



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**EXTRATO DE LEVEDURAS NO CRESCIMENTO,
UTILIZAÇÃO DOS NUTRIENTES E RESPOSTAS HEMATO-
IMUNOLÓGICAS EM TILÁPIA-DO-NILO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura.

Orientadora: Débora Machado Fracalossi

Ricardo da Silva Berto

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Berto, Ricardo da Silva

EXTRATO DE LEVEDURAS NO CRESCIMENTO, UTILIZAÇÃO DOS
NUTRIENTES E RESPOSTAS HEMATO-IMUNOLÓGICAS EM TILÁPIA-DO-
NILO / Ricardo da Silva Berto ; orientadora, Débora
Machado Fracalossi - Florianópolis, SC, 2013.

59 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Nucleotídeos. 3. Alimento funcional.
4. *Saccharomyces cerevisiae*. 5. *Aeromonas hydrophila*. I.
Fracalossi, Débora Machado. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.
III. Título.

Extrato de leveduras no crescimento, utilização dos nutrientes e respostas hemato-imunológicas da tilápia do Nilo

Por

RICARDO DA SILVA BERTO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Débora Machado Fracalossi – *Orientadora*

Dr. José Luiz Pedreira Mouriño

Dra. Margarida Maria Barros

Dr. Maurício Laterça Martins

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Quirino e Edna e meu irmão Marcos pelo apoio em todos os momentos;

À professora Débora Machado Fracalossi pela orientação e preciosos ensinamentos;

Aos amigos do Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI), que foram fundamentais nesses anos de estudos;

Aos colegas e colaboradores e colegas do Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD);

À Gabriella do Vale Pereira e ao José Luiz Pedreira Mouriño pela ajuda fundamental na realização do experimento de desafio;

Ao professor Maurício Laterça Martins pelo espaço cedido para realização do experimento de desafio e pelo auxílio para realização do mesmo;

Ao Carlito Klunk pela atenção e disposição;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

À Alltech pelo financiamento do projeto que deu origem a esta dissertação.

RESUMO

No presente estudo avaliou-se a suplementação de seis níveis (0, 10, 20, 40, 60, 80 g kg⁻¹) de uma fonte de nucleotídeos (NuPro[®]) no crescimento, utilização de nutrientes, resistência à infecção por patógeno e respostas hemato-imunológicas da tilápia-do-Nilo. No ensaio alimentar, com duração de 75 dias, os peixes (2,63 ± 0,63 g) foram alimentados até a saciedade aparente, três vezes ao dia. Houve aumento linear no consumo, com reflexo no ganho em peso, com o aumento da inclusão de NuPro[®] nas dietas (P<0,05), sem efeito na sobrevivência, conversão alimentar ou retenção proteica. Após o ensaio de crescimento, os peixes foram desafiados com *Aeromonas hydrophila*, por injeção intraperitoneal. A sobrevivência e as respostas imunes inatas avaliadas (fagocitose e concentração de lisozimas) não foram significativamente afetadas pelas doses do suplemento. Entretanto, dentre as variáveis hematológicas analisadas, a contagem de trombócitos, leucócitos e monócitos aumentaram linearmente (P<0,05). A medida indireta da digestibilidade em juvenis (122,32 ± 11 g), com coleta de fezes por sedimentação, indicou diminuição linear da digestibilidade proteica, energética e matéria seca com a inclusão das doses do suplemento (P<0,05) na ordem de 1,41%, 5,72% e 4,10%, respectivamente. NuPro[®] se mostrou um aditivo benéfico para suplementação em dietas para juvenis de tilápia-do-Nilo, proporcionando aumentos significativos no ganho em peso e nas contagens de trombócitos, leucócitos e monócitos no sangue, indicando possível reação de defesa mais eficiente nas maiores doses testadas.

Palavras-chave: nutrição, nucleotídeos, alimento funcional, *Oreochromis niloticus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aeromonas hydrophila*.

ABSTRACT

In the present study was evaluated supplementation of six levels (0, 10, 20, 40, 60, 80 g kg⁻¹) of a source of nucleotides (NuPro[®]) on growth, nutrient utilization, resistance to infection by pathogen and hemato-immunological responses from the Nile tilapia. In the feeding trial, lasting 75 days, the fish (2.63 ± 0.63 g) were fed to satiation, thrice times a day. There was a linear increase in consumption as reflected in the weight gain, with increasing addition of NuPro[®] diets ($P < 0.05$), with no effect on survival, feed conversion or protein retention. After the growth trial, fish were challenged with *Aeromonas hydrophila* by intraperitoneal injection. The survival and the innate immune responses evaluated (phagocytosis and lysozyme concentration) were not significantly affected by doses of the supplement. However, among the haematological variables analyzed, the count of thrombocytes, leukocytes and monocytes increased linearly ($P < 0.05$). The indirect measure of digestibility in juvenile (122.32 ± 11 g), with fecal collection by sedimentation, indicated a linear decrease protein digestibility, dry matter and energy with the inclusion of doses of supplementation ($P < 0.05$) in order of 1.41%, 5.72% and 4.10%, respectively. NuPro[®] showed an additive benefit to supplementation in diets for juvenile Nile tilapia, providing significant increases in weight gain and in counts of thrombocytes, leukocytes and monocytes in the blood, indicating a possible defense reaction more efficient in highest doses tested.

Keywords: nutrition, nucleotides, functional food, *Oreochromis niloticus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aeromonas hydrophila*.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Estrutura geral de um nucleotídeo 18

EXTRATO DE LEVEDURAS NO CRESCIMENTO, UTILIZAÇÃO DOS NUTRIENTES E RESPOSTAS HEMATO- IMUNOLÓGICAS EM TILÁPIA-DO-NILO

Figura 1 - Ganho em peso médio diário por peixe, taxa de crescimento específico e consumo de ração de juvenis de tilápia-do-Nilo, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de NuPro[®] (média \pm erro padrão)..... 37

ANEXO

Figura 1 - Ensaio de digestibilidade:(A) Tanques. (B) Tubo coletor de fezes. (C) Caixa de gelo durante coleta de fezes 58

Figura 2- Ensaio de crescimento. (A) Tanques. (B) Biometria. 58

Figura 3 – Desafio com *Aeromonas hydrophila*. (A) Tanques. (B) Coleta de sangue 58

Figura 4 -Sinais clínicos em tilápia-do-Nilo, após 96 h do desafio com *Aeromonas hydrophila*: (a) ulcerações, (b) erosão nas nadadeiras e hemorragia..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulação e composição proximal das dietas experimentais do ensaio de dose resposta, contendo níveis crescentes de NuPro [®] . Valores expressos em g kg ⁻¹ e na matéria seca.....	30
Tabela 2 - Formulação e composição proximal das dietas experimentais do ensaio de digestibilidade, contendo níveis crescentes de NuPro [®] . Valores expressos em g kg ⁻¹ e na matéria seca	34
Tabela 3 - Conversão alimentar, sobrevivência, retenção proteica e composição corporal de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de NuPro [®]	38
Tabela 4 - Variáveis hematológicas e imunológicas em juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de NuPro [®] , antes e após desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i>	39
Tabela 5 - Coeficientes de digestibilidade aparente (CDAs) da proteína, energia e matéria seca de dietas, para tilápia-do-Nilo, suplementadas com níveis crescentes de NuPro [®]	40

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
Nucleotídeos	17
Fontes de nucleotídeos para alimentação animal	19
Suplementação dietética com nucleotídeos	20
<i>Nucleotídeos como estimulante alimentar</i>	20
<i>Nucleotídeos no sistema imune</i>	21
NuPro®	22
Tilápia-do-Nilo	22
JUSTIFICATIVA	23
OBJETIVO GERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
EXTRATO DE LEVEDURAS NO CRESCIMENTO, UTILIZAÇÃO DOS NUTRIENTES E RESPOSTAS HEMATO-IMUNOLÓGICAS EM TILÁPIA-DO-NILO	25
Introdução	27
Materiais e métodos	29
<i>Ensaio de dose-resposta</i>	29
<i>Desafio e avaliação de respostas hemato-imunológicas</i>	31
<i>Ensaio de digestibilidade</i>	33
<i>Análises de composição proximal</i>	35
<i>Análises estatísticas</i>	35
Resultados	36
<i>Ensaio de dose-resposta</i>	36
<i>Desafio e avaliação de respostas hemato-imunológicas</i>	36
<i>Ensaio de digestibilidade</i>	38
Discussão	41
Agradecimentos	44
Referências	45
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
ANEXO	58

INTRODUÇÃO

A melhora do desempenho e resistência em espécies sujeitas à criação intensiva estão entre os maiores desafios da piscicultura (ABDEL-TAWWAB et al., 2008), sendo que o sucesso da criação depende de dietas de alta qualidade, que contenham, além do adequado teor de nutrientes essenciais, aditivos que auxiliem na manutenção da saúde e favoreçam o crescimento (LARA-FLORES et al., 2003). A demanda global por ingredientes para fabricação destas dietas, em especial a farinha de peixe, limitam sua oferta e tornam seus preços elevados. Adicionalmente, aditivos como os quimioterápicos e antibióticos são utilizados como promotores de crescimento e na prevenção e tratamento de infecções bacterianas na criação animal, inclusive peixes. Entretanto, o uso dessas substâncias sofre pressão negativa em diversos países, principalmente na comunidade européia, já que seu uso indiscriminado pode provocar o desenvolvimento de patógenos resistentes, além de danos ao ambiente (VÁSQUEZ et al., 2005). Desta forma, é importante o estudo de aditivos que possam promover o crescimento animal sem causar perda de produtividade e saúde, além de manter as ações benéficas dos antibióticos e eliminar as indesejáveis, como a ação bacteriana (ROSSI et al., 2007). Várias alternativas ao uso de antibióticos e quimioterápicos são preconizadas, destacando-se a adição de enzimas, probióticos, prebióticos, extratos vegetais, ácidos orgânicos e, mais recentemente, os nucleotídeos (STEIN; KILL, 2006). A levedura de cerveja, *Saccharomyces cerevisiae*, composto rico em nucleotídeos, cuja adição em dietas para peixes melhora o crescimento e aumenta a resistência a patógenos (ABDEL-TAWWAB et al., 2008), é um exemplo de fonte de nucleotídeos.

Nucleotídeos

Os nucleotídeos desempenham diversas funções importantes nas células e sua utilização como suplemento em dietas para alimentação animal vem sendo discutida há muito tempo, pois sabe-se que desempenham funções fisiológicas e bioquímicas, que incluem codificação da informação gênica, modulação do metabolismo energético, ação como componentes de coenzimas, entre outros (CARVER; WALKER, 1995; LI; GATLIN III, 2006). Portanto, os nucleotídeos se apresentam como potenciais suplementos para alimentação animal, incluindo os peixes.

Nucleotídeos são formados por uma base nitrogenada, uma pentose e um fosfato (Figura 1). Quando a molécula não possui o grupo fosfato é chamada de nucleosídeo. As bases nitrogenadas são derivadas da purina e pirimidina (LEHNINGER, 2002). Como subunidades dos ácidos nucleicos, os nucleotídeos são fundamentais para o transporte da informação gênica. São também transportadores primários da energia química das células, componentes estruturais de muitos co-fatores enzimáticos e mensageiros celulares secundários (LEHNINGER, 2002).

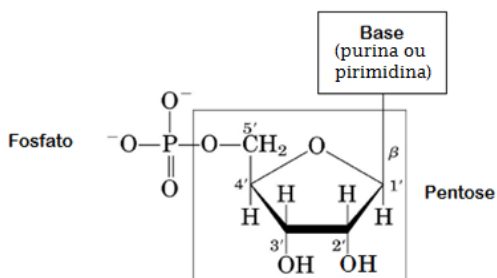


Figura 1: Estrutura geral de um nucleotídeo (Adaptado de Lehninger, 2002)

Apesar de já serem utilizados na alimentação animal, seu modo de ação ainda não é totalmente compreendido, sendo necessários estudos para isto e também para fornecer, com eficácia e segurança, informações sobre seu uso na fabricação de rações para animais (BRUGALLI, 2003).

Os nucleotídeos tradicionalmente não são considerados como nutrientes essenciais para os animais, já que são por estes sintetizados. Também não são observados defeitos bioquímicos ou sinais clínicos clássicos em modelos humanos ou animais quando estão ausentes da dieta. Entretanto, diversos estudos demonstram que a deficiência de nucleotídeos na dieta pode prejudicar o funcionamento do fígado, coração, intestino, além de afetar as funções imunes (GRIMBLE; WESTWOOD, 2000; LI; GATLIN III, 2006).

A síntese de nucleotídeos ocorre nos organismos por meio da via *de novo*, onde estes são sintetizados, principalmente, a partir de aminoácidos. Entretanto, podem ser também sintetizados pela via de salvamento ou recuperação, a partir da reciclagem de bases livres e nucleosídeos liberados na hidrólise dos próprios nucleotídeos e ácidos

nucleícos (LENHNINGER, 2002). A via de salvação apresenta menor gasto energético e é preferencialmente utilizada quando há fonte dietética de nucleotídeos (UAUY, 1994).

LENER e SHAMIR (2000) afirmaram que os nucleotídeos podem ser considerados semi ou até mesmo essenciais no caso de rápido crescimento, estado de doença, consumo limitado de nutrientes ou distúrbio endógeno, quando o organismo necessita de quantidade maior do que a sintetizada ou obtida pela via de salvamento. Neste caso, os nucleotídeos provenientes da dieta são particularmente importantes para complementar a síntese endógena.

Fontes de nucleotídeos para alimentação animal

Os nucleotídeos estão naturalmente presentes em todos os alimentos de origem animal e vegetal na forma de nucleotídeos livres e ácidos nucleicos. Sua concentração depende principalmente da densidade celular dos alimentos, por isso órgãos como fígado e coração são fontes ricas deste componente (GIL, 2002; CONNELL, 2009).

Leveduras também são fontes ricas em nucleotídeos, principalmente seu conteúdo nuclear (FERREIRA et al., 2010). A levedura de cerveja *Saccharomyces cerevisiae* é proveniente da indústria cervejeira e é utilizada como fonte de proteínas de alto valor nutricional, de enzimas, entre outros. Também possui aplicações na indústria de alimentos como agente aromatizante, ingrediente de rações e aditivos para dietas (BEKATOROU, 2006). A maioria dos estudos com animais utiliza produtos de nucleotídeos comerciais derivados de levedura íntegra, que contêm outros componentes, tais como os oligoelementos e polissacarídeos, que podem também influenciar a imunidade e outras funções fisiológicas (WELKER et al. 2011). A parede celular das leveduras representa de 20 a 25% do seu peso seco total, sendo formada principalmente por uma mistura de mananoligossacarídeos, β -glucanos e pequenas quantidades de quitina (NGUYEN et al., 1998). A partir da remoção da parede celular, por digestão enzimática, é produzido o extrato de levedura, composto com alto teor proteico, rico em peptídeos, aminoácidos, vitaminas e nucleotídeos (BEKATOROU, 2006). O extrato de leveduras pode ser utilizado na indústria de alimentos como intensificador e/ou potenciador de sabor, principalmente por conter altas concentrações de ácido glutâmico e nucleotídeos, tais como o 5'-guanossina-monofosfato e 5'-guanina-monofosfato, reconhecidos por suas propriedades como estimulantes alimentares (FERREIRA et al., 2010).

Suplementação dietética com nucleotídeos

A utilização de levedura íntegra, assim como derivados do seu processamento, tais como levedura autolisada, polissacarídeos da parede celular e nucleotídeos são recomendados como aditivos em rações para organismos aquáticos (HISANO et al., 2007). A suplementação de nucleotídeos na dieta melhora a imunidade celular e humoral, sendo particularmente importante para indivíduos expostos a risco de infecções (CARVER; WALKER, 1995). Adicionalmente, é importante no desenvolvimento de tecidos com rápido *turnover* celular, quando a capacidade de síntese endógena não é suficiente para responder a demanda, como em períodos de rápido crescimento e após agressões ao organismo tais como doenças ou traumas (BUENO et al. 1994). Assim, quando suplementados na dieta, os nucleotídeos podem proporcionar efeitos benéficos sobre o sistema imune, crescimento e regeneração celular, além de promover redução de gasto energético para produção dos nucleotídeos pelo próprio organismo (ORTEGA et al.1995). Burrells et al. (2001) corrobora essa informação e indica ainda o uso de dietas suplementadas com nucleotídeos antes da realização de algum manejo na aquicultura, já que em momentos de estresse os animais tendem a maior dependência de fornecimento exógeno desses nutrientes.

A utilização de nucleotídeos como suplemento pode ser interessante; porém, dependendo da dose e forma como é fornecido, pode ocasionar resultados indesejados. Tacon e Cooke (1980) observaram que os ácidos nucléicos, se utilizados em altas concentrações em dietas para peixes, podem causar efeitos negativos como diminuição do crescimento, da ingestão de alimento e da eficiência alimentar, além de acúmulo de uréia e ácido úrico no sangue.

Nucleotídeos como estimulante alimentar: Segundo Li e Gatlin III (2006), os nucleotídeos atuam como potenciadores de sabor dos alimentos para mamíferos e diversos estudos tem demonstrado que o mesmo é verdade para animais aquáticos. Mackie (1973), analisando nucleotídeos e nucleosídeos da composição corporal de lulas, sugeriu essas substâncias como quimio-atrativos para animais aquáticos como a lagosta. Mackie e Adron (1978) testaram 47 nucleosídeos e nucleotídeos e identificaram a inosina e a inosina monofosfato como os mais potentes estimulantes de alimentação gustativa para o *turbot*, *Scophthalmus maximus*, com base no comportamento alimentar dos peixes. Em ensaio alimentar com a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, Rumsey et al.

(1992) observaram aumento da ingestão de alimentos quando suplementados com extrato de RNA de leveduras, guanina e xantina.

Nucleotídeos no sistema imune: Nucleotídeos e oligossacarídeos atuam como moduladores do sistema imunológico, estimulando o funcionamento tanto de células B como de células T, aumentando a resistência dos organismos às infecções por bactérias e vírus (VILELA et al., 2000). Gil (2002) também relata o efeito modulatório dos nucleotídeos da dieta no sistema imune de humanos e animais, atuando na maturação, ativação e proliferação dos linfócitos, nas respostas imunes da imunoglobulina, assim como na expressão genética de determinadas citocinas.

Os nucleotídeos da dieta são capazes de prevenir efeitos negativos na estrutura do intestino dos animais em geral e melhorar a resposta imune, aumentando a resistência contra instalação de patógenos (CARVER; WALKER, 1995) e, conseqüentemente, prevenindo quedas de desempenho. Li e Gatlin III (2006) sugerem que uma das possíveis formas pelos quais os nucleotídeos da dieta influenciam o sistema imunológico é compensando, parcialmente, os efeitos inibitórios da liberação de cortisol, a qual está associada ao estresse. Leonardi et al. (2003), em ensaio com a truta arco-íris, observaram redução dos níveis de cortisol sérico e aumento da resistência ao vírus da necrose pancreática infecciosa, que ataca principalmente a fase de larva de diferentes espécies de salmonídeos. Gunther et al. (2007), em ensaio com o salmão do Atlântico, *Salmo salar* na fase de *smolt*, observaram melhora significativa na resposta imune dos animais alimentados com dietas suplementadas com nucleotídeos, quando desafiados com o patógeno *Piscirickettsia salmonis*, além de maior sobrevivência se comparado ao grupo alimentado com a dieta controle, sem a suplementação.

Nucleotídeos de RNA de levedura de cerveja foram capazes de reforçar as atividades fagocitárias e oxidativas de células fagocíticas do rim e elevar os níveis de lisozima sérica em carpa comum, *Cyprinus carpio*, bem como melhorar a resistência desta espécie à *Aeromonas hydrophila* (Sakai et al., 2001). Burrells et al. (2001), desafiando algumas espécies de salmonídeos com diferentes patógenos, observaram que dietas comerciais suplementadas com nucleotídeos podem exercer influência positiva na resistência do salmão do Atlântico, salmão do pacífico, *Oncorhynchus kisutch*, e truta arco-íris à bactérias, vírus, riquetsias e infecções de ectoparasitas. Os mesmos autores afirmam que a suplementação de nucleotídeos na dieta reforça o potencial do sistema

imunológico para montar uma mais rápida e mais eficiente resposta específica, quando necessário.

NuPro[®]

NuPro[®] é um extrato de levedura, obtido a partir da remoção da parede celular de uma linhagem específica de *S. cerevisiae*, rico em nucleotídeos (cerca de 5% do peso seco), principalmente na forma de ácidos nucleicos, que pode ser usado como ingrediente proteico ou como aditivo alimentar funcional para peixes e outros monogástricos (Fegan, 2006). Este produto já foi testado com sucesso substituindo a farinha de peixe em dietas para a tilápia-do-Nilo (Mclean; Craig, 2004), o bijupirá, *Rachycentron canadum* (Lunger et al., 2006, 2007) e o robalo, *Dicentrarchus labrax* (Panagioutidou et al., 2009), assim como imunostimulante para camarão-tigre, *Penaeus monodon* (Sritunyalucksana et. al., 2005). Apesar de já ter sido testado como ingrediente proteico, não é conhecido o efeito da suplementação de NuPro[®] em pequenas doses, como aditivo na dieta, no sistema imunológico, resistência a doenças, crescimento e utilização de nutrientes pela tilápia-do-Nilo.

Tilápia-do-Nilo

A tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, é uma espécie de peixe criada no mundo todo e particularmente importante na economia de muitos países em desenvolvimento. Sua rusticidade, alta fecundidade e boa aceitação de mercado são responsáveis pelo amplo sucesso na sua criação intensiva (Zimmermann; Fitzsimmons, 2004; Fitzsimmons et al., 2011). Apesar de sua alta rusticidade, sob condições de estresse como baixa qualidade da água, alta densidade de estocagem, manejo excessivo e deficiência nutricional, a tilápia é suscetível a infecções por bactérias oportunistas, como *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flexibacter*, *Edwardsiella* e *Aeromonas* (Plumb, 1999), as quais podem resultar em perdas econômicas consideráveis. Desta forma, é provável que a tilápia, principalmente quando criada em sistema intensivo, se beneficie com a suplementação dietética de alimentos funcionais, tais como nucleotídeos.

JUSTIFICATIVA

Na aquicultura, só recentemente os nucleotídeos tem sido usados como alimento funcional ou como fonte alternativa de nitrogênio. Desta forma, pesquisas devem elucidar os efeitos da suplementação de nucleotídeos na nutrição de peixes. Estudos focando a determinação da dosagem e procedimentos de administração são necessários para garantir a eficácia do produto, sob diferentes condições fisiológicas e ambientais.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de NuPro[®], fonte comercial de nucleotídeos, na digestibilidade de nutrientes, crescimento, sobrevivência e respostas hemato-imunológicas de juvenis de tilápia-do-Nilo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de oito concentrações de NuPro[®] no crescimento de alevinos de tilápia-do-Nilo;
- Determinar se a suplementação de NuPro[®] afeta o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína, gordura e matéria seca para alevinos de tilápia-do-Nilo;
- Avaliar se a suplementação de NuPro[®] na dieta afeta as taxas de sobrevivência, hematócrito, contagem total de eritrócitos, leucócitos e trombócitos, contagem diferencial de leucócitos; atividade fagocitária e de lisozima de alevinos de tilápia-do-Nilo, após o desafio com o patógeno *Aeromonas hydrophila*.

O artigo científico que segue foi redigido conforme as normas para submissão ao periódico *Aquaculture Nutrition*.

**EXTRATO DE LEVEDURAS NO CRESCIMENTO,
UTILIZAÇÃO DOS NUTRIENTES E RESPOSTAS HEMATO-
IMUNOLÓGICAS EM TILÁPIA-DO-NILO**

Berto, Ricardo da Silva¹; Pereira, Gabriella do Vale¹; Mouriño, José
Luiz Pedreira¹; Martins, Maurício Laterça¹; Fracalossi, Débora
Machado^{1*}

¹Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias,
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina,
Brasil.

*Autor correspondente: Departamento de Aquicultura, Centro de
Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Rodovia
Admar Gonzaga, 1346, Florianópolis, SC 88034-001, Brasil; Telefone:
+55-48-3389-5216; Endereço eletrônico: deboraf@cca.ufsc.br.

Palavras-chave: nutrição, nucleotídeos, alimento funcional,
Oreochromis niloticus, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aeromonas*
hydrophila.

Resumo

No presente estudo avaliou-se a suplementação de seis níveis (0, 10, 20, 40, 60, 80 g kg⁻¹) de uma fonte de nucleotídeos (NuPro[®]) no crescimento, utilização de nutrientes, resistência à infecção por patógeno e respostas hemato-imunológicas da tilápia-do-Nilo. No ensaio alimentar, com duração de 75 dias, os peixes (2,63 ± 0,63 g) foram alimentados até a saciedade aparente, três vezes ao dia. Houve aumento linear no consumo, com reflexo no ganho em peso, com o aumento da inclusão de NuPro[®] nas dietas (P<0,05), sem efeito na sobrevivência, conversão alimentar ou retenção proteica. Após o ensaio de crescimento, os peixes foram desafiados com *Aeromonas hydrophila*, por injeção intraperitoneal. A sobrevivência e as respostas imunes inatas avaliadas (fagocitose e concentração de lisozimas) não foram significativamente afetadas pelas doses do suplemento. Entretanto, dentre as variáveis hematológicas analisadas, a contagem de trombócitos, leucócitos e monócitos aumentaram linearmente (P<0,05). A medida indireta da digestibilidade em juvenis (122,32 ± 11 g), com coleta de fezes por sedimentação, indicou diminuição linear da digestibilidade proteica, energética e matéria seca com a inclusão das doses do suplemento (P<0,05) na ordem de 1,41%, 5,72% e 4,10%, respectivamente. NuPro[®] se mostrou um aditivo benéfico para suplementação em dietas para juvenis de tilápia-do-Nilo, proporcionando aumentos significativos no ganho em peso e nas contagens de trombócitos, leucócitos e monócitos no sangue, indicando possível reação de defesa mais eficiente nas maiores doses testadas.

Introdução

A demanda global crescente por ingredientes de qualidade, em especial a farinha de peixe, para a fabricação de rações para espécies aquícolas aumenta os custos de produção, sendo fundamental a busca por dietas mais eficientes. Adicionalmente, o uso continuado de quimioterápicos e antibióticos pode gerar impactos indesejáveis ao meio ambiente, bem como promover o desenvolvimento de cepas resistentes de patógenos. Como forma de contornar esta problemática, a busca por práticas preventivas, como a inclusão de alimentos funcionais em dietas para aquicultura, pode aumentar o crescimento e resistência ao estresse de várias espécies de peixes (Lara-Flores *et al.*, 2003).

A tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, é uma espécie de peixe criada no mundo todo e particularmente importante na economia de muitos países em desenvolvimento. Sua rusticidade, alta fecundidade e boa aceitação de mercado são responsáveis pelo amplo sucesso na sua criação intensiva (Zimmermann & Fitzsimmons, 2004, Fitzsimmons *et al.*, 2011). Apesar de sua alta rusticidade, sob condições de estresse como baixa qualidade da água, alta densidade de estocagem, manejo excessivo e deficiência nutricional, a tilápia é suscetível a infecções por bactérias oportunistas, como *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flexibacter*, *Edwardsiella* e *Aeromonas* (Plumb, 1999), as quais podem resultar em perdas econômicas consideráveis. Desta forma, é provável que a tilápia, principalmente quando criada em sistema intensivo, se beneficie com a suplementação dietética de alimentos funcionais, tais como nucleotídeos.

Nucleotídeos estão presentes nos ingredientes de origem vegetal e animal como nucleotídeos livres e ácidos nucleicos (Fegan, 2006). Dietas suplementadas com nucleotídeos têm múltiplos efeitos no intestino animal, incluindo mudanças fisiológicas, morfológicas e microbiológicas. Entre esses efeitos estão o aumento e diferenciação do epitélio intestinal, resultando em melhor absorção dos nutrientes, bem como a regulação da microbiota intestinal, promovendo a predominância de bactérias benéficas ao organismo (Uauy *et al.*, 1990, Carver & Walker, 1995). Em peixes, a suplementação da dieta com nucleotídeos aumenta a resistência de salmonídeos a infecções causadas por bactérias ou vírus, bem com a eficácia de vacinas e a capacidade osmorregulatória (Burrells *et al.* 2001a). Isto ocorre pelo efeito modulatório dos nucleotídeos nas células do sistema imune, como na maturação dos linfócitos, além da proliferação e aumento da atividade

dos macrófagos durante a fagocitose (Gil, 2002). Estudos recentes confirmam que nucleotídeos exógenos também podem influenciar a resposta imune humoral e celular em peixes. Sakai *et al.* (2001) demonstraram que dietas suplementadas com nucleotídeos estimulam a atividade de lisozima, assim como a fagocitose em carpa comum, *Cyprinus carpio*, enquanto Leonardi *et al.* (2003) relataram aumento na proliferação de linfócitos em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*.

Na indústria da aquicultura, somente recentemente os nucleotídeos vem sendo usados como fontes alternativas de nitrogênio ou como alimento funcional. Estudos com nucleotídeos como atrativos alimentares já foram realizados com lagostas, *Homarus gammarus* (Mackie, 1973), camarões, *Palaemonetes pugio* (Carr & Thompson, 1983; Carr *et al.*, 1984) e peixes, *Scophthalmus maximus* e *Oncorhynchus mykiss* (Mackie & Adron, 1978; Rumsey *et al.*, 1992). No entanto, somente a partir dos anos 2000 iniciaram estudos objetivando mensurar o efeito dos nucleotídeos dietéticos no desempenho e na saúde de animais aquáticos (Burrells *et al.*, 2001a, 2001b, Li *et al.*, 2007, Lin *et al.*, 2009, Do Huu *et al.*, 2012).

NuPro[®] é um extrato de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) rico em nucleotídeos (cerca de 5% do peso seco), principalmente na forma de ácidos nucleicos, que pode ser usado como ingrediente proteico ou como aditivo alimentar funcional para peixes e outros monogástricos (Fegan, 2006). Este produto já foi testado com sucesso substituindo a farinha de peixe em dietas para a tilápia-do-Nilo (McClean & Craig, 2004), o bijupirá, *Rachycentron canadum* (Lunger *et al.*, 2006, 2007), o robalo, *Dicentrarchus labrax* (Panagioutidou *et al.*, 2009), o bagre do canal, *Ictalurus punctatus* (Peterson *et al.*, 2012), assim como imunestimulante para camarão-tigre, *Penaeus monodon* (Sritunyalucksana *et al.*, 2005). Apesar de já ter sido testado como ingrediente proteico em dietas para tilápia-do-Nilo, não é conhecido o efeito da suplementação de NuPro[®] em pequenas doses, como aditivo, no sistema imunológico, resistência a doenças, crescimento e utilização de nutrientes pela tilápia-do-Nilo.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação de doses crescentes de NuPro[®], fonte de nucleotídeos, no desempenho e digestibilidade de nutrientes, assim como na sobrevivência e respostas hemato-imunológicas de juvenis de tilápia-do-Nilo, após desafio com o patógeno *Aeromonas hydrophila*.

Materiais e Métodos

Ensaio de dose-resposta

Antes do início do ensaio, os peixes foram aclimatados às condições experimentais durante uma semana, sendo alimentados com ração comercial contendo 32 g kg^{-1} de proteína bruta. Foram utilizados juvenis de tilápia-do-Nilo da linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilapia*) (peso médio inicial $2,63 \pm 0,63 \text{ g}$), adquiridos em piscicultura comercial. Foram formuladas seis dietas práticas, isoproteicas (32 g kg^{-1} de proteína bruta), isoenergéticas ($3.200 \text{ kcal kg}^{-1}$ de energia bruta) (NRC, 2011), contendo níveis crescentes de inclusão de NuPro[®] (0, 10, 20, 40, 60, 80 g kg^{-1}), em substituição ao farelo de soja, principal ingrediente proteico utilizado nas formulações (Tabela 1). Os ingredientes secos foram homogeneizados em misturador em “Y”, sendo os óleos e água adicionados subsequentemente. A mistura resultante foi peletizada em matriz de 5 mm e seca em estufa com renovação e recirculação de ar a 55°C . Após a secagem, os filamentos foram quebrados em tamanhos uniformes (1 a 2 mm) e armazenados a -20°C até a alimentação.

Após a aclimação, cada dieta experimental foi ofertada até a saciedade aparente, três vezes ao dia (9:00, 13:00 e 17:00 h) por 75 dias, a quatro grupos de peixes (20 peixes/tanque), estocados em tanques retangulares de 120 L em sistema de recirculação (taxa de renovação $1,5 \text{ L min}^{-1}$), com controle de temperatura ($27,0 \pm 1^{\circ}\text{C}$), sob aeração constante e fotoperíodo de 12 h. Foram mantidas condições ideais de qualidade de água para a espécie segundo Popma & Lovshin (1994).

O ganho em peso dos peixes de cada unidade experimental foi monitorado por meio de pesagens individuais no início e final do experimento. Já nas pesagens intermediárias, a cada quinze dias, os peixes de cada tanque eram pesados em conjunto. Antes da pesagem, os peixes permaneciam em jejum por 24 h e, durante o procedimento, os peixes eram anestesiados com óleo de cravo (Eugenol[®], Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibitopã, PR, Brasil) diluído em água, na concentração de 75 mg L^{-1} .

Tabela 1. Formulação e composição proximal das dietas experimentais do ensaio de dose resposta, contendo níveis crescentes de NuPro[®]. Valores expressos em g kg⁻¹ e na matéria seca.

Ingredientes	Suplementação com NuPro [®]					
	0	10	20	40	60	80
Farelo soja	409	399	389	369	349	329
Farinha resíduo salmão	38	38	38	38	38	38
Milho	455	455	455	455	455	455
Farinha de sangue ¹	45	45	45	45	45	45
Óleo soja	15	15	15	15	15	15
Óleo peixe	10	10	10	10	10	10
Premix ²	6	6	6	6	6	6
NuPro [®]	0	10	20	40	60	80
<i>Composição proximal</i>						
Proteína bruta	323	323	322	321	321	320
Extrato etéreo	52	52	52	51	51	50
Matéria mineral	62	61	61	61	60	60
Fibra em detergente ácido	32	32	31	31	30	29
Energia bruta, kcal kg ⁻¹	3507	3500	3493	3480	3466	3453

¹*Spray dried.*

²Nutron alimentos (Toledo, PR, Brasil). Composição kg⁻¹ de produto: ácido fólico 250 mg, ácido pantotênico 5.000 mg, biotina 125 mg, colina 75.000 mg, niacina 5.000 mg, vitamina (vit.) A 1.000.000 UI, vit. B₁ 1250 mg, vit. B₁₂ 3.750 mg, vit. B₂ 2.500 mg, vit. B₆ 1.785 mg, vit. C 42.000 mg, vit. D₃ 500.000 UI, vit. E 20.000 UI, vit. K 35.000 mg, cobalto 25 mg, cobre 2.000 mg, ferro 13.820 mg, iodo 100 mg, manganês 3.750 mg, selênio 75 mg, zinco 17.500 mg e antioxidante 0,6 g.

Amostras de 30 peixes do estoque inicial e de três peixes por tanque (nove peixes/tratamento) no final do experimento foram coletadas para determinação da composição corporal (umidade, proteína, lipídios e cinzas, de acordo com AOAC, 1999) do peixe inteiro para o cálculo da retenção proteica. Os peixes foram sacrificados por overdose de anestésico e armazenados (-20°C) até realização das análises. A sobrevivência foi avaliada por observação e registro diário de eventuais mortalidades e contagem do número de peixes em cada biometria.

As variáveis do ensaio dose-resposta foram avaliadas utilizando as seguintes fórmulas:

$$\text{Ganho em peso diário: } GPD \text{ (g)} = (Pf - Pi)/t$$

$$\text{Consumo diário: } CD \text{ (g)} = I/t$$

$$\text{Conversão alimentar: } CA = CD/GPD$$

$$\text{Taxa de crescimento específico: } TCE \text{ (\%)} = [(\ln Pf - \ln Pi)/t] \times 100$$

$$\text{Retenção proteica: } RP \text{ (\%)} = [Pf \times PCf] - [Pi \times PCi] / Ip \times 100$$

Onde: *P*: peso médio final ou inicial/peixe, g

t: período de alimentação, dias

I: ingestão total de alimento, g

Ip: ingestão total de proteína, g kg⁻¹ (peso seco)

PC: proteína corporal final ou inicial, g kg⁻¹ (peso úmido)

Desafio e avaliação das respostas hemato-imunológicas

Ao final do ensaio de dose-resposta, após 24 h de jejum, três peixes de cada tanque (n=12) foram retirados aleatoriamente para coleta de sangue, antes do desafio experimental. Outros dez peixes foram transportados para o laboratório para desafio com o patógeno. A cepa hemolítica de *Aeromonas hydrophila* (CPQBA 228-08 DRM), usada no desafio, foi isolada durante surtos de mortalidade. Essas cepas, caracterizadas como patogênicas para peixes por Silva *et al.* (2012), foram mantidas em placas de TSA (*Trypticase Soy Agar*) a 28°C por 18 h. No desafio, os peixes alimentados com as diferentes doses de NuPro[®] foram injetados intraperitonealmente com *A. hydrophila* (0,01 mL g⁻¹), na concentração de 2x10⁸ UFC (unidades formadoras de colônia) mL⁻¹. A concentração foi definida com base em pré-ensaio de patogenicidade em tilápia-do-Nilo, quando foram testadas três concentrações (2x10⁶, 2x10⁷ e 2x10⁸ UFC mL⁻¹), sendo definida para a infecção a maior dose testada,

por resultar em graves sinais clínicos nos peixes como ulcerações, erosão nas nadadeiras e hemorragia, semelhantes ao observado por Silva *et al.*, 2012. No final do ensaio de patogenicidade, os peixes utilizados foram desinfetados e descartados. Para a infecção, a cepa *A. hydrophila* foi isolada em meio de cultura TSA, incubada a 30°C por 48 h e preparada de acordo com Klesius *et al.* (2000). As colônias foram inoculadas individualmente em meio líquido de cultura BHI e incubadas a 30 °C por 24 h. Após confirmação do crescimento bacteriano, o meio de cultura foi centrifugado a 1800 x g por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o pélete resuspendido em solução salina estéril (0,65% NaCl) para a infecção experimental. Após 96 h da infecção, a sobrevivência foi registrada.

Análise hematológica - Três peixes de cada tanque (n=12) foram aleatoriamente amostrados e anestesiados com Eugenol[®] para coleta de sangue. Amostras de sangue foram puncionadas da veia caudal com duas seringas, uma contendo anticoagulante EDTA a 10% e outra sem anticoagulante (Martins *et al.*, 2008). Uma alíquota de sangue com EDTA foi utilizada para a determinação do hematócrito e confecção de extensões sanguíneas, coradas com May-Grünwald-Giemsa (Rosenfeld, 1947) para a contagem diferencial de leucócitos e contagem total de trombócitos e leucócitos. Os números totais foram calculados de acordo com Martins *et al.* (2004). A contagem total de eritrócitos foi determinada em hemocítometro, após diluição 1:200 em solução salina (0,65%).

Atividade fagocítica de leucócitos - A análise de fagocitose foi realizada de acordo com Martins *et al.* (2009). Após a coleta de sangue, uma alíquota de 0,5 mL - a qual foi adicionada 0,25 mL de suspensão de *A. hydrophila* 1×10^6 UFC mL⁻¹ - foi incubada a 28 °C por 30 min, sob agitação, e posteriormente centrifugada. As extensões sanguíneas foram preparadas e coradas por May-Grünwald-Giemsa (Rosenfeld, 1947) para a contagem do número de leucócitos que fagocitaram a bactéria, sendo esta expressa em percentagem do total de leucócitos.

Atividade de lisozimas - Foi feito um pool do sangue coletado, sem anticoagulante, de três peixes de cada unidade experimental. O sangue permaneceu em repouso durante aproximadamente 1 h a 25°C para coagulação, sendo posteriormente centrifugado a 1400 x g por 10 min para obtenção do soro sanguíneo e armazenamento a -20°C. A atividade da lisozima no soro sanguíneo foi determinada segundo Sankaran & Gurnani (1972), com adaptações. Vinte µL do soro, em quintuplicata, foram semeados em microplaca de fundo chato e a estes foram adicionados 200 µL da suspensão de 0,5 mg mL⁻¹ de células de

Micrococcus lysodeikticus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em cada poço. Posteriormente, a microplaca foi incubada por 20 min a 35°C. As absorbâncias iniciais e finais das amostras foram medidas em leitor de microplacas (Expert Plus Asys®) em 492 nm e a taxa de redução na absorbância das amostras foi convertida para concentração de lisozima ($\mu\text{g mL}^{-1}$), determinada pela curva padrão realizada com lisozima de clara de ovos de galinha (HEWL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

No final do experimento, foram coletadas amostras do coração e cérebro de exemplares dos peixes infectados para identificação da bactéria, por meio de testes bioquímicos do kit API 20E e software apiweb (Biomérieux®, Marcy l'Etoile, França), segundo Popovic *et al.* (2007).

Ensaio de digestibilidade

A digestibilidade de seis dietas contendo níveis crescentes de NuPro® (0, 10, 20, 40, 60 e 80 g kg⁻¹) para a tilápia-do-Nilo foi avaliada em um experimento em blocos inteiramente casualizados, com três réplicas no tempo. Foram utilizadas dietas semelhantes àquelas do ensaio de dose-resposta (Tabela 2), com exceção da adição de óxido de cromo III a 0,5 %, como marcador inerte, para o cálculo do coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da proteína, energia e matéria seca. Grupos de vinte juvenis de tilápia (peso médio 122,32 ± 11 g), linhagem GIFT, adquiridos em piscicultura comercial, foram estocados (densidade de 2.446,47 ± 5,67 g) em seis tanques cilindro-cônicos de 200 L. Os tanques eram equipados com tubos para coleta de fezes por sedimentação e ligados a um sistema de recirculação de água, nas mesmas condições do primeiro ensaio. As fezes foram coletadas em três repetições no tempo, quando os peixes de cada tanque eram alimentados com cada uma das dietas experimentais. A cada repetição os peixes eram redistribuídos nos tanques e, antes da coleta de fezes, eram alimentados por uma semana com as respectivas dietas experimentais. Os peixes eram alimentados duas vezes ao dia (9:00 e 16:00 h) na taxa de 4% do peso vivo. Uma hora após a última alimentação, realizava-se a limpeza das paredes internas dos tanques e 70 % do volume de água era renovado para evitar contaminação nas fezes. Em seguida, os tubos coletores eram acoplados no fundo dos tanques, onde as fezes eram depositadas por sedimentação para posterior coleta, segundo metodologia proposta por Kitagima & Fracalossi (2011).

Tabela 2. Formulação e composição proximal das dietas experimentais do ensaio de digestibilidade, contendo níveis crescentes de NuPro[®]. Valores expressos em g kg⁻¹ e na matéria seca.

Ingredientes	Suplementação com NuPro [®]					
	0	10	20	40	60	80
Farelo soja	470	460	450	430	410	390
Farinha resíduo salmão	30	30	30	30	30	30
Milho	459	459	459	459	459	459
Óleo soja	20	20	20	20	20	20
Óleo peixe	10	10	10	10	10	10
Premix ¹	6	6	6	6	6	6
Óxido de crômio III	5	5	5	5	5	5
NuPro [®]	0	10	20	40	60	80
<i>Composição proximal</i>						
Proteína bruta	326	325	323	323	321	320
Extrato etéreo	60	59	59	59	59	58
Matéria mineral	44	44	44	44	43	43
Fibra em detergente ácido	32	31	31	30	29	28
Energia bruta, kcal kg ⁻¹	3412	3405	3357	3384	3371	3357

¹ Ver Tabela 1.

A coleta das fezes foi feita três vezes ao dia, com intervalos de quatro horas (22:00, 02:00 e 06:00 h), sendo que os tubos coletores ficavam imersos em recipiente com gelo durante todo o período, para evitar proliferação bacteriana. Após as coletas, as fezes eram centrifugadas, secas em estufa a 60°C, moídas e armazenadas a -20°C para posterior análise.

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca, energia e proteína foram calculados seguindo a equação proposta por Cho & Slinger (1979):

$$CDA = 100 - [100 (Cr_2O_3d / Cr_2O_3f \times Fn / Dn)]$$

Onde: CDA = coeficiente de digestibilidade aparente, %
 Cr₂O₃d = óxido de cromo III na dieta, %
 Cr₂O₃f = óxido de cromo III nas fezes, %
 Fn = nutriente nas fezes, %; Dn: nutriente na dieta, %

Análises de composição proximal

As análises dos ingredientes, dietas, fezes e composição corporal dos peixes foram realizadas segundo metodologia padronizada pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1999). A energia bruta das dietas e fezes foi obtida em bomba calorimétrica. A concentração de óxido de cromo III das dietas e fezes foi determinada pelo método espectrofotométrico da difenilcarbazida, de acordo com metodologia proposta por Bremer Neto *et al.* (2003).

Análises estatísticas

Para avaliar o efeito da concentração de NuPro[®] nas dietas, os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão, sendo atendidos os pré-requisitos ao verificar a normalidade e a homocedasticidade dos resíduos. A análise multivariada de variância (MANOVA) foi utilizada para comparação das variáveis hematológicas antes e após o desafio com o patógeno. Nesta análises, utilizou-se o aplicativo Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2004), com nível de significância de 5%.

Resultados

Ensaio de dose-resposta

O ganho em peso diário, taxa de crescimento específico e consumo de ração foram significativamente influenciados ($P < 0,05$) pelos níveis crescentes de NuPro[®] (Fig. 1). Observou-se tendência linear crescente com o aumento da concentração do aditivo na dieta. Já a sobrevivência, conversão alimentar, retenção proteica e composição corporal dos peixes não apresentaram tendência significativa com o aumento da suplementação de NuPro[®] ($P > 0,05$) (Tabela3).

Desafio e avaliação das respostas hemato-imunológicas

Não foi observada mortalidade após o desafio. Entretanto, foram observados sinais clínicos, semelhantes aos do pré-ensaio de patogenicidade, característicos de infecção bacteriana, em todos os tratamentos, com exceção do controle. A presença de colônias de *A. hydrophila* foi confirmada (99,7%) nas amostras do cérebro e coração dos peixes infectados, demonstrando a eficácia do desafio. De forma geral, houve aumento nas concentrações das variáveis hemato-imunológicas após o desafio, quando comparadas às variáveis analisadas antes do desafio ($P < 0,05$), o que também indica a eficácia da infecção (Tabela 4). Entre as variáveis hematológicas, houve diminuição significativa no número de eritrócitos, trombócitos e linfócitos com o aumento das doses de NuPro[®] antes do desafio. Já após o desafio, houve aumento nas concentrações de trombócitos, leucócitos e monócitos ($P < 0,05$) (Tabela 4). A concentração de lisozimas do soro sanguíneo e a porcentagem de fagocitose não foram significativamente afetadas ($P > 0,05$) com o aumento da suplementação de NuPro[®] na dieta, antes ou após desafio.

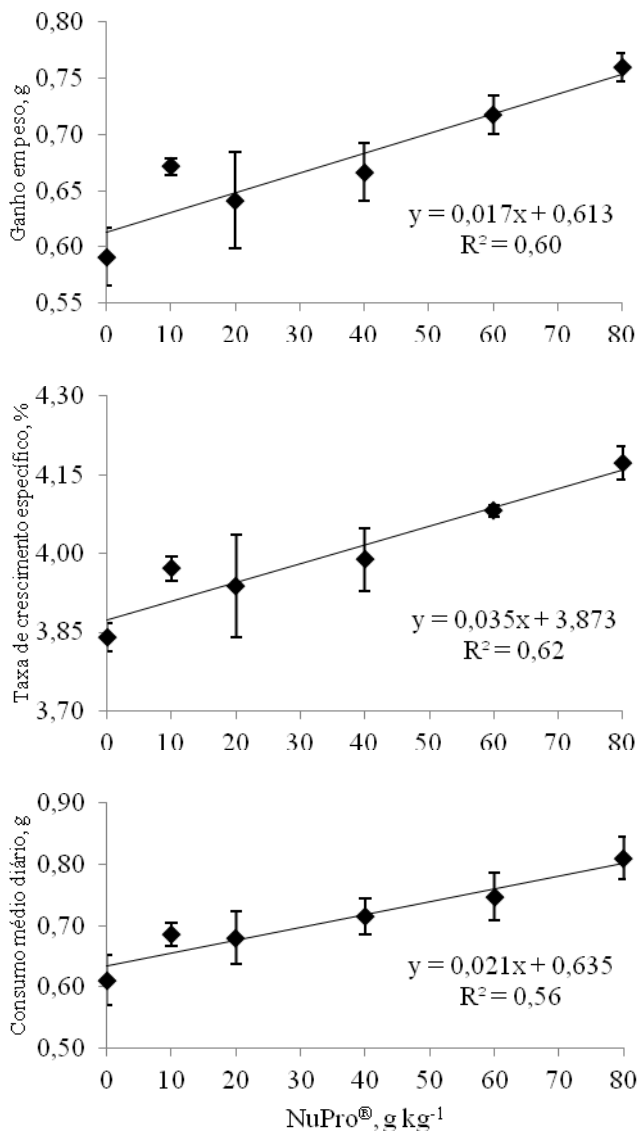


Figura 1. Ganho em peso médio diário por peixe, taxa de crescimento específico e consumo de ração de juvenis de tilápia-do-Nilo, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de NuPro[®] (média \pm erro padrão).

Tabela 3. Conversão alimentar, sobrevivência, retenção proteica e composição corporal de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de NuPro[®].*.

Variáveis	Suplementação com NuPro [®] , g kg ⁻¹					
	0	10	20	40	60	80
Conversão alimentar	1,15	1,19	1,19	1,23	1,16	1,21
Sobrevivência, %	90,00	93,75	93,75	92,50	90,00	93,75
Retenção proteica, g kg ⁻¹	476,5	448,8	448,7	447,0	453,7	468,7
<i>Composição corporal, g kg⁻¹</i>						
Proteína bruta	161,8	155,2	157,9	158,3	159,8	162,6
Extrato etéreo	65,7	77,1	63,7	69,2	70,5	74,2
Matéria mineral	33,2	35,9	35,6	35,3	32,6	39,7
Matéria seca	271,6	279,8	257,0	272,8	266,8	267,3

*Não foi observada influência do aumento das doses de NuPro[®] nas variáveis por análise de regressão ($P > 0,05$).

Ensaio de digestibilidade

A digestibilidade proteica das dietas foi alta, na ordem de 92,02 a 93,49% (Tabela 5). Conforme aumentou a concentração de NuPro[®] na dieta, houve diminuição da digestibilidade da proteína. Apesar de significativa, esta diminuição foi pequena, na ordem de 1,41%.

A digestibilidade energética variou de 82,99% a 77,27% e apresentou tendência semelhante à proteica, ou seja, diminuiu com o aumento da suplementação, na ordem de 5,72%.

A digestibilidade da matéria seca apresentou valores mais baixos, variando de 72,53 a 76,63%, mas também apresentou tendência linear decrescente com adição de NuPro[®], na ordem de 4,1%. Entretanto, o baixo valor do coeficiente de determinação (R^2) indica fraca relação entre o aumento de NuPro[®] nas dietas e a diminuição da digestibilidade da matéria seca.

Tabela 4: Variáveis hemato-imunológicas em juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com dietas suplementadas com níveis crescente de NuPro[®], antes e após desafio com *Aeromonas hydrophila*.

Variáveis	Desafio	Suplementação com NuPro [®] , g kg ⁻¹						P ¹
		0	10	20	40	60	80	
Eritrócitos, x10 ⁶ /mL	antes	-	2,12 ± 0,09	2,02 ± 0,17	1,63 ± 0,04	1,25 ± 0,08	1,46 ± 0,08	0,00004 ²
	depois	2,11 ± 0,08	1,84 ± 0,10	1,99 ± 0,17	2,03 ± 0,09	2,04 ± 0,07	2,32 ± 0,16	0,07
Hematócrito, %	antes	-	29,21 ± 1,17	26,08 ± 1,01	27,42 ± 1,01	25,30 ± 1,58	28,00 ± 1,01	0,55
	depois	33,22 ± 1,53	29,55 ± 1,28	32,16 ± 1,30	33,45 ± 1,41	34,56 ± 1,39	34,28 ± 2,33	0,09
Trombócitos, x10 ⁴ /mL	antes	-	6,40 ± 1,78	5,35 ± 1,12	2,63 ± 0,25	2,07 ± 0,26	3,19 ± 0,35	0,01 ³
	depois	2,75 ± 0,19	2,40 ± 0,23	4,8 ± 0,87	5,28 ± 0,67	7,13 ± 0,88	7,83 ± 0,25	0,0000001 ⁴
Leucócitos, x10 ⁴ /mL	antes	-	3,06 ± 0,26	3,20 ± 0,25	2,52 ± 0,37	1,61 ± 0,26	3,20 ± 0,49	0,09
	depois	5,26 ± 0,81	4,55 ± 0,29	5,27 ± 0,86	4,79 ± 0,51	5,21 ± 0,84	6,85 ± 0,48	0,02 ⁵
Linfócitos, x10 ⁴ /mL	antes	-	2,76 ± 0,29	2,45 ± 0,19	1,87 ± 0,36	1,07 ± 0,15	1,77 ± 0,23	0,008 ⁶
	depois	3,74 ± 0,59	2,59 ± 0,36	3,82 ± 0,71	3,09 ± 0,34	3,97 ± 0,80	4,15 ± 0,49	0,23
Monócitos, x10 ⁴ /mL	antes	-	0,20 ± 0,01	0,08 ± 0,05	0,22 ± 0,11	0,06 ± 0,03	0,44 ± 0,18	0,14
	depois	0,86 ± 0,23	1,23 ± 0,22	0,68 ± 0,13	0,82 ± 0,19	1,23 ± 0,11	1,71 ± 0,50	0,04 ⁷
Neutrófilos, x10 ⁴ /mL	antes	-	0,10 ± 0,02	0,67 ± 0,14	0,45 ± 0,05	0,48 ± 0,10	0,63 ± 0,07	0,26
	depois	0,66 ± 0,16	0,73 ± 0,09	1,00 ± 0,43	0,88 ± 0,25	0,82 ± 0,17	0,99 ± 0,28	0,14
Fagocitose, %	antes	-	3,83 ± 1,01	3,25 ± 1,24	1,5 ± 0,71	1,75 ± 0,53	2,17 ± 0,38	0,15
	depois	6,62 ± 1,25	5,75 ± 2,32	7,75 ± 1,76	7,25 ± 2,37	4,00 ± 1,37	4,5 ± 1,06	0,2
Lisozima, µg/mL	antes	-	13,22 ± 1,33	12,09 ± 1,69	14,27 ± 0,65	14,37 ± 0,86	12,90 ± 1,50	0,44
	depois	7,28 ± 0,34	14,45 ± 1,11	17,53 ± 0,03	15,68 ± 1,10	16,56 ± 2,02	15,32 ± 0,01	0,57

¹ Valor de P para análise de regressão entre as doses de NuPro[®] na dieta para cada variável.

$$^2 y = 0,027x^2 - 0,368x + 2,598 \quad R^2 = 0,76.$$

$$^3 y = 0,207x^2 - 2,382x + 8,962 \quad R^2 = 0,56.$$

$$^4 y = 0,680x + 2,612 \quad R^2 = 0,78.$$

$$^5 y = 0,059x^2 - 0,25x + 5,107 \quad R^2 = 0,32.$$

$$^6 y = 0,061x^2 - 0,746x + 3,634 \quad R^2 = 0,55.$$

$$^7 y = 0,029x^2 - 0,150x + 1,015 \quad R^2 = 0,28.$$

Tabela 5. Coeficientes de digestibilidade aparente (CDAs) da proteína, energia e matéria seca de dietas suplementadas com níveis crescentes de NuPro[®] para tilápia-do-Nilo.

CDA, %	Suplementação com NuPro [®] , g kg ⁻¹						P^4
	0	10	20	40	60	80	
Proteína bruta ¹	93,49 ± 0,2	92,97 ± 0,1	93,42 ± 0,3	93,01 ± 0,3	92,02 ± 0,4	92,08 ± 0,7	0,004
Energia bruta ²	82,99 ± 0,5	81,60 ± 0,1	80,40 ± 0,2	80,08 ± 0,2	77,64 ± 0,5	77,27 ± 1,1	0,0001
Matéria seca ³	76,63 ± 0,6	74,56 ± 0,2	76,00 ± 0,2	76,18 ± 0,5	72,53 ± 0,7	74,33 ± 1,2	0,03

$$^1 y = -0,185x + 93,48 \quad R^2 = 0,42.$$

$$^2 y = -0,699x + 82,44 \quad R^2 = 0,82.$$

$$^3 y = -0,309x + 76,12 \quad R^2 = 0,27.$$

⁴ Valor de P para análise de regressão entre as doses de NuPro[®] na dieta para cada CDA..

Discussão

A suplementação com nucleotídeos é especialmente importante no desenvolvimento de tecidos com rápido *turnover* celular, quando a capacidade de síntese endógena não é suficiente para responder às maiores necessidades, como em períodos de rápido crescimento e após enfermidades ou traumas (Bueno *et al.*, 1994; Carver & Walker, 1995). Assim, há evidências que a suplementação de nucleotídeos na dieta pode proporcionar efeitos benéficos sobre o crescimento, regeneração celular e sistema imune, além de promover redução de gasto energético para produção dos nucleotídeos pelo próprio organismo (Ortega *et al.*, 1995). Isto foi confirmado no presente estudo, sendo evidente que a suplementação de NuPro[®] exerceu efeito positivo no desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo.

A conversão alimentar não se alterou com o aumento da concentração do aditivo na dieta, porém os peixes consumiram mais ração e, conseqüentemente, apresentaram incremento significativo no ganho em peso. O extrato de leveduras pode ser utilizado na indústria de alimentos como intensificador e/ou potenciador de sabor, principalmente por conter altas concentrações de ácido glutâmico e nucleotídeos, tais como o 5'-guanosina-monofosfato e 5'-guanina-monofosfato, reconhecidos por suas propriedades como estimulantes alimentares (Ferreira *et al.*, 2010). Esta resposta positiva foi relatada em peixes (Mackie, 1973; Rumsey *et al.*, 1992; Li & Gatlin III, 2006). Entretanto, quando em altas concentrações na dieta, NuPro[®] pode prejudicar a palatabilidade, conforme relatado para juvenis de bijupirá alimentados com dietas quando houve a substituição total de farinha de peixe por esse aditivo (780 g kg⁻¹ de inclusão). Neste caso, os peixes consumiram menos ração e tiveram seu crescimento comprometido (Lunger *et al.*, 2006). Já no presente estudo, a maior concentração testada, que foi de 80 g kg⁻¹, ainda estimulou o consumo e crescimento dos peixes. O aumento na concentração do aditivo exerceu possível melhora na atratividade e palatabilidade destas dietas, considerando-se que as mesmas eram isonitrogenadas e isoenergéticas. NuPro[®] também resultou em aumento do ganho em peso de tilápia-do-Nilo, quando incluído como ingrediente proteico em substituição ao farelo de soja (20 a 80%) (Mclean & Craig, 2004). A suplementação de NuPro[®] em dietas para outras espécies de peixes também se mostrou benéfica, podendo ser adicionado como ingrediente proteico em substituição à farinha de peixe em até 25% da dieta para bijupirá (Lunger *et al.*, 2006, 2007) e em até 10%, para o bagre do canal (Peterson *et al.*, 2012).

Melhora no crescimento com a inclusão de nucleotídeos na dieta também foi relatada para garoupa, *Epinephelus malabaricus* (Lin *et al.*, 2009), salmão do atlântico, *Salmo salar* (Burrells, 2001b), tilápia híbrida (Ramadan & Atef, 1991) e truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Adamek *et al.*, 1996; Keyvanshokoo & Tahmasebi-Kohyano, 2012). Porém, é importante salientar que nestes estudos foram utilizadas misturas de nucleotídeos purificados e não o extrato de levedura como no presente estudo.

Houve redução na digestibilidade da proteína e energia com a suplementação dietética de doses crescentes do aditivo, provavelmente causada pelo aumento no consumo de ração. A digestibilidade da proteína diminuiu significativamente com o aumento da concentração de NuPro[®] nas dietas. Porém, apesar de significativa, essa diminuição foi pequena, indicando que o aumento da concentração do aditivo teve pouca influencia sobre o aproveitamento desse nutriente. Já a digestibilidade da energia foi mais afetada negativamente com adição do aditivo. NuPro[®] é um extrato de levedura rico em nucleotídeos (Fegan, 2006), os quais são fontes de energia, principalmente na forma de ATP (adenosina trifosfato) e GTP (guanosina trifosfato) (Carver & Walker, 1995). A exigência energética da tilápia foi atingida na dieta controle, sem suplementação (NRC, 2011). Portanto, o excesso de energia proveniente dos nucleotídeos das dietas com maiores concentrações do aditivo provavelmente explica a diminuição da digestibilidade da energia. A diminuição do gasto energético para produção de nucleotídeos pelo próprio organismo também pode ter influenciado nesses resultados.

A composição corporal se manteve constante com o aumento das doses de NuPro[®], indicando que o aditivo não influenciou na forma de deposição dos nutrientes corporais pela tilápia-do-Nilo. O mesmo foi observado em estudos com bijupirá (Lunger *et al.*, 2006) e lucioperca, *Sander lucioperca* (Jarmolowicz *et al.*, 2012).

Não foi observada mortalidade após o desafio com *A. hydrophila*. Porém, após a infecção experimental, as células de defesa e as variáveis humorais apresentaram valores mais elevados em relação ao período antes da infecção, evidenciando imuno-modulação positiva. Martins *et al.* (2008) observaram aumento na concentração de hematócrito, leucócitos, trombócitos e linfócitos em tilápias-do-Nilo, 24 h após desafio com *Enterococcus* sp., corroborando o presente estudo e indicando uma situação de defesa contra o patógeno. No presente estudo, observou-se que, mesmo 96 h após o desafio, os peixes ainda se encontravam em situação de defesa. Um maior período de observação

talvez permitisse a observação de mortalidade. Entretanto, como as variáveis hemato-imunológicas estavam elevadas, a possibilidade que os peixes conseguissem se defender dessa infecção também não pode ser descartada (Christyapita *et al.*, 2007).

Antes da infecção, as variáveis hemato-imunológicas se mantiveram próximas às observadas em outros estudos com tilápia-do-Nilo (Hrubec *et al.*, 2000, Ranzani-Paiva *et al.*, 2005, Ghiraldelli *et al.*, 2006, Jerônimo *et al.*, 2011). Com o aumento das doses de NuPro[®] na dieta os eritrócitos, trombócitos e linfócitos apresentaram diminuição nas suas concentrações. Apesar dessa diminuição, após a infecção a maioria das variáveis analisadas se manteve constante, com exceção dos trombócitos, leucócitos e monócitos, que apresentaram aumento nas suas concentrações. Trombócitos são células responsáveis pela coagulação sanguínea, que migram para focos inflamatórios (Martins *et al.*, 2008). Os trombócitos também atuam na defesa humoral e podem desempenhar função fagocítica (Burrows *et al.*, 2001). Os leucócitos (monócitos, neutrófilos, basófilos, entre outros) desempenham importante papel na defesa não específica do sistema imune inato em peixes (Misra *et al.*, 2006), sendo que a diminuição do número de monócitos é normal em processos inflamatórios (Silva *et al.*, 2012). Neste estudo, a concentração de monócitos aumentou significativamente com a adição crescente de NuPro[®] nas dietas, após a infecção. Portanto, as maiores concentrações de NuPro[®] influenciaram no aumento da concentração de trombócitos, leucócitos e monócitos, auxiliando o peixe a se defender da infecção bacteriana.

As respostas imunológicas não específicas ou inatas avaliadas no presente estudo (atividade de lisozima e fagocitose) não variaram com o aumento da suplementação de NuPro[®]. Já doses 40 e 60 g kg⁻¹ de NuPro[®] na dieta potencializaram a atividade fagocítica e atividade da lisozima, bem como a proliferação de linfócitos no sangue em lucioperca (Jarmolowicz *et al.*, 2012). Ainda, em carpa comum, foi observado aumento significativo na atividade fagocítica e resistência à *A. hydrophila*, em peixes alimentados com dietas suplementadas com extrato de levedura (Biswas *et al.*, 2012).

NuPro[®] se apresentou como aditivo benéfico para suplementação em dietas para juvenis de tilápia-do-Nilo, já que proporcionou aumento significativo no ganho em peso (28,8% na maior concentração testada) nessa fase fundamental do ciclo de vida e resultou em aumento significativo nas contagens de trombócitos, leucócitos e monócitos no sangue, indicando possível reação de defesa mais eficiente nas maiores doses testadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Alltech, Inc. pelo financiamento do estudo e pelo apoio durante a realização dos experimentos. Agradecimentos também são devidos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas concedidas ao primeiro e segundo autor e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas aos demais autores durante a realização das atividades. Os autores agradecem também à Dra. Maria Margarida Barros pela valiosa revisão do artigo.

Referências

- AOAC - Association of Official Analytical Chemists (1999) Official methods of analysis. ed.16, Washington, D.C. 1141p.
- Adamek, Z., Hamackova, J., Kouril, J., Vachta, R. & Stibranyiova, I. (1996) Effect of Ascogen probiotics supplementation on farming success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and wels (*Silurus glais*) under conditions of intensive culture. *Krmiva*, 38, 11-20.
- Biswas, G., Korenaga, H. Takayama, H. Kono, T. Shimokawa, H. & Sakai, M. (2012) Cytokine responses in the common carp, *Cyprinus carpio* L. treated with baker's yeast extract. *Aquaculture*, 356, 169-175.
- Bremer Neto, H., Graner, C.A.F. & Pezzato, L.E. (2003). Diminuição do teor de óxido de cromo (III) usado como marcador externo. *Ver Bras de Zootecn*, 32(2), 249-255.
- Bueno, J., Torres, M., Almendros, A., Carmona, R., Nunez, M. C., Rios, A. & Gil, A. (1994) Effect of dietary nucleotides on small intestinal repair after diarrhea. Histological and ultrastructural changes. *Gut*, 53, 926-933.
- Burrells, C., Williams, P.D. & Forno, P.F. (2001a) Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 1. Effects on resistance to disease in salmonids. *Aquaculture* 199, 159–169.
- Burrells, C., Williams, P.D., Southgate, P.J. & Wadsworth, S.L. (2001b) Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 199, 171–184.
- Burrows, A.S., Fletcher, T.C. & Manning, M.J. (2001) Haematology of the turbot, *Psetta maxima* (L.): ultrastructural, cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. *J Appl Ichthyol*, 17, 77-84.
- Carr, W.E.S. & Thompson, H.W. (1983) Adenosine 5'-monophosphate, an internal regulatory agent, is a potent chemoattractant for a marine shrimp. *J Comp Physiol*, 153, 47-53.

- Carr, W.E.S., Netherton, J.C. & Milstead, M.L. (1984) Chemoattractants of the shrimp, *Palaemonetes pugio*: variability in responsiveness and the stimulatory capacity of mixtures containing amino-acids, quaternary ammonium-compounds, purines and other substances. *Comp Biochem Phys A*, 77, 469-474.
- Carver, J.D. & Walker, W.A. (1995) The role of nucleotides in human nutrition. *J Nutr Biochem*, 6, 58-72.
- Cho, C.Y. & Slinger, S.J. (1979) Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. In: *Proc. World Symposium on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology* (Halver, J. & Tiews, K. eds.), Vol. 2, pp. 239–247. Heenemann, Berlin.
- Christyapita, D., Divyagnaneswari, M., Dinakaran Michael, R. (2007) Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immun*, 23, 840-852.
- Do Huu, H., Tabrett, S., Hoffmann, K., Köppel, P., Lucas, J.S. & Barnes, A.C. (2012) Dietary nucleotides are semi-essential nutrients for optimal growth of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 366-367, 115-121.
- Fegan, D.E. (2006) Functional foods for aquaculture: benefits of Nupro and dietary nucleotides in aquaculture feeds. Pp. 419-432. In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and food Industries. Proceedings of Alltech's 22nd Annual Symposium*. T.P. Lyons, K.A. Jacques and J.M. Hower (Eds). Pub. Nottingham University press.
- Ferreira, I.M.P.L.V.O., Pinho, O., Vieira, E. & Tavela, J.G. (2010) Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends Food Sci Tech*, 21, 77-84.
- Fitzsimmons, K., Martinez-Garcia, R., Gonzalez-Alanis, P. (2011) Why tilapia is becoming the most important food fish on the planet. Liu, P., Fitzsimmons, K. (Eds.). *Proceedings of the 9th International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. Shanghai (2011), pp. 1–8, 409 pp.

- Ghiraldelli, L., Martins, M.L., Yamashita, M.M., Jerônimo, G.T. (2006) Ectoparasites influence on the parameters of Nile tilapia and carp cultured in the state of Santa Catarina, south Brazil. *J Fish Aqua Sci*, 1(3), 270-276.
- Gil, A. (2002). Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. *Eur J Clin Nutr*, 56(3), S1-S4.
- Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., Smith, S.A. (2000) Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet Clin Pathol*, 29(1), 7-12.
- Jarmolowicz, S., Zakes, Z., Siwicki, A., Kowalska, A., Hopko, M., Glabski, E., Demska-Zakes, K. & Partyka, K. (2012) Effects of brewer's yeast extract on growth performance and health of juvenile pikeperch *Sander lucioperka* (L.). *Aquacult Nutr*, 18, 457-464.
- Jerônimo, G.T., Laffitte, L.V., Speck, G.M., Martins, M.L. (2011) Seasonal influence on the hematological parameters in cultured Nile tilapia from southern Brazil. *Braz J Biol*, 71(3), 719-725.
- Keyvanshokoo, S. & Tahmasebi-Kohyani, A. (2012) Proteome modifications of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle as an effect of dietary nucleotides. *Aquaculture*, 324–325, 79–84.
- Kitagima, R. E. & Fracalossi, D. M. (2011) Digestibility of alternative protein-rich feedstuffs for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J World Aquacult Soc*, 42(3), 306-312.
- Klesius, P.H.; Shoemaker, C.A. & Evans, J.J. (2000) Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 188, 237-246.
- Lara-Flores, M., Olvea-Novoa, M.A. & Guzman-Mendez, B.E. (2003) Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth

- promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216, 193-201.
- Leonardi, M., Sandino, A.M. & Klempau, A. (2003) Effect of a nucleotide-enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 23, 52-59.
- Li, P. & Gatlin III, D.M. (2006) Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. *Aquaculture*, 251, 141-152.
- Li, P., Gatlin III, D.M. & Neill, W.H. (2007) Dietary supplementation of a purified nucleotide mixture transiently enhanced growth and feed utilization of juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. *J World Aquacult Soc*, 38, 281-286.
- Lin, Y.H., Wang, H. & Shiau, S.Y. (2009) Dietary nucleotide supplementation enhances growth and immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquacult Nut*, 15, 117-122.
- Lunger, A.N., Craig, S. & McLean, E. (2006). Replacement of fish meal in cobia (*Rachycentron canadum*) diets using an organically certified protein. *Aquaculture*, 257, 393-399.
- Lunger, A.N., Mclean, E., Craig, S.R. (2007) The effects of organic protein supplementation upon growth, feed conversion and texture quality parameters of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 264, 342-352.
- Mackie, A.M. (1973) The chemical basis of food detection in the lobster *Homarus gammarus*. *Mar Biol*, 21, 103-108.
- Mackie, A. M. & Adron, J.W. (1978) Identification of inosine and inosine-5'-monophosphate as the gustatory feeding stimulants for the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Comp Biochem Physiol A*, 60, 79-83.
- McLean, E. & Craig, S.R. (2004) Growth performance of Nile tilapia fed with an organically certified yeast-based alternative protein source. In: Flick, G.J., Correa, A., Rakestraw, T. (Eds). *Proceedings of the*

5th International Conference on Recirculating Aquaculture. July 22-25, 2004. Roanoke, VA, USA, pp. 580-586.

- Martins, M.L., Nomura, D.T., Myiazaki, D.M.Y., Pilarsky, F., Ribeiro, K. & Castro, M.P. (2004) Physiological and haematological response of *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) exposed to single and consecutive stress of capture. *Acta Sci Anim Sci*, 26, 449–456.
- Martins, M.L., Mouriño, J.L.P., Amaral, G.V., Vieira, F.N., Dotta, G. & Bezerra, A.J.M. (2008) Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Braz J Biol*, 68(3), 631–637.
- Martins, M.L., Vieira, F.N., Jerônimo, G.T., Mouriño, J.L.P., Dotta, G., Speck, G.M., Bezerra, A.J.M., Pedrotti, F.S., Buglione-Neto, C.C. & Pereira Jr. G. (2009). Leukocyte response and phagocytic activity in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Fish Physiol Biochem*, 35(1), 219-222.
- Misra, S., Sahu, N.P., Pal, A.K., Xavier, B., Kumar, S. & Mukherjee, S.C. (2006) Pre- and post-challenge immuno-haematological changes in *Labeo rohita* juveniles fed gelatinised or non-gelatinised carbohydrate with n-3 PUFA. *Fish & Shellfish Immunol*, 21(4), 346-356.
- NRC - National Research Council (2011) Nutrient requirements of fish. Washington, D.C. 360p.
- Ortega, M. A., Nuñez, M. C., Gil, A., Sánchez-Pozo, A. (1995) Dietary nucleotides accelerate intestinal recovery after food deprivation in old Rats. *J Nutr*, 125 (6),1413-1418.
- Panagiotidou, M., Nengas I., Henry M., Rigos G., Charalambous C. & Sweetman J. (2009) Effect of different dietary levels of yeast extract Nupro[®] on growth, feed utilisation and immune system of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). 9th Symposium on Oceanography & Fisheries, 2009 - Proceedings, Volume II, pp. 1080-1084.
- Peterson, B. C. Booth, N. J. & Manning, B. B. (2012). Replacement of fish meal in juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*, diets

using a yeast-derived protein source: the effects on weight gain, food conversion ratio, body composition and survival of catfish challenged with *Edwardsiella ictaluri*. *Aquacult Nutr*, 18(2), 132-137.

Popma, T.J. & Lovshin, L.L. (1994) Worldwide prospects for commercial production of tilapia. Auburn: Auburn University, Center for Aquaculture and Aquatic Environments, Department of Fisheries and Allied Aquacultures, 40p.

Popovic, N.T., Coz-Rakovac, R., Strunjak-Perovic, I. (2007) Commercial phenotypic tests (API 20E) in diagnosis of fish bacteria: a review. *Vet Med-Czech*, 52(2), 49-53.

Plumb, J.A. (1999) Tilapia bacterial diseases. In: Plumb, J.A. (Ed.), *Health Maintenance and Principal Microbial Diseases Cultured Fishes*. Iowa State University Press, AMES, pp. 297– 305.

Ranzani-Paiva, M.J.T., Felizardo, N.N. & Luque, J.L. (2005) Parasitological and hematological analysis of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757 from Guarapiranga reservoir, São Paulo State, Brazil. *Acta Sci Biol Sci*, 27(3), 231-237.

Ramadan, A. & Atef, M. (1991) Effect of the biogenic performance enhancer (Ascogen “S”) on growth rate of tilapia fish. *Acta Vet Scand*, 87, S304–S306.

Rosenfeld, G., 1947. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem Inst Butantan*, 20, 329-334.

Rumsey, G.L., Winfree, R.A. & Hughes, S.G. (1992) Nutritional value of dietary nucleic acids and purine bases to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 108, 97-110.

Sakai, M., Taniguchi, K., Mamoto, K., Ogawa, H. & Tabata, M. (2001) Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. *J Fish Dis*, 24, 433-438.

- Sankaran, K. & Gurnani, S. (1972). On the variation in the catalytic activity of lysozyme in fishes. *Indian J Biochem Biophysics*, 9(2), 162-165.
- Silva, B. C., Mouriño, J.L.P., Vieira, F.N., Jatobá, A., Seiffert, W.Q. & Martins, M.L. (2012). Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquac Res*, 43, 908-916.
- Sritunyalucksana, K., Gangnonngiew, W., Archakunakorn, S., Fegan, D. & Flegel, T.W. (2005). Bacterial clearance rate and new different hemocyte staining method to assess immunostimulant activity in shrimp. *Dis Aquat Organ*, 63, 89-94.
- Uauy, R., Stringel, G., Thomas, R. & Quan, R. (1990) Effect of dietary nucleotides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *J Pediatr Gastr Nutr*, 10, 497-503.
- Zimmermann, S. & Fitzsimmons, K. (2004) Tilapicultura intensiva. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M., Catagnolli, N. (eds). *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. São Paulo, Tec Art. pp.239-266.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ABDEL-TAWWAB, M., ABDEL-TAWWAB, A.M, ISMAEL, N.E.M. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.280, p.185-189, 2008.

BEKATOROU, A., PSARIANOS, C., KOUTINAS, A.A. Production of Food Grade Yeasts. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, p.407-415, 2006.

BRUGALLI, I. Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In: Simpósio sobre manejo e nutrição de aves e suínos, 2003, Campinas. **Anais**. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, p.167-182, 2003.

BUENO, J. TORRES, M., ALMENDROS, A., CARMONA, R., NUNEZ, M. C., RIOS, A., GIL, A. Effect of dietary nucleotides on small intestinal repair after diarrhea. Histological and ultrastructural changes. **Gut**.v.53, p.926-933, 1994.

BURRELLS, C., WILLIAM, P.D., FORNO, P.F. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 1. Effects on resistance to diseases in salmonids. **Aquaculture**, v.199, p.159-169, 2001.

CARVER, J.D.; WALKER, W.A. The role of nucleotides in human nutrition. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v.6, p.58-72, 1995.

CONNELL, M. Nucleotides and the Paleo Diet. **The Paleo Diet Update**. v.5, issue 33, 2009.

FEGAN, D.E. Functional foods for aquaculture: benefits of Nupro and dietary nucleotides in aquaculture feeds. Pp. 419-432. In: Nutritional Biotechnology in the Feed and food Industries. Proceedings of Alltech's 22nd Annual Symposium. T.P. Lyons, K.A. Jacques and J.M. Hower (Eds). Pub. Nottingham University press, 2006.

FERREIRA, I.M.P.L.V.O., PINHO, O., VIEIRA, E., TAVARELA, J.G. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v.21, p.77-84, 2010.

FITZSIMMONS, K., MARTINEZ-GARCIA, R., GONZALEZ-ALANIS, P. Why tilapia is becoming the most important food fish on the planet. In: LIU, P., FITZSIMMONS, K. (Eds.). Proceedings of the 9th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Shanghai, p.1-8, 409p, 2011.

GIL, A. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.56, p.S1-S4, 2002.

GRIMBLE, G.K., WESTWOOD, O.M.R. Nucleotides. In: GERSWIN, M.E., GERMAN, J.B., KEEN, C.L. (Eds.), Nutrition and Immunology: Principles and Practice. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, p.135-144, 2000.

GUNTHER, S. J.; LYONS, T. P.; JACQUES, K. A.; HOWER, J. M.; ALLTECH UK, STAMFORD, UK, Nutritional biotechnology in the feed and food industries The new energy crisis: food, feed or fuel?: **Proceedings of Alltech's 23rd Annual Symposium**, p.355-358, 2007.

HISANO, H., NARVÁEZ-SOLARTE, W. V., BARROS, M. M., PEZZATO, L. E. Desempenho produtivo de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com levedura e derivados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n7, p.1035-1042, 2007.

LARA-FLORES, M.; OLVEA-NOVOA, M.A.; GUZMAN-MENDEZ, B.E. Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.216, n.1-4, p.193-201, 2003.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo, 2002.

LEONARDI M., SANDINO A.M., KLEMPAU A. Effect of a nucleotide-enriched diet on the immune system, plasma cortisol levels and resistance to infectious pancreatic necrosis (IPN) in juvenile

rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v.23, p.52-59. 2003.

LERNER, A., SHAMIR, R. Nucleotides in infant nutrition: a must or an option. **The Israel Medical Association Journal**, v.2, n.10, p.772-774, 2000.

LI, P., GATLIN III, D.M. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. **Aquaculture**, v.251, p141-152, 2006.

LUNGER, A.N., CRAIG, S. & MCLEAN, E. Replacement of fish meal in coibia (*Rachycentron canadum*) diets using an organically certified protein. *Aquaculture*, 257, 393–399, 2006.

LUNGER, A.N., MCLEAN, E., CRAIG, S.R. The effects of organic protein supplementation upon growth, feed conversion and texture quality parameters of juvenile coibia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 264, 342-352, 2007.

MACKIE, A.M. The chemical basis of food detection in the lobster *Homarus gammarus*. **Marine Biology**, v.21, p.103-108, 1973.

MACKIE, A.M. & ADRON, J.W. Identification of inosine and inosine 5'-monophosphate as the gustatory feeding stimulants for the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v.60, p.79-83, 1978.

MCLEAN, E. & CRAIG, S.R. Growth performance of Nile tilapia fed with an organically certified yeast-based alternative protein source. In: Flick, G.J., Correa, A., Rakestraw, T. (Eds). *Proceedings of the 5th International Conference on Recirculating Aquaculture*. July 22-25, 2004. Roanoke, VA, USA, pp. 580-586, 2004.

NGUYEN, T.H., FLEET, G.H., ROGERS, P.L. Composition of the cell walls of several yeast species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, p.206-212, 1998.

ORTEGA, M. A., NUÑEZ, M. C., Gil, A., SÁNCHEZ-POZO, A. Dietary Nucleotides Accelerate Intestinal Recovery after Food

Deprivation in Old Rats. **American Institute of Nutrition**, v.125, p.1413-1418, 1995.

PANAGIOTIDOU, M., NENGAS I., HENRY M., RIGOS G., CHARALAMBOUS C. & SWEETMAN J. Effect of different dietary levels of yeast extract Nupro® on growth, feed utilisation and immune system of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). 9th Symposium on Oceanography & Fisheries, 2009 - Proceedings, Volume II, pp. 1080-1084, 2009.

PLUMB, J.A. Tilapia bacterial diseases. In: Plumb, J.A. (Ed.), Health Maintenance and Principal Microbial Diseases Cultured Fishes. Iowa State University Press, AMES, pp. 297– 305, 1999.

ROSSI, P., XAVIER, E. G., RUTZ, F. Nucleotídeos na nutrição animal. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.1, p.05-12, 2007.

RUMSEY, G.L., WINFREE, R.A., HUGHES, S.G. Nutritional value of dietary nucleic acids and purine bases to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.108, p.97-110, 1992.

SRITUNYALUCKSANA, K., GANGNONNGIEWS, W., ARCHAKUNAKORN, S., FEGAN, D. & FLEGEL, T.W. Bacterial clearance rate and new different hemocyte staining method to assess immunostimulant activity in shrimp. *Dis Aquat Organ*, 63, 89-94, 2005.

STEIN, H. H.; KILL, D. Y. Redeced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 2. **Animal Biotechnology**. Champaign. v.17, p.217-231, 2006.

TACON, A.G.J., COOKE, D.J. Nutritional value of dietary nucleic acids to trout. **Nutrition Reports International**, v.22, p.631, 1980.

UAUY, R. Non-immune system responses to dietary nucleotides. **Journal of Nutrition**, v.124, p.157S-159S, 1994.

VÁZQUEZ, J.A.; GONZÁLEZ, M.P.; MURADO, M.A. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. **Aquaculture**, v.245, p.149-161, 2005.

VILELA, E. S. D. SGARBIERI, V. C. ALVIM, I. Z. Valor nutritivo da biomassa de células íntegras, do autolisado e do extrato de levedura originária de cervejaria. **Revista de Nutrição**. Campinas, v.13, p.127-134, 2000.

WELKER, T. L., LIM, C., YILDIRIM-AKSOY, M., KLESIUS, P. H. Effects of dietary supplementation of a purified nucleotide mixture on immune function and disease and stress resistance in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture Research**, v.42, i.12, p.1878-1889, 2011.

ZIMMERMANN, S. & FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M., Catagnolli, N. (eds). Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. São Paulo, Tec Art. p.239-266, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

NuPro[®] se mostrou benéfico para a tilápia-do-Nilo, podendo ser adicionado na dieta, com resultados favoráveis no desempenho dos animais.

A sobrevivência média dos peixes no ensaio de crescimento foi de aproximadamente 93%, sendo que não houve diferença entre as doses de NuPro[®] testadas. Entretanto, cabe salientar que durante o período experimental foi observado forte comportamento de dominância e territorialidade, com confrontos agonísticos e submissão dos indivíduos menores. Foi observada heterogeneidade no crescimento entre indivíduos do mesmo tanque, sendo constatado que os indivíduos submissos muitas vezes não se alimentavam, crescendo pouco e, em alguns tanques, até morrendo.

Alguns estudos que testaram extratos de leveduras, assim como nucleotídeos purificados para peixes, relataram evidentes melhoras na resistência e aumento da sobrevivência, o que não ficou claro no presente estudo. Cabe salientar que, neste trabalho, a concentração e/ou virulência da cepa utilizada talvez não tenha sido suficiente para causar mortalidade em tilápia, apesar de terem sido observados sinais clínicos característicos de infecção. A cepa de *Aeromonas hydrophila* utilizada foi isolada de surto bacteriano em pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*. Talvez a inoculação desta cepa na tilápia-do-Nilo, seguido de re-isolamento da bactéria para utilização no desafio seria interessante, pois aumentaria a virulência da bactéria para a tilápia. Sugere-se esta recomendação para próximos ensaios de desafio.

A análise histológica dos intestinos seria ferramenta interessante para complementar o trabalho, já que muitos autores afirmam que os nucleotídeos presentes no extrato de levedura melhoram a estrutura de absorção de nutrientes pelo intestino e, por consequência, poderiam aumentar a digestibilidade da dieta. Entretanto, no presente estudo não se observou este aumento na digestibilidade.

Uma avaliação econômica deve ser realizada para confirmar a viabilidade do uso do NuPro[®] comercialmente. Também para confirmar a viabilidade do uso do NuPro[®] comercialmente, futuros ensaios em campo são interessantes para observar o real efeito do aditivo em situação de produção, já que em laboratório as condições são controladas e diferem das reais condições dos cultivos.

ANEXO

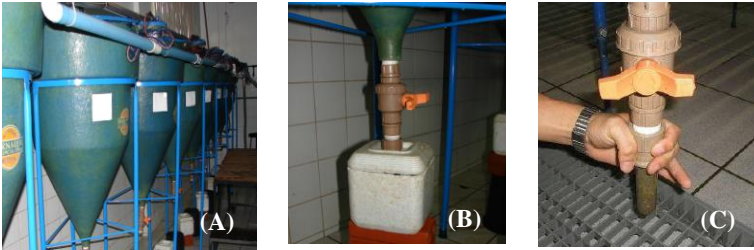


Figura 1: Ensaio de digestibilidade: (A) Tanques. (B) Caixa de gelo durante coleta de fezes. (C) Tubo coletor de fezes.

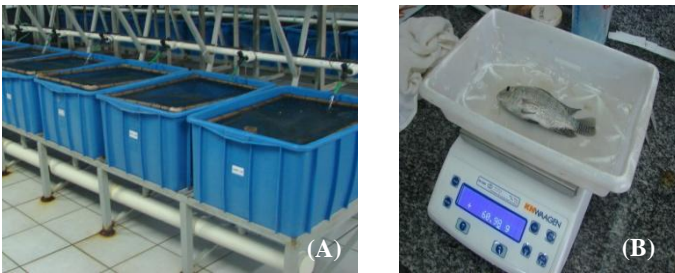


Figura 2: Ensaio de crescimento: (A) Tanques. (B) Biometria.



Figura 3: Desafio com *Aeromonas hydrophila*: (A) Tanques. (B) Coleta de sangue.

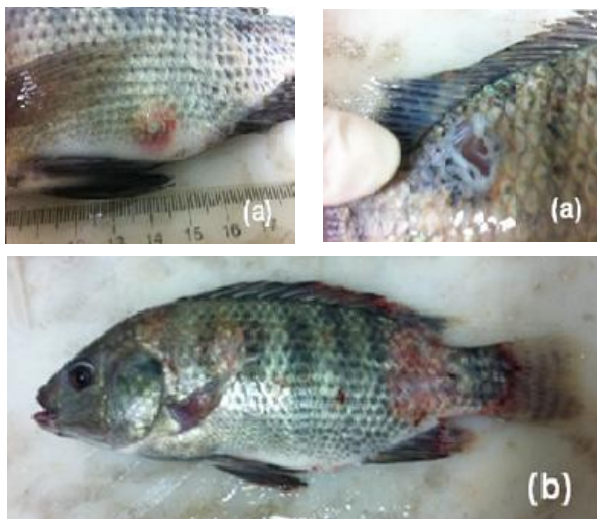


Figura 4. Sinais clínicos em tilápia-do-Nilo após 96 h do desafio com *Aeromonas hydrophila*: (a) ulcerações, (b) erosão nas nadadeiras e hemorragia.