura (asterisco). Coloração HF.

V: Camada superficial. I: Camada intermediária. P: Tecido conjuntivo análogo ao perimísio dos mamíferos. NL: Nervo da linha lateral. NP: Núcleo periférico.

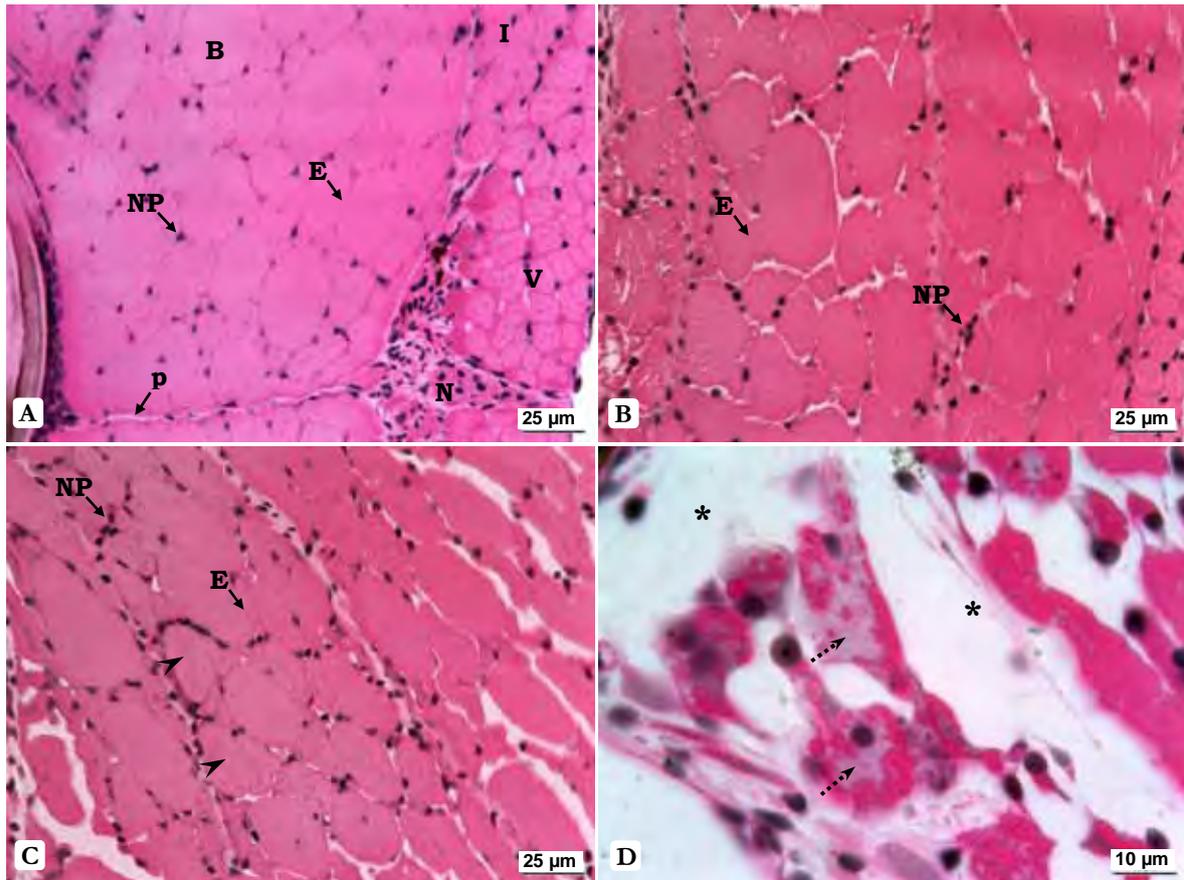


Figura 3. Secções transversais do músculo esquelético de larvas de pacu no final do experimento: tratamentos M-OG e M-OP. (A) M-OG. Fibras musculares das camadas superficial, profunda e intermediária. Camada profunda com fibras multinucleadas e núcleos periféricos. (B) M-OG. Músculo epaxial com sinais de atrofia. Fibras de formatos variados, endomísio delgado e núcleos periféricos bastante evidentes. (C) M-OP. Camada profunda com sinais de atrofia: fibras pequenas, irregulares e sarcoplasma retraído (cabeça de seta). (D) M-OP. Músculo esquelético com sinais de atrofia severa. Detalhe da desorganização de miofibrilas (seta pontilhada) e ocupação por tecido conjuntivo (asterisco). Coloração HF.

V: Camada superficial. B: Camada profunda. I: Camada intermediária. NL: Nervo da linha lateral. NP: Núcleo periférico. E: Endomísio. P: Bainha de tecido conjuntivo.

3.3. Morfometria das fibras musculares

Variações na distribuição das fibras da camada profunda do músculo epaxial foram verificadas quando diferentes dietas foram fornecidas aos pacus (Figura 4). De maneira geral, observou-se aumento da frequência de fibras maiores com o uso dos náuplios de artêmia e dieta comercial, enquanto que as dietas M-OG e M-OP provocaram aumento da frequência de fibras menores, em relação às larvas com 16 dpe, no início do experimento.

Pacus alimentados com dieta comercial tiveram a maior frequência de fibras grandes (diâmetro maior que 40 μm) enquanto a menor frequência ocorreu no tratamento M-OG ($p < 0,05$) (Tabela 4). Fibras maiores que 40 μm não foram identificadas nos pacus alimentados com a dieta M-OP. Fibras pequenas (diâmetro menor que 10 μm) foram encontradas em maior frequência no compartimento profundo do músculo dos pacus que receberam as dietas microencapsuladas M-OG e M-OP ($p < 0,05$).

Comparado aos pacus alimentados com a dieta comercial e com náuplios de artêmia, aqueles alimentados com a dieta M-OG apresentaram menor frequência de fibras entre 20 e 30 μm ($p < 0,05$) (Tabela 4). Uma diminuição da frequência de fibras entre 30 e 40 μm ocorreu com uso da dieta M-OP após 28 dias de alimentação, em comparação às larvas no início do período de alimentação ($p < 0,05$). Não foi observada diferença significativa na frequência das fibras de 10 a 20 μm entre todos os tratamentos.

A alimentação por quatro semanas com as dietas microencapsuladas experimentais provocou mudanças nos diâmetros das fibras musculares (Tabela 4). Pacus alimentados com dietas M-OG e M-OP apresentaram menores valores da mediana do diâmetro das fibras comparados com os pacus alimentados com náuplios de artêmia e dieta comercial ($p < 0,05$).

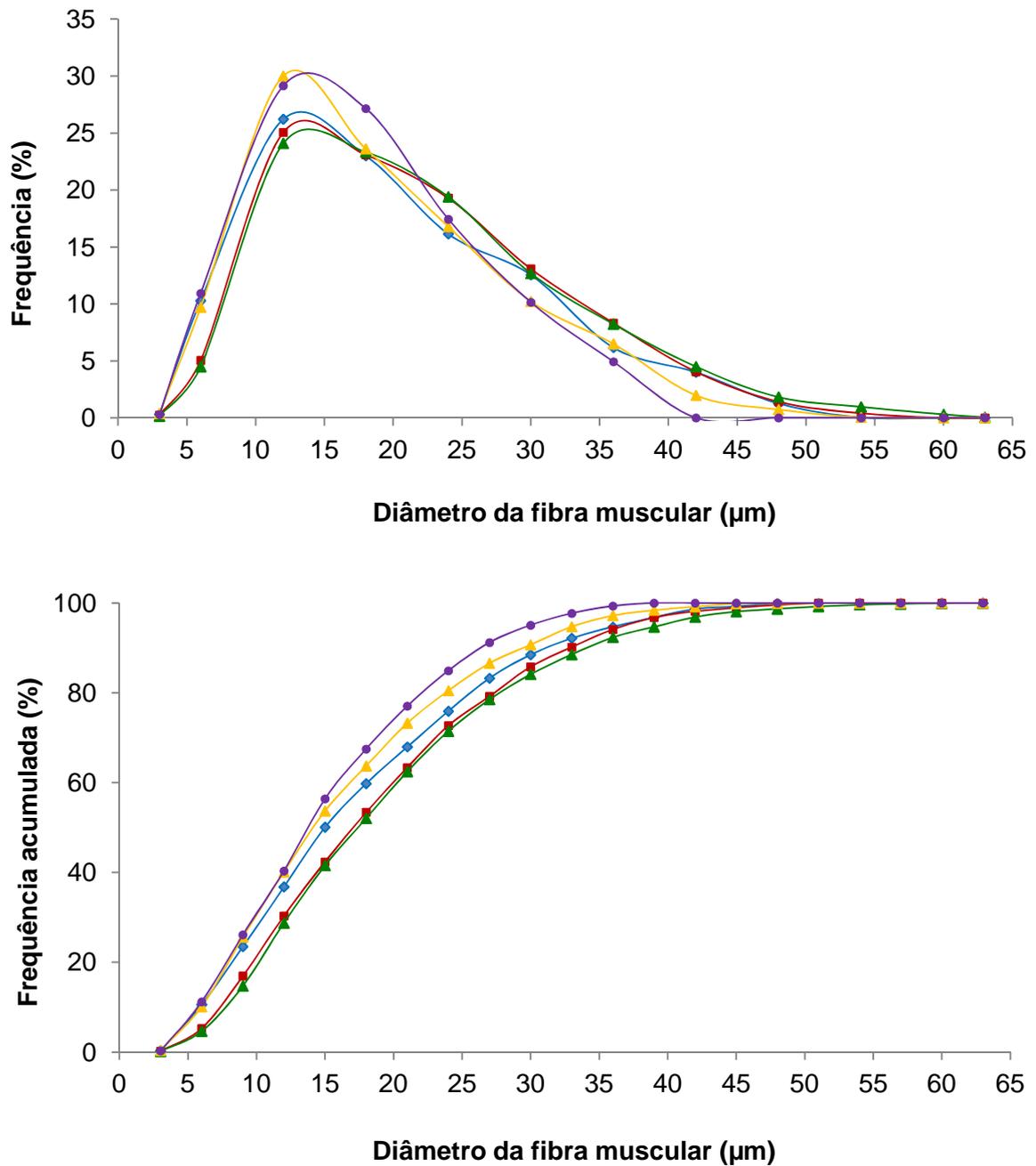


Figura 4. Distribuição das fibras musculares profundas de acordo com seus diâmetros em pacus alimentados por quatro semanas com náuplios de artêmia (■), dieta comercial (▲) e dietas microencapsuladas experimentais contendo óleo de girassol M-OG (▲) e óleo de peixe M-OP (●). Losangos azuis (◆) representam as fibras musculares nas amostras iniciais de larvas de pacu com 20 mg de peso.

Tabela 4. Celularidade no compartimento profundo do músculo dos pacus após quatro semanas de alimentação.

Dietas	Inicial	Artêmia	Comercial	M-OG	M-OP
<i>Diâmetro (D, µm) das fibras da camada profunda do músculo epaxial</i>					
<i>D médio</i>	17,2±0,8 BC	18,7±1,6 AB	19,3±1,3 A	16,1±1,1 CD	15,1±1,2 D
<i>Mediana do D</i>	15,1±1,0 B	17,1±1,6 A	17,3±1,2 A	14,1±1,3 B	13,8±1,2 B
<i>D máximo</i>	45,9±2,6 B	46,4±3,3 B	52,4±4,4 A	43,9±3,9 B	37,5±1,6 C
<i>D das 5 menores</i>	3,5±0,4 B	4,3±0,9 A	4,4±0,4 A	3,8±0,5 AB	3,8±0,6 AB
<i>D das 5 maiores</i>	42,6±1,6 B	43,2±3,0 B	48,3±3,7 A	39,8±2,8 B	34,5±1,9 C
<i>Frequência (%) das fibras musculares com diâmetro</i>					
≤10 µm	27,5±4,7 AB	21,2±5,5 BC	19,2±4,2 C	30,9±6,5 A	31,1±4,9 A
10<D≤20 µm	38,4±3,4	38,9±4,6	40,1±5,2	39,7±3,6	42,1±4,3
20<D≤30 µm	22,6±3,9 AB	25,6±2,2 A	24,7±3,0 A	20,1±2,8 B	21,9±4,5 AB
30<D≤40 µm	9,0±1,5 A	11,6±3,7 A	11,5±3,9 A	8,0±2,7 AB	4,9±2,9 B
>40 µm	2,4±1,0 AB	2,7±2,0 AB	4,4±2,0 A	1,2±1,0 B	-

Dieta comercial Hatchfry Encapsulon (Argent, EUA) e dietas microencapsuladas produzidas com óleo de girassol (M-OG) e óleo de peixe (M-OP).

Valores expressos como médias±desvio padrão (n=10 indivíduos). Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Os diâmetros médio e máximo das fibras no compartimento profundo do músculo dos pacus variaram conforme a dieta utilizada. A Tabela 4 mostra a diminuição desses valores nos pacus alimentados com a dieta microencapsulada M-OP em relação às larvas iniciais. O diâmetro máximo e o diâmetro das cinco maiores fibras foram maiores nos pacus alimentados com a dieta comercial ($p < 0,05$). O diâmetro das cinco menores fibras não foi afetado, significativamente, pelas dietas fornecidas ($p > 0,05$).

3.4. Expressão relativa dos genes da MyoD e Miogenina

Os maiores níveis de expressão relativa dos genes da MyoD e Miogenina na musculatura esquelética ocorreram nos pacus que receberam a dieta comercial ($p < 0,05$) (Figura 5). Os níveis médios de expressão da MyoD não foram diferentes

no músculo dos pacus alimentados com náuplios de artêmia e com as dietas M-OG e M-OP ($p>0,05$).

Peixes do início do experimento (com 20 mg), antes da alimentação com as dietas formuladas, apresentaram alto nível de expressão de MyoD (Figura 5). Este nível de expressão foi igual apenas ao nível de MyoD na musculatura dos pacus após quatro semanas de alimentação com dieta comercial ($p>0,05$).

A dieta microencapsulada M-OG não promoveu mudança significativa na expressão de Miogenina no músculo dos pacus após quatro semanas de alimentação (Figura 5). O menor nível de expressão de Miogenina ocorreu na musculatura dos pacus alimentados com náuplios de artêmia. Este foi estatisticamente igual aos níveis de expressão dos pacus do grupo M-OG e daquelas no início da alimentação. Os níveis médios de expressão de Miogenina foram similares entre os pacus alimentados com a dieta comercial e com a dieta M-OP ($p>0,05$).

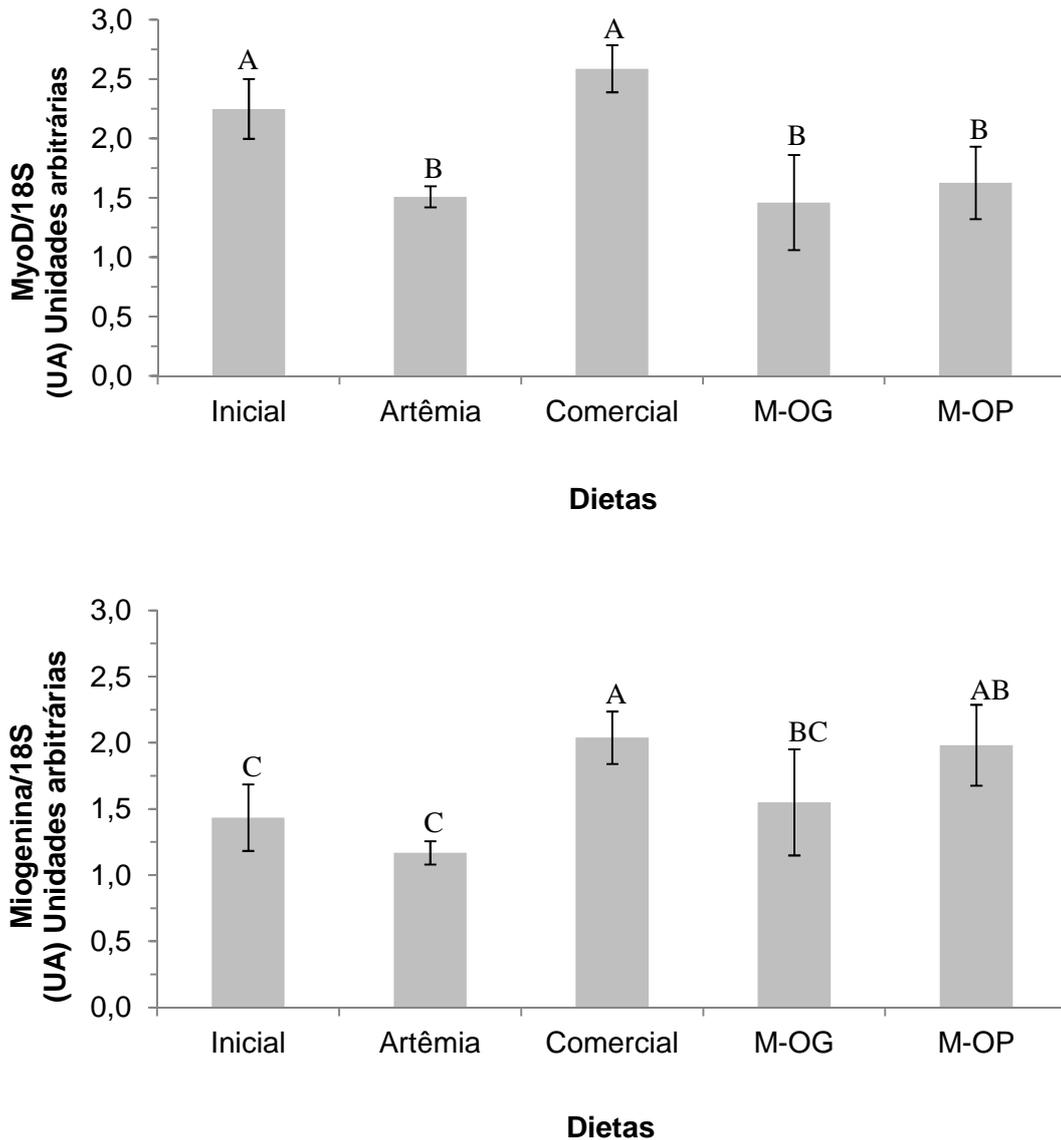


Figura 5. Conteúdo de RNAm estimado no músculo esquelético de pacus no início do período experimental (Inicial) e após quatro semanas de alimentação com náuplios de artêmia, dieta comercial e dietas microencapsuladas experimentais contendo óleo de girassol (M-OG) e óleo de peixe (M-OP). Letras iguais comparando os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

4. Discussão

As larvas de pacu alimentadas com as dietas microencapsuladas M-OG e M-OP cresceram mais lentamente e tiveram menor eficiência proteica do que aquelas alimentadas com náuplios de artêmia. A reduzida taxa de crescimento dos pacus alimentados com as dietas M-OG e M-OP não foi consequência da substituição do alimento vivo pelo formulado. Comparados à dieta comercial, as dietas microencapsuladas foram ineficientes nutricionalmente para alimentar larvas de pacu. Embora o balanço nutricional das dietas produzidas por microencapsulação tenha sido ajustado baseando-se no perfil nutricional (proteína bruta, lipídios e umidade) dos náuplios de artêmia, não foram considerados o balanço em micronutrientes, ácidos graxos e aminoácidos.

A demanda por alimentos e nutrientes de qualidade é elevada nas fases iniciais de desenvolvimento das larvas de peixes (Conceição et al. 2011), pois a taxas de crescimento e de síntese de proteínas são altas, já que seus órgãos e sistemas estão em formação. Larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Jomori et al. 2008), surubins *Pseudoplatystoma spp* (Takata 2007) e piau *Leporinus macrocephalus* (Cericato 2005) apresentam taxas de crescimento da ordem de 30 a 250 vezes nas duas primeiras semanas de alimentação quando supridas com náuplios de artêmia. Entretanto, essas taxas podem ser drasticamente diminuídas (por exemplo, não ultrapassar uma vez no mesmo período), dependendo da qualidade do alimento (Jomori 2005; Leitão et al. 2011).

O crescimento e o desenvolvimento muscular de larvas de peixes estão relacionados às diferenças das taxas de crescimento somático (Galloway et al. 1999). Os resultados desse estudo indicam que diferentes taxas de crescimento provocadas por diferentes condições nutricionais alteram a morfologia e celularidade muscular e mudam a expressão dos fatores reguladores da miogênese (MyoD e Miogenina) no músculo esquelético de juvenis de pacu.

Em larvas de peixes, a musculatura esquelética compreende aproximadamente 20% do volume corporal e aumenta para 60% em juvenis. A musculatura é, portanto, o maior tecido e também aquele que apresenta maior crescimento em larvas e juvenis (Kjørsvik et al. 2011). Neste estudo, ocorreu

desenvolvimento normal da musculatura com o uso dos náuplios de artêmia e da dieta comercial; os juvenis de pacu exibiram fibras musculares brancas em padrão de distribuição em mosaico, caracterizado por fibras poligonais de diferentes diâmetros, como descrito anteriormente por Almeida et al. (2010) e Leitão et al. (2011) em pacu e por Rowleron e Veggetti (2001) em outras espécies de peixes.

Por outro lado, o músculo epaxial dos juvenis alimentados com as dietas experimentais M-OG e M-OP mostrou sinais de atrofia. Em geral, a morfologia do tecido muscular esquelético identificou fibras pequenas com sarcoplasma fragmentado e produção de tecido conjuntivo no espaço intersticial. Em situações de privação alimentar, a celularidade do músculo esquelético é alterada e o processo de atrofia é identificado (Nebo 2011). Alguns peixes utilizam proteína muscular como principal fonte energética (Butler, 1968) e, por isso, pode ocorrer proteólise muscular durante a restrição alimentar (Seilliez et al. 2008).

A redução no crescimento somático observada nos juvenis de pacu alimentados com as dietas M-OG e M-OP causou redução do diâmetro médio e da mediana das fibras, diminuiu a frequência de fibras grandes ($>40 \mu\text{m}$) e aumentou da frequência de fibras pequenas ($<10 \mu\text{m}$) no compartimento profundo do músculo esquelético. Estes resultados confirmam a plasticidade do crescimento muscular esquelético em juvenis de pacu, a qual está relacionada com a deficiência nutricional dessas dietas e com a reduzida taxa de crescimento dos peixes.

Já foi demonstrado que larvas (Assis et al. 2004; Leitão et al. 2011) e juvenis de pacu (Almeida et al. 2008; Almeida et al. 2010) aumentam sua massa muscular por hiperplasia e hipertrofia. As mudanças observadas na distribuição das fibras musculares em tamanhos podem refletir em mudanças na hiperplasia e/ou hipertrofia do tecido muscular. Adicionalmente, esses dois processos estão acompanhados de alterações na expressão dos fatores de regulação miogênica (MRFs), relacionados ao crescimento muscular, como já visto nesta espécie de peixe (Almeida et al. 2008; Almeida et al. 2010; Leitão et al. 2011).

A expressão relativa dos MRFs pode ser usada para avaliar a atividade de células satélites (Alami-Durante et al. 2010). Em peixes que atingem um grande tamanho corporal final, como o pacu, as células satélites são aquelas que fornecem os núcleos necessários tanto para o crescimento muscular hiperplásico como para o

crescimento muscular hipertrófico (Koumans e Akster 1995). As células satélites quiescentes apresentam níveis não detectáveis de MRFs (Sabourin e Rudnicki 2000). Uma vez ativadas, essas células são reguladas positivamente por um MRF envolvido na regulação miogênica (MyoD) e, mais tarde, por outro (Miogenina) envolvido na fusão e diferenciação dos mioblastos (Johnston 2006).

Os resultados de expressão gênica indicam que as mudanças no fenótipo do músculo (distribuição das fibras em diâmetros) induzidas pelo uso de dietas de baixa qualidade nutricional (M-OG e M-OP) estão correlacionadas com mudanças significativas nos níveis de expressão dos genes MyoD e Miogenina, que, por sua vez, influenciam o crescimento hiperplásico e hipertrófico do músculo e podem ser usados como indicadores da atividade de células satélites.

Os efeitos significativos da reduzida expressão de MyoD e Miogenina com o uso das dietas microencapsuladas (M-OG e M-OP) e a baixa taxa de crescimento dos peixes desses tratamentos concordam com estudo anterior que mostra que a ativação e a proliferação de células satélites em peixes estão relacionadas aos efeitos da nutrição: períodos de jejum diminuem a proliferação de células satélites em truta arco-íris (Fouconneau e Paboeuf, 2000). Adicionalmente, períodos curtos de privação total do alimento, seguido de realimentação alteram a expressão relativa de MyoD e Miogenina e mudam as características do crescimento muscular de juvenis de tilápia-do-nilo; os níveis de expressão de MyoD e Miogenina diminuem durante jejum de cinco e 10 dias e aumentam após realimentação (Nebo, 2011).

A análise de expressão gênica no final do período experimental mostra ausência de diferença significativa na expressão de MyoD e Miogenina dos juvenis alimentados com alimento vivo (náuplios de artêmia) e com a dieta microencapsulada M-OG, apesar da grande diferença de crescimento e distribuição das fibras musculares em diâmetros entre esses dois tratamentos. O efeito do alimento vivo no baixo nível de expressão de MyoD e Miogenina não pode ser atribuída à inadequada qualidade nutricional do alimento. Os náuplios de artêmia são os alimentos que mais favorecem o crescimento e o desenvolvimento inicial do pacu (Jomori 2005; Menossi et al. 2012) e de outras espécies altriciais de água doce, como cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Flores-Quintana e Portella 2003), piauí *Leporinos macrocephalus* (Cericato 2005) e trairão *Hoplias lacerdae* (Luz 2004).

Além disso, os náuplios de artêmia tem efeito positivo no crescimento hiperplásico do músculo esquelético (Leitão et al. 2011).

Nossos resultados mostram que os baixos níveis de expressão de MyoD e Miogenina em resposta a utilização de náuplios de artêmia podem ser efeito da reduzida taxa de crescimento específico a partir da terceira semana de alimentação neste tratamento. Possivelmente, o fornecimento de alimento vivo (quantidade diária: 2000 náuplios larva⁻¹) sem que houvesse sobras por todo período experimental, limitou o crescimento dos juvenis, como demonstrado anteriormente em larvas de pacu (Jomori et al. 2008).

Sabe-se que larvas de pacu alimentadas com náuplios de artêmia, desde o início da alimentação exógena, são capazes de aproveitar eficientemente dietas formuladas como única fonte de alimento a partir dos 12 dpe, quando estão com cerca de 10 mg de peso úmido (Jomori et al. 2008). Entretanto, esse aproveitamento é influenciado pela qualidade (características nutricionais e físicas) da dieta (Jomori 2005). A dieta comercial garantiu aos peixes crescimento satisfatório, além de desenvolvimento muscular adequado para a espécie, com base nos estudos de Almeida et al. (2010) e Leitão et al. (2011). As altas taxas de crescimento observadas ao longo de todo experimento nesse tratamento podem estar relacionadas aos maiores níveis de expressão de MyoD e Miogenina ($p < 0,05$), assim como aos maiores valores de diâmetro máximo e diâmetro das cinco maiores fibras musculares ($p < 0,05$). Esses resultados indicam maior contribuição da hipertrofia no crescimento muscular com o uso da dieta comercial.

5. Conclusões

Os resultados desse estudo indicam que as diferenças nas taxas de crescimento dos juvenis de pacu provocadas pela alimentação estão relacionadas a mudanças na dinâmica do crescimento muscular. As modificações na celularidade muscular estão correlacionadas com alterações nos níveis de expressão dos marcadores de células satélites MyoD e Miogenina. Isso é relevante, pois as células satélites são as células que fornecem os núcleos necessários para os mecanismos hiperplásicos e hipertróficos de crescimento do músculo.

Referências

- Alami-Durante, H., Bergot, P., Rouel, M., Goldspink, G., 2000. Effects of environmental temperature on the development of the myotomal white muscle in larval carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. of Exp. Biol.* 203, 3675–3688.
- Alami-Durante, H., Medale, F., Cluzeaud, M., Kaushik, S.J., 2010. Skeletal muscle growth dynamics and expression of related genes in white and red muscles of rainbow trout fed diets with graded levels of a mixture of plant protein sources as substitutes for fishmeal. *Aquaculture* 303, 50–58.
- Almeida, F.L., Carvalho, R.F., Pinhal, D., Padovani, C.R., Martins, C., Dal Pai-Silva, M., 2008. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. *Micron.* 39, 1306–1311.
- Almeida, F.L.A., Pessotti, N.S., Pinhal, D., Padovani, C.R., Leitão, N.J., Carvalho, R.F., Martins, C., Portella, M.C., Dal Pai-Silva, M., 2010. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. *Micron* 41, 997–1004.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 2006. 18th ed. Gaithersburg, Maryland.
- Assis, J.M.F., Carvalho, R.F., Barbosa, L., Agostinho, C.A., Dal Pai-Silva, M., 2004. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Aquaculture* 237, 251–267.
- Baskerville-Bridges, B., Kling, L.J., 2000. Development and evaluation of microparticulate diets for early weaning of Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. *Aquacult. Nutr.* 6, 171–182.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Butler, D.G., 1968. Hormonal control of gluconeogenesis in the North American eel (*Anguilla rostrata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 10, 85–91.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J.L., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161–180.

- Campos, C., Valente, L.M.P., Borges, P., Bizuayehu, T., Fernandes, J.M.O., 2010. Dietary lipid levels have a remarkable impact on the expression of growth-related genes in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *J. Exp. Biol.* 213, 200–209.
- Cericato, L., 2005. Substituição do alimento vivo pelo artificial e morfologia do sistema digestório de larvas de piau, *Leporinus macrocephalus*. Tese, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 72 pp.
- Conceição, L., Aragão, C., Rønnestad, I., 2011. Proteins. In: Holt, J.G. (Ed.), *Larval Fish Nutrition*. Willey-Blackwell, West Sussex, pp. 83-116.
- Dubowitz, V., 1985. Normal muscle. *Muscle biopsy: A practical approach*, 2 ed. Bailliere Tindal, London. pp. 41–81.
- Fauconneau, B., Paboeuf, G., 2001. Muscle satellite cells in fish. In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle development and growth*, Fish physiology series, vol. 18. Academic Press, San Diego, pp. 73–101.
- Flores-Quintana, C.I., Portella, M.C., 2003. Histological analysis of juvenile *Pseudoplatystoma fasciatum* digestive system. In: *World Aquaculture*, 2003, 19-23 Maio., Salvador, Bahia, 2003. Book of abstract... Salvador, World Aquaculture Society. p. 591.
- Galloway T.F., Kjørsvik, E., Kryvi, H., 1999. Muscle growth and development in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.) related to different somatic growth rates. *J. Exp. Biol.* 202, 2111–2120.
- Hall, T.E., Johnston, I.A., 2003. Temperature and developmental plasticity during embryogenesis in the Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Mar. Biol.* 142, 833–840.
- Johnston, I.A., 2006. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *J. Exp. Biol.* 209, 2249–2264.
- Johnston, I.A., Lee, H., Macqueen, D.J., Paranthaman, K., Kawashima, C., Anwar, A., Kinghorn, J.R., Dalmay, T., 2009. Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes. *J. Exp. Biol.* 212, 1781–1793.
- Johnston, I.A., Bower, N.I., Macqueen, D.J., 2010. Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *J. Exp. Biol.* 214, 1617–1628.

- Jomori R.K., 2005. Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* e o uso dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) como indicadores naturais da incorporação do alimento vivo no tecido larval. Tese, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 122 pp.
- Jomori, R.K., Ducatti, C., Carneiro, D.J., Portella., M.C., 2008. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. *Aquac. Res.* 39, 370–381.
- Kjørsvik, E., Galloway, T., Estevez, A., Sæle, Ø., Moren, M., 2011. Effects of larval nutrition on development. In: Holt, J.G. (Ed.), *Larval Fish Nutrition*. Wiley-Blackwell, West Sussex, pp. 219-248.
- Koumans, J.T.M, Akster, H.A., 1995. Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 110A, 3–20.
- Langdon, C., 2003. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. *Aquaculture* 227, 259–275.
- Leitão, N.J., Pai-Silva, M., Almeida, F.L.A., Portella, M.C., 2011. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. *Aquaculture* 315, 78–85.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Luz, R.K., 2004. Aspectos da larvicultura do trairão *Hoplias lacerdae*: manejo alimentar, densidade de estocagem e teste de exposição ao ar. Tese, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 120 pp.
- Macqueen, D.J., Robb, D.H.F., Olsen, T., Melstveit, L., Paxton, C.G.M., Johnston, I.A., 2008. Temperature until the 'eyed stage' of embryogenesis programmes the growth trajectory and muscle phenotype of adult Atlantic salmon. *Biol. Lett.* 4, 294–298.
- Menossi, O.C.C., Takata, R., Sanches-Amaya, M.I., Freitas, T.M., Yúfera, M., Portella, M.C., 2012. Alimentação inicial de pacu com dieta microencapsulada

- produzida experimentalmente e sua relação com o crescimento e estruturas do sistema digestório. *Rev. Bras. Zootec.* 41, 1–10.
- Nebo, C., 2011. Expressão de genes relacionados ao crescimento muscular durante a restrição alimentar e realimentação em juvenis de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*, linhagem chitralada. Tese, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil, 93 pp.
- Papadakis, I.E., Zaiss, M.M., Kyriakou, Y., Georgiou, G., Divanach, P., Mylonas, C.C., 2009. Histological evaluation of the elimination of *Artemia* nauplii from larval rearing protocols on the digestive system ontogeny of shi drum (*Umbrina cirrosa* L.). *Aquaculture* 286, 45–52.
- Portella, M.C., Dabrowski, K., 2008. Diets, physiology, biochemistry and digestive tract development of freshwater fish larvae. In: Cyrino, J.E.P., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Eds.), *Feeding and digestive functions in fishes*, Science Publisher, New Hampshire, pp. 227–279.
- Robin, J.H., Vincent, B., 2003. Microparticulate diets as first food for gilthead sea bream larva (*Sparus aurata*): study of fatty acid incorporation. *Aquaculture* 225, 463–474.
- Rodrigues, J.B., 2012. Desenvolvimento de micropartículas contendo *Lactobacillus acidophilus* para alimentação de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Tese, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, 112 pp.
- Rowlerson, A., Veggetti, A., 2001. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle development and growth. Fish physiology series*, vol. 18., Academic Press, San Diego, pp. 103–140.
- Sabourin, L.A., Rudnicki, M.A., 2000. The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet.* 57, 16–25.
- Sänger, A.M., Stoiber, W., 2001. Muscle fiber diversity and plasticity. In: Johnston, I.A. (Ed.), *Muscle development and growth. Fish physiology series*, vol. 18., Academic Press, San Diego, pp. 187–250.
- Seiliez, I., Gabillard, J., Skiba-Cassy, S., Garcia-Serrana, D., Gutiérrez, J., Kaushik, S., Panserat, S., Tesseraud, S., 2008. An in vivo and in vitro assessment of TOR

signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R329 –R335.

Takata, R., 2007. Produção de juvenis de *Artemia franciscana* e análise da utilização de dietas vivas e inertes na larvicultura intensiva do pintado *Pseudoplatystoma coruscans*. Tese, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 116 pp.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de microencapsulação usado no presente estudo (gelificação iônica seguida de coacervação complexa) foi eficiente em produzir uma partícula estável e com tamanho e teores de umidade e proteína semelhantes aos alimentos vivos usados na larvicultura de peixes. Além disso, essas partículas foram bem aceitas pelas larvas de pacu, as quais se apresentavam maduras para aproveitar com eficiência dietas formuladas. Porém, as dietas microencapsuladas não foram capazes de proporcionar crescimento adequado às larvas, assim como desenvolvimento normal do trato digestório e da musculatura esquelética, comprometendo o crescimento em fases posteriores.

Apesar dos macronutrientes, quantitativamente, estarem ajustados, o perfil nutricional das dietas ficou aquém das exigências das larvas. Por isso, esforços no sentido de utilizar fontes de nutrientes mais adequadas e que atendam as exigências das larvas de peixes devem focar estudos futuros.