



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

Influência do ácido caprílico suplementado na ração de juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* no controle de *Ichthyophthirius multifiliis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura

Orientadora: Débora Machado Fracalossi

Co-orientadora: Maude Regina de Borba

FANNY AYUMI YASUMARU

Florianópolis – 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Yasumaru, Fanny Ayumi

Influência do ácido caprílico suplementado na ração de juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* no controle de *Ichthyophthirius multifiliis* / Fanny Ayumi Yasumaru. Florianópolis, 2007.

41 f.; grafs., tab.

Dissertação (Mestrado) – Profª Orientadora: Dra. Débora Machado Fracalossi
Universidade Federal de Santa Catarina, 2007. Centro de Ciências Agrárias.

Bibliografia: f. 30-32; 35-37

1. *Rhamdia quelen*; 2. *Ichthyophthirius multifiliis*; 3. ácido caprílico; 4. piscicultura; 5. ácidos graxos.

Influência do ácido caprílico suplementado na ração de juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* no controle de *Ichthyophthirius multifiliis*.

Por

FANNY AYUMI YASUMARU

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. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dra. Débora Machado Fracalossi - *Orientadora*

Dr. Maurício Laterça Martins

Dra. Sueli Regina Baggio

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a orientação de Débora Machado Fracalossi, a co-orientação de Maude Regina de Borba, o incentivo de meus pais, Toshio e Irene Yasumaru, e irmãos, Évia e Vital, o apoio e paciência de Alessandro Ideriha, a amizade de Crislei Bett, Flávia Tavares, Josiane Ribolli, Neiva Braun, Aquiles Moraes, Giovanni Moro, Leandro Lemos, Renato Kitagima, Rodrigo Vargas, Ronaldo Lima de Lima e Vítor Giatti, as aulas da professora Juliet Kiyoko Sugai, a paciência de Carlito Klunk, a ajuda das equipes do LAPAD e do ITAL, as doações das empresas DSM Produtos Nutricionais Brasil e Zillo-Lorenzetti/Biorigin.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
O hospedeiro.....	8
O parasito.....	9
Formas de controle	13
Influência do ácido caprílico na dieta contra infestações de <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> em jundiá	
<i>Rhamdia quelen</i>	16
Resumo.....	17
Introdução	18
Materiais e métodos.....	20
Piloto.....	21
Experimento.....	22
Extração de lipídios e determinação da composição em ácidos graxos.....	23
Análise estatística.....	23
Resultados	24
Discussão.....	26
Referências bibliográficas.....	31
CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	36
APÊNDICES.....	39

RESUMO

Evidências na literatura demonstram a eficiência do ácido caprílico (C8:0) no controle de protozoários parasitos. Este estudo avaliou a influência da suplementação de C8:0 na ração sobre a infestação, sobrevivência e ganho em peso de jundiá *Rhamdia quelen* experimentalmente infestados por *Ichthyophthirius multifiliis*. Um ensaio Piloto de 45 dias e um Experimento de 35 dias foram realizados com suplementação de C8:0 nas concentrações de 1,25, 2,5, 5,0, 7,5, 10 e 12,5 g kg⁻¹ e 0,5, 1,1, 2,0, 3,0, 4,5; 5,2 g kg⁻¹, respectivamente. Em seguida, os peixes foram infestados com 755 e 140 terontes peixe⁻¹, respectivamente. Não houve diferença no ganho em peso e na intensidade de infestação entre as doses nos dois ensaios ($p>0,05$). No Piloto, peixes suplementados com 7,5 g kg⁻¹ apresentaram a menor mortalidade (5,56%) até o dia 13 pós-infestação (PI). No Experimento, peixes suplementados com 4,5 g kg⁻¹ apresentaram a menor mortalidade acumulada (3,23%) até o dia 11 PI. Entretanto, apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas na intensidade de infestação e na mortalidade entre as doses de C8:0 testadas, houve tendência de diminuição desses parâmetros em algumas concentrações, sugerindo que estudos futuros sejam realizados com ajustes no protocolo de infestação para diminuir as variações.

Palavras-chave: *Rhamdia quelen*, *Ichthyophthirius multifiliis*, ácido caprílico, piscicultura, ácidos graxos.

Influence of caprylic acid supplemented in the diet for fingerling jundiá *Rhamdia quelen* to control *Ichthyophthirius multifiliis* infection

ABSTRACT

Literature evidences demonstrate that caprylic acid (C8:0) efficiently control parasitic protozoans. The present study assessed the influence of C8:0 dietary supplementation on level of infection, survival and weight gain of jundiá *Rhamdia quelen* experimentally infected with *Ichthyophthirius multifiliis*. A Preliminary essay and an Experiment were performed supplementing a basal diet with C8:0 at concentrations 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5 g kg⁻¹ (Preliminary) and 0.5, 1.1, 2.0, 3.0, 4.5, 5.2 g kg⁻¹ (Experiment). Fish were fed for 45 and 35 days prior to ich challenge with 755 and 140 theronts fish⁻¹, respectively. No differences ($p>0.05$) were found in weight gain and level of infection between the treatments in both trials. In the Preliminary essay fish fed 7.5 g C8:0 kg⁻¹ diet presented lower mortality (5.56%) until day 13 post-infection (PI). In the Experiment, fish fed 4.5 g kg⁻¹ presented the lowest mortality (3.23%) until day 11 PI. However, although no significant differences were detected in level of infection and survival between the C8:0 concentrations, there was a trend of reduction in these parameters in some concentrations, suggesting that new studies should be carried out with adjustments in the ich challenge protocol to avoid wide variations.

Keywords: *Rhamdia quelen*, *Ichthyophthirius multifiliis*, caprylic acid, fish culture, fatty acids.

INTRODUÇÃO

O hospedeiro

O jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy e Gaimard 1824) é um bagre nativo da América Latina com interesse para aquicultura na região Sul do Brasil devido a características zootécnicas favoráveis como rápido crescimento, carne magra sem espinhas intramusculares, adaptado a temperaturas entre 15 e 34 °C, continua se alimentando no inverno, fácil indução à desova e aceitação de ração na primeira alimentação exógena (FRACALOSSI et. al., 2002; BALDISSEROTTO, 2004; CARNEIRO, 2004). Sua produção no estado de Santa Catarina aumentou de 149,7 ton em 2004 para 219,3 ton em 2005 (EPAGRI/CEPA, 2005). Entretanto, sempre que criado comercialmente, o jundiá é submetido a situações de estresse como variações bruscas de temperatura e concentração de oxigênio na água, que afetam seu metabolismo e, conseqüentemente, comprometem sua imunidade (BRANDÃO, 2004). Além disso, a alta suscetibilidade dos juvenis de jundiá à ictiofíriase (Figura 1), principalmente no primeiro mês de vida, tem acarretado grandes perdas e prejudicado grandemente a produção de alevinos (PEREIRA JR. et al., 2006; BORBA, 2007).



Figura 1 – Alevinos de *Rhamdia quelen* infestados por *Ichthyophthirius multifiliis*.

O parasito

O protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, primeiramente descrito em 1876 por Fouquet na França, pertence ao filo Ciliophora, classe Oligohymenophorea, subordem Ophryoglenina e família Ichthyophthiriidae. Este protozoário, mais comumente conhecido como ictio, é um dos mais importantes parasitos patogênicos no cultivo de peixes de água doce, não apresenta especificidade parasitária e tem distribuição mundial. Infestações por ictio têm grande repercussão econômica, causando perdas consideráveis na piscicultura continental em diversas regiões do mundo (HINES e SPIRA, 1973; WAHLI et al., 1986; BUCHMANN e NIELSEN, 1999; BORBA, 2005). A tradução do nome científico *I. multifiliis* é “piolho de peixe com numerosa progênie”, referindo-se a sua rápida capacidade reprodutiva (BUCHMANN et al., 2001). O ictio apresenta ciclo de vida direto (Figura 2), que se subdivide em três estágios distintos: (1) teronte, forma infestante ciliada de natação livre, com formato piriforme, comprimento de 30 a 50 μm e provido de *perforatorium* apical; (2) trofozoíto, parasito adulto que se aloja e se alimenta da epiderme e do muco do hospedeiro, atingindo diâmetro de aproximadamente 1 mm; (3) tomonte, forma reprodutiva de vida livre coberta por um cisto gelatinoso que se adere ao substrato após deixar o hospedeiro. Entretanto, estudos por Ewing et al. (1988) sugerem a ocorrência de reprodução no epitélio do hospedeiro por fissão binária do trofozoíto. Segundo Cross (1994), a duração do ciclo de vida depende da temperatura da água, por exemplo, a 20°C o trofozoíto deixa o hospedeiro após 5 ou 7 dias de crescimento, encista-se em 1 h, reproduz-se por mitose durante 24 h e os terontes emergem e infestam novos hospedeiros dentro das 24 h seguintes. A temperatura ótima para o desenvolvimento do ictio está entre 24 e 26°C, quando os terontes eclodem em 17-18 h e podem sobreviver por aproximadamente 48 h até encontrarem um hospedeiro. Contudo, o protozoário resiste a temperaturas tão baixas quanto 5 °C, quando o processo de reprodução dos tomontes pode durar até 9 dias. A 12 °C, os terontes eclodem em 36 h e o período de permanência no hospedeiro pode ser de 10 a 12 dias (BUCHMANN et al., 2003). Assim, quanto mais rápido o ciclo, maior a intensidade de infestação e a mortalidade do hospedeiro.

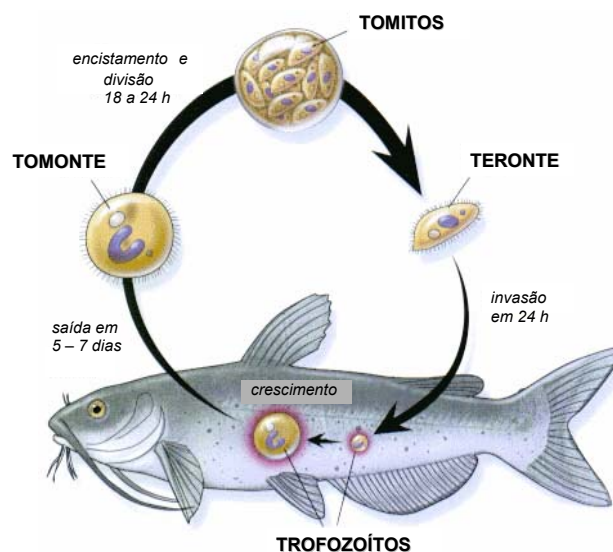
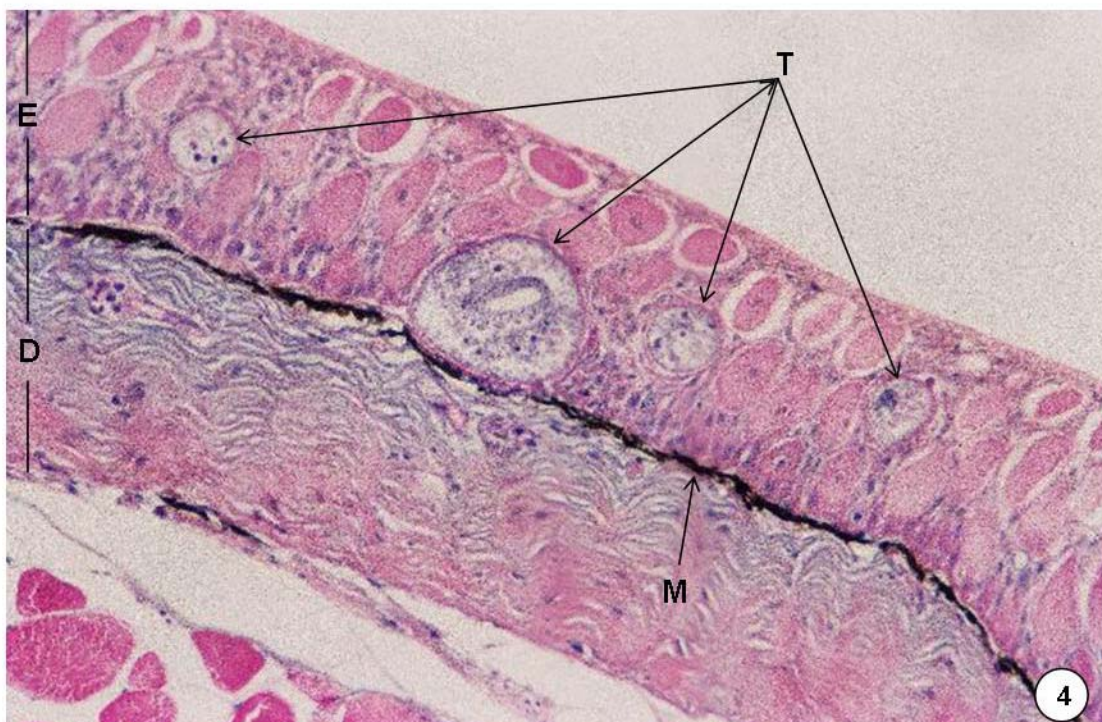
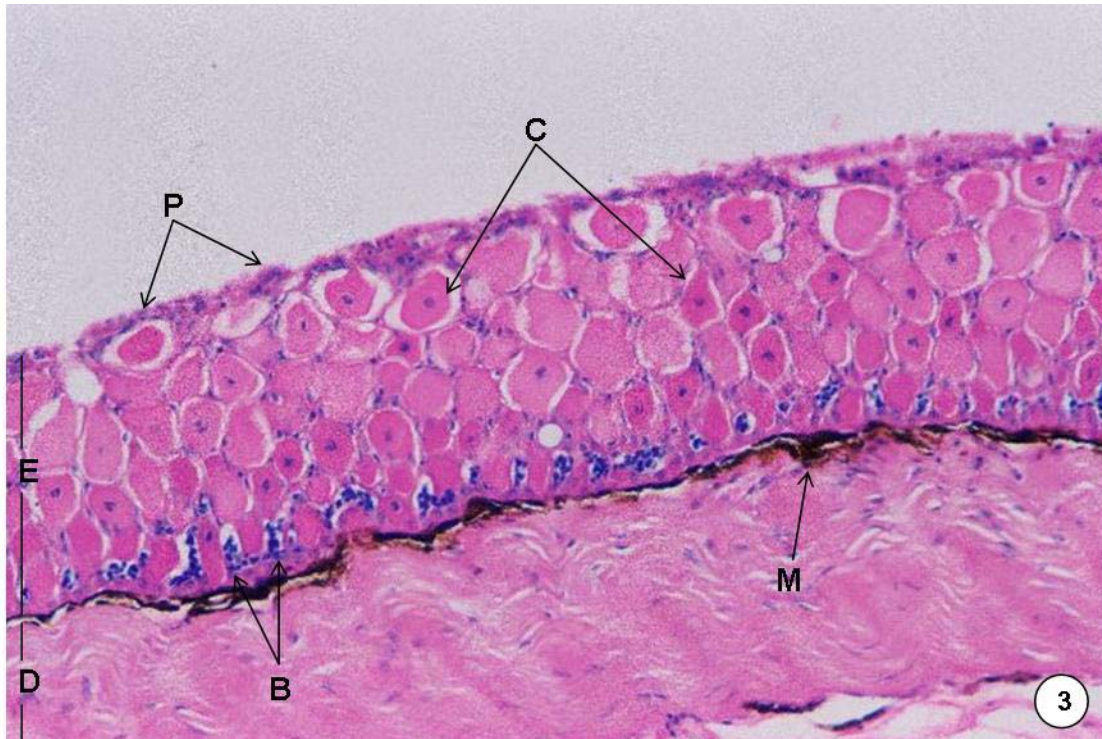


Figura 2 – Ciclo de vida de *Ichthyophthirius multifiliis* a 20 °C (Adaptado de Cross, 1994; Dickerson e Clark, 1998).

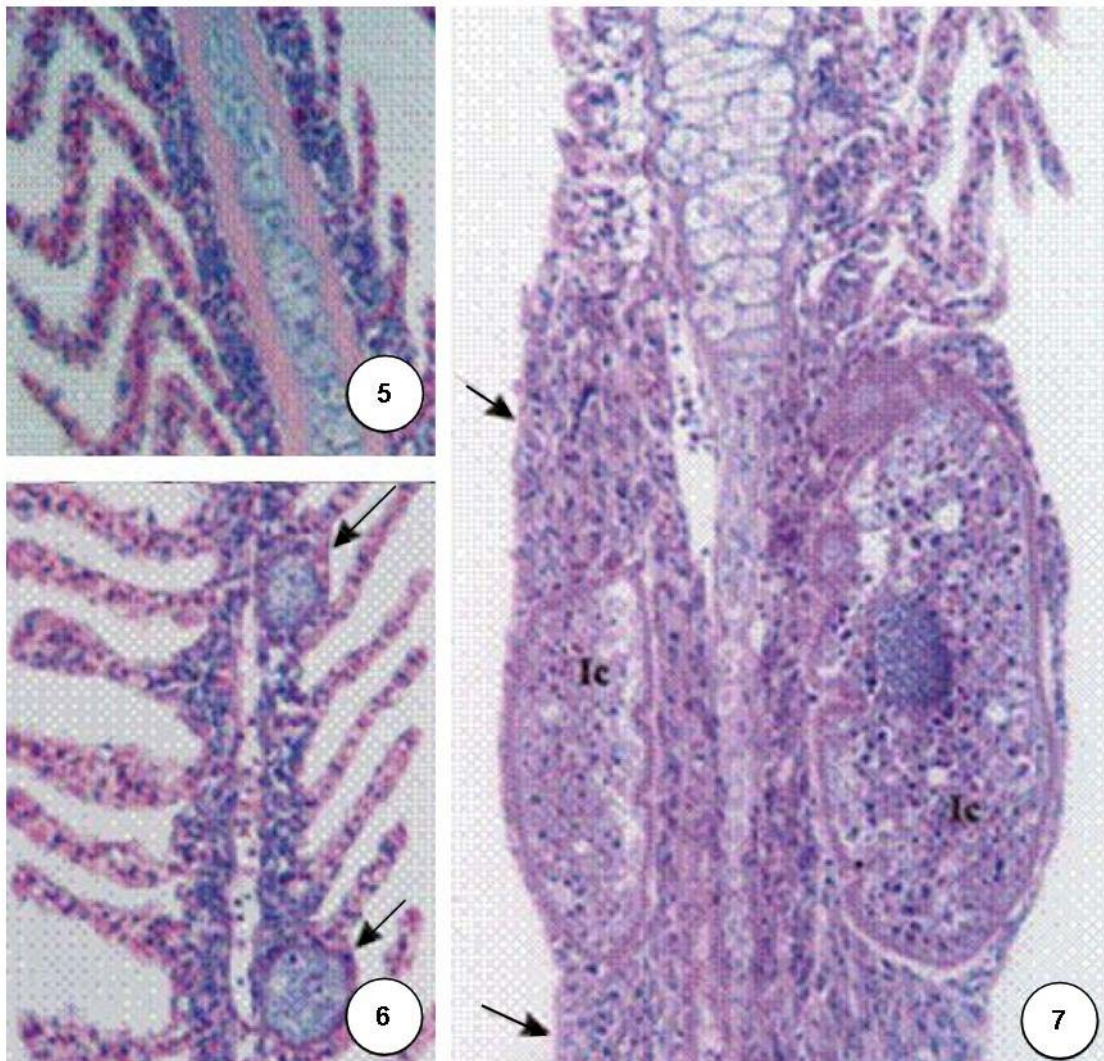
Os terontes invadem o epitélio do corpo, da boca, das cavidades nasais e das brânquias dos peixes, perturbando suas funções de respiração e excreção (HINES e SPIRA, 1973; VENTURA e PAPERNA, 1985; EWING e KOCAN, 1992). O encontro parasita-hospedeiro ocorre ao acaso e o teronte penetra o epitélio das brânquias e do corpo do hospedeiro, por entre as células superficiais do muco, através do movimento ciliar (BUCHMANN e NIELSEN, 1999; BUCHMANN et al., 2001). Porém, segundo Haas et al. (1999), quando estão próximos do peixe hospedeiro, por quimiotaxia do muco, os terontes são atraídos por glicoproteínas ou repelidos por substâncias glico-conjugadas. Durante a invasão do epitélio do hospedeiro, após passar por entre as células do muco, pode haver também rompimento de células epiteliais e conseqüente necrose focal associada à porção anterior do ciliado (EWING et al., 1985). Cerca de 5 minutos após a invasão, os terontes migram rapidamente através do epitélio e se estabelecem próximo à membrana basal, no limite entre a epiderme e a derme (EWING et al., 1985; CROSS, 1994; BUCHMANN et al., 2001; BORBA, 2005). Nos 40 minutos seguintes, os agora trofozoítos se alimentam dos restos das células rompidas durante a invasão e são cobertos por uma nova camada epitelial (EWING et al., 1985) (Figuras 4, 6 e 7). Assim, os trofozoítos ficam protegidos e, à medida que crescem, tornam-se visíveis na superfície do hospedeiro como pontos brancos, justificando a denominação da doença, que além do nome ictioftiríase, é conhecida como “doença dos pontos brancos”.

Lesões observadas na hipoderme em infestação severas por ictio não podem ser causadas diretamente pelo protozoário, já que este não invade as camadas subjacentes à membrana basal, mas possivelmente por inflamação edematosa no *stratum spongiosum* da derme devido à movimentação e quantidade de trofozoítos (HINES e SPIRA, 1974a).



Figuras 3 e 4 – Fotomicrografias da pele de jundiá *Rhamdia quelen* (Bouin, HE, 200×). **3.** Epitélio normal, células da epiderme organizadas. **4.** Epitélio infestado por trofozoítos (T) de *Ichthyophthirius multifiliis* alojado no limite entre epiderme e derme, não ultrapassando a membrana basal, e causando desorganização das células da derme. (E) epiderme, (D) derme, (P) células pavimentosas superficiais, (C) células-clava, (B) células basais e (M) melanócitos. (Reprodução com permissão de BORBA, 2005).

A hiperplasia que ocorre nos tecidos (Figuras 6 e 7), ao invés de impedir o desenvolvimento do protozoário, parece fornecer camadas epiteliais que promovem sua sobrevivência e debilitam o hospedeiro, afetando a osmorregulação e, nas brânquias, diminuindo a área superficial e dificultando a respiração (HINES e SPIRA, 1974b; BORBA, 2005). Segundo Ewing e Kocan (1987), muitos dos terontes que invadem as brânquias se alojam próximo a veias, principalmente a veia aferente, possivelmente porque ocorrerá redução da tensão do oxigênio em peixes moribundos e sinalizará ao trofozoíto o momento de abandonar o hospedeiro.



Figuras 5, 6 e 7 – Fotomicrografias da brânquia de jundiás *Rhamdia quelen*. 5. Brânquias normais, sem infestação (Bouin, HE, 200×). 6. Trofozoítos em fase inicial (setas) na base das lamelas secundárias causando hiperplasia e diminuição do espaço interlamelar (Bouin, HE, 200×). 7. Trofozoítos (Ic) no epitélio branquial, causando severa hiperplasia e fusão das lamelas secundárias (setas) (Bouin, HE, 200×). (Reprodução com permissão de BORBA, 2005).

Formas de controle

Na tentativa de diminuir a mortalidade e perdas massivas na produção de alevinos, piscicultores aplicavam verde de malaquita nos viveiros para controle do ictio com relativo sucesso (FRACALOSSO et al., 2003). Porém, o uso do produto em peixes para consumo humano foi proibido por ser considerado carcinogênico e mutagênico (WAHLI et al., 1986). Outros tratamentos químicos têm sido utilizados como formalina, sulfato de cobre e permanganato de potássio, mas com baixa eficiência. Percarbonato de sódio e extrato de alho, substâncias menos impactantes ao ambiente e ao peixe, foram testadas *in vitro* em terontes e tomontes com sucesso (BUCHMANN et al., 2003). Entretanto, não há estudos *in vivo* que comprovem a eficácia destes compostos no controle do ictio. Ainda, para utilização destes produtos em campo, a quantidade de alho necessária seria proibitiva e a tolerância ao percarbonato de sódio deveria ser testada para cada espécie de peixe (BUCHMANN et al., 2003). Ainda não se conhece um medicamento que possa ser administrado via oral (ração) com eficiência (TOJO e SANTAMARINA, 2001). A suplementação de até 6% de sal (NaCl) na ração também não foi eficiente para controlar o ictio (GARCIA et al., 2007). Já o aumento da salinidade para 8 ‰ e da temperatura da água de cultivo para 32 °C por 7 dias foram eficazes no controle da infestação em condições laboratoriais, mas, em situações práticas de campo essas formas de controle não são viáveis (FRACALOSSO et al., 2003). Além disso, tratamentos com produtos químicos em viveiros demandam mão-de-obra, aumentam os custos e estressam os peixes, muitas vezes inviabilizando-os técnica e economicamente (KIM e CHOI, 1998). Devido a essas dificuldades, a administração de produtos parasiticidas naturais por meio da suplementação em rações seria muito mais conveniente e segura para todos.

A suplementação pode ter como objetivo a estimulação do sistema imunológico dos peixes contra patógenos, por exemplo, como a vitamina C e os prebióticos. A vitamina C tem sido adicionada nas rações em estudos de métodos profiláticos contra doenças, mas os resultados ainda são variáveis quanto à eficácia. Por exemplo, alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, alimentados com 500 mg vitamina C kg⁻¹ ração durante 12 semanas apresentaram menor infestação por parasitas monogenéticos quando comparados ao tratamento alimentado com ração isenta de vitamina C (FUJIMOTO e CARNEIRO, 2001); a truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* apresentou diminuição na mortalidade por ictiofitiríase quando alimentada durante 8 semanas com rações suplementadas com 2000 a 5000 mg vitamina C kg⁻¹ (WAHLI et al., 1986; WAHLI et al., 1995). Entretanto, resistência a desafio com *Edwardsiella ictaluri* não foi observada em bagre americano *Ictalurus punctatus* alimentado durante 8 semanas com níveis de 100 a 2000 mg vitamina C kg⁻¹ ração em laboratório (LI et al., 1993). Também não houve diferença quanto à infestação por *I. multifiliis* em jundiá *R. quelen* alimentados durante 45 e 60 dias com ração suplementada com 1233 mg vitamina C kg⁻¹ (BORBA, 2007). O efeito imunoestimulatório de prebióticos, principalmente (β-1,3 e β-1,6) glucanos de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* tem sido estudado para profilaxia de doenças, mas os resultados dependem da dose do produto e do tempo de administração (SAKAI, 1999; BAGNI et al., 2005).

Por outro lado, a suplementação pode ser de um composto que atue diretamente sobre o parasito, como é o caso de ácidos graxos de alguns óleos essenciais (HIRAZAWA et al., 2000). A atividade antimicrobiana de ácidos graxos é conhecida há muitos anos (HASSINEN et al., 1951).

Segundo Nieman (1954), os ácidos graxos de cadeia média, com cerca de doze carbonos, são mais ativos do que os de cadeia curta ou longa, os ácidos graxos insaturados têm ação inibitória maior que ácidos graxos saturados e bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis do que as Gram-negativas à ação dos ácidos graxos. Ácidos graxos insaturados de cadeia longa (C18:1, C18:2, C18:3), presentes na fração lipídica do leite materno, são responsáveis pelo combate ao protozoário *Giardia lamblia* em lactentes por meio da interação com os lipídios da membrana do organismo unicelular, alterando sua permeabilidade (ROHRER et al., 1986). Ácidos graxos saturados de cadeia média, com 8 a 12 carbonos, também apresentaram atividade larvicida *in vitro* contra larvas do nematóide *Toxocara canis*, transmitido de cães e gatos para humanos (KIUCHI et al., 1987). Ácidos graxos de cadeia média, principalmente o ácido cáprico (C10:0), na forma de sais de cálcio e triacilglicerol, foram eficientes na defaunação de protozoários do rúmen de caprinos (MATSUMOTO et al., 1991). Estudando a ação bactericida de ácidos graxos de 2 a 18 carbonos, Marounek et al. (2003) concluíram que o ácido caprílico (C8:0) foi o mais eficiente, seguido pelo ácido cáprico (C10:0), em inibir o metabolismo de glicose de *Escherichia coli* e, conseqüentemente, seu crescimento. O ácido caprílico, um ácido graxo saturado com oito átomos de carbono, está presente em óleos de coco, palma e babaçu, e na porção lipídica do leite (GURR e HARWOOD, 1991). Apesar do mecanismo de ação dos ácidos graxos no controle de microorganismos não ser totalmente conhecido, algumas das teorias propostas são de que os ácidos graxos (i) são adsorvidos na superfície celular bacteriana, (ii) induzem a lise celular (MATSUMOTO et al., 1991) e (iii) facilitam o transporte de prótons pela membrana destruindo, assim, o gradiente de prótons e causando a morte celular (LAI et al., 1977).

Em peixes, o primeiro relato da eficiência de ácidos graxos no controle de larvas de *Heterobothrium okamotoi* (Monogenea) em fuga *Takifugu rubripes* foi feito por HIRAZAWA et al. (2000), que testaram *in vitro* e *in vivo* quatro agentes naturais (ácido caprílico, óleo de laranja, óleo de menta e óleo de canela), dentre os quais o ácido caprílico foi o mais eficaz. O ácido caprílico também foi eficiente em testes *in vitro* contra outros parasitos ciliados e mixosporídios (HIRAZAWA et al., 2001a). Em estudos subseqüentes, o ácido caprílico foi mais eficiente contra terontes de *Cryptocaryon irritans* do que os outros ácidos graxos testados (C2:0 a C10:0) *in vitro* e sua adição à ração também foi eficaz contra o parasito em pargo *Pagrus major* (HIRAZAWA et al., 2001b). *Cryptocaryon irritans* (Brown 1951) é um protozoário ciliado marinho semelhante ao *I. multifiliis*, com ciclo de vida direto, que também apresenta os estágios de teronte, tomonte e trofozoíto. Os terontes emergem dos cistos (3 a 28 dias para reprodução mitótica e eclosão no oitavo dia, a 24-27 °C), penetram o epitélio do hospedeiro e os trofozoítos se alojam próximo à membrana basal da pele e das brânquias, onde permanecem por 5 a 7 dias a 25 °C; trofozoítos maduros abandonam o hospedeiro na forma de tomonte e secretam um cisto. A temperatura também influencia o crescimento e desenvolvimento de *C. irritans*, sendo o intervalo ideal entre 23 °C e 30 °C (YOSHINAGA e DICKERSON, 1994).

Hirazawa et al. (2001b) controlaram a infestação de *C. irritans* com ácido caprílico (1mM) em ensaios a 17 °C e sugerem que, em temperaturas maiores, concentrações maiores de ácido caprílico sejam testadas para verificar sua eficiência. Além das concentrações, outro fator importante é o período de alimentação, isto é, a profilaxia dos jundiás contra o ictio deve ocorrer no período de um

mês, quando os alevinos são comercializados e transferidos para viveiros de engorda. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, em condições laboratoriais, a influência da alimentação de juvenis de jundiá *Rhamdia quelen* durante um mês com rações suplementadas com concentrações crescentes de ácido caprílico sobre ganho em peso e, após sofrerem infestação experimental por ictio *Ichthyophthirius multifiliis*, a intensidade de infestação e sobrevivência.

O artigo científico que segue será submetido para publicação no Journal of Fish Diseases, Blackwell Publishing, Reino Unido. Desta forma, sua redação obedece às normas deste periódico, que estão detalhadas em anexo.

Influência do ácido caprílico na dieta contra infestação de *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá *Rhamdia quelen*

F A Yasumaru¹, D M Fracalossi¹, S R Baggio², C M R Melo³ e M R Borba⁴

¹ Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce, Departamento de Aqüicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

² Instituto de Tecnologia de Alimentos, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (ITAL).

³ Departamento de Aqüicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

⁴ Estação de Maricultura, Departamento de Oceanografia, Fundação Universitária Rio Grande (FURG)

Autor para correspondência: Dra Débora M. Fracalossi (Rodovia Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, Florianópolis, 88034-000, Santa Catarina, Brasil). E-mail: deboraf@cca.ufsc.br

Ictio e ácido caprílico

Resumo

Evidências na literatura demonstram a eficiência do ácido caprílico (C8:0) no controle de protozoários parasitos. Este estudo avaliou a influência da suplementação de C8:0 na ração sobre a infestação, sobrevivência e ganho em peso de jundiá *Rhamdia quelen* experimentalmente infestados por *Ichthyophthirius multifiliis*. Um ensaio Piloto de 45 dias e um Experimento de 35 dias foram realizados com suplementação de C8:0 nas concentrações de 1,25, 2,5, 5,0, 7,5, 10 e 12,5 g kg⁻¹ e 0,5, 1,1, 2,0, 3,0, 4,5; 5,2 g kg⁻¹, respectivamente. Em seguida, os peixes foram infestados com 755 e 140 terontes peixe⁻¹, respectivamente. Não houve diferença no ganho em peso e na intensidade de infestação entre as doses nos dois ensaios ($p > 0,05$). No Piloto, peixes suplementados com 7,5 g kg⁻¹ apresentaram a menor mortalidade (5,56%) até o dia 13 pós-infestação (PI). No Experimento, peixes suplementados com 4,5 g kg⁻¹ apresentaram a menor mortalidade acumulada (3,23%) até o dia 11 PI. Entretanto, apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas na intensidade de infestação e na mortalidade entre as doses de C8:0 testadas, houve tendência de diminuição desses parâmetros em algumas concentrações, sugerindo que estudos futuros sejam realizados com ajustes no protocolo de infestação para diminuir as variações.

Palavras-chave: *Rhamdia quelen*, *Ichthyophthirius multifiliis*, ácido caprílico, piscicultura, ácidos graxos.

Introdução

O cultivo de jundiá *Rhamdia quelen* tem aumentando na região Sul do Brasil por apresentar características favoráveis à aqüicultura (Fracalossi, Zaniboni Filho & Meurer 2002; Baldisserotto & Radünz Neto 2004). Das 19.000 ton produzidas pela aqüicultura de água doce no estado de Santa Catarina, 219,3 ton foram de jundiá (EPAGRI/CEPA 2005). Porém, a alta susceptibilidade à ictiofíriase, principalmente nos primeiros meses de vida, acarreta grandes perdas aos produtores de alevinos e representa um dos maiores entraves à produção comercial (Borba, Fracalossi & Freitas 2007).

A ictiofíriase é causada pelo protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet 1876), muito comum na piscicultura continental. Este protozoário não apresenta especificidade parasitária, tem distribuição mundial e causa perdas consideráveis em diversas regiões do mundo. Seu ciclo de vida é direto, subdividindo-se em três estágios distintos: (1) teronte, forma infestante; (2) trofozoíto, forma parasita e (3) tomonete, forma reprodutiva. Segundo Cross (1994), a duração do ciclo de vida depende da temperatura da água, sendo 24 a 26°C a faixa ideal. O encontro parasita-hospedeiro ocorre ao acaso e o teronte penetra o epitélio do hospedeiro (brânquias e corpo), estabelecendo-se entre a epiderme e a derme, não penetrando além da membrana basal (Buchmann, Sigh, Nielsen & Dalgaard 2001). Contudo, segundo Haas, Haberl, Hofmann, Kerschensteiner & Ketzer (1999), quando estão próximos do peixe hospedeiro, por quimiotaxia do muco, os terontes são atraídos por glicoproteínas ou repelidos por substâncias glico-conjugadas. Durante a invasão do epitélio do hospedeiro, pode haver também rompimento de células epiteliais e conseqüente necrose focal associada à porção anterior do ciliado (Ewing, Kocan & Ewing 1985). Após a invasão, os terontes são cobertos por uma camada epitelial que os engloba e eles ficam visíveis na superfície do peixe infestado como pontos brancos, daí a ictiofíriase também ser conhecida como a “doença dos pontos brancos”.

O tratamento das infestações era feito com aplicações de verde de malaquita com relativo sucesso, entretanto, seu uso foi proibido por ser carcinogênico, mutagênico e teratogênico (Wahli, Meier & Pfister 1986). São utilizados outros produtos químicos como a formalina, o sulfato de cobre e o permanganato de potássio, além de alternativas como o uso de sal e elevação da temperatura da água de cultivo em laboratório (Fracalossi, Azevedo & Meyer 2003), mas com difícil aplicabilidade em campo. Devido a essas dificuldades, a adição de produtos à ração com ação imunoestimulante ou parasiticida seria mais conveniente e segura para o peixe, o consumidor e o ambiente. Dentre estes produtos estão o ácido ascórbico (Wahli et al. 1986; Wahli, Frischknecht, Schmitt, Gabaudan, Verlhac & Meier 1995; Borba et al. 2007) e os prebióticos (Sakai 1999; Bagni, Romano, Finioia, Abelli, Scapigliati, Tiscar, Sarti & Marino 2005) como imunoestimulantes e os ácidos graxos como agentes diretos.

A atividade antimicrobiana dos ácidos graxos é conhecida há muitos anos (Hassinen, Durbin & Bernhart 1951; Nieman 1954; Rohrer, Winterhalter, Eckert & Köhler 1986; Kiuchi, Miyashita, Tsuda, Kondo & Yoshimura 1987). Ácidos graxos de cadeia média, principalmente o ácido cáprico (C10:0) e seus derivados foram eficientes na eliminação de protozoários do rúmen de caprinos (Matsumoto, Kobayashi, Takenaka & Itabashi 1991).

Em peixes, o primeiro relato da eficiência de ácidos graxos com efeito anti-helmíntico foi feito por Hirazawa, Ohtaka & Hata (2000) estudando agentes naturais, dentre eles o ácido caprílico, um ácido graxo de cadeia média. Em estudos *in vitro*, o ácido caprílico também foi eficiente contra oncomiracídeos e adultos do monogenético *Benedenia seriolae*, esporos do mixosporídeo *Kudoa shiomitsui* e terontes do ciliado *Cryptocaryon irritans* (Hirazawa, Oshima & Hata 2001b). Em ensaios alimentares, o ácido caprílico também mostrou ser eficiente contra o monogenético *Heterobothrium okamotoi* (Hirazawa, Oshima, Mitsuboshi & Hata 2001a) e *C. irritans* à temperatura de 17 °C (Hirazawa, Oshima, Hara, Mitsuboshi & Hata 2001c).

Entretanto, Hirazawa et al. (2001c) sugerem que, acima de 17 °C, doses de ácido caprílico maiores do que a aplicada ($2,5 \text{ g kg}^{-1} \text{ ração dia}^{-1}$) sejam testadas para verificar sua eficiência. Além disso, a suplementação deverá ser profilática em um mês, quando os alevinos são comercializados. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, em condições laboratoriais, a influência da alimentação de juvenis de jundiá com ração suplementada com ácido caprílico durante um mês sobre a sobrevivência e a intensidade de infestação por *Ichthyophthirius multifiliis*.

Materiais e métodos

Um experimento Piloto foi realizado em quadruplicata, utilizando 14 peixes por unidade experimental antes do Experimento propriamente dito, que foi realizado utilizando 20 peixes por unidade experimental e cinco repetições.

As dietas basais (Tabela 1) foram peletizadas e secas a 50 °C em estufa de ar forçado durante 12 h e armazenadas a -20 °C até o uso. Estas dietas foram oferecidas até saciedade aparente durante os períodos de aclimação para determinação da taxa de arraçoamento diário, que resultou em 4% da biomassa. A composição centesimal das dietas foi determinada de acordo com procedimentos padronizados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1999).

Tabela 1 – Formulação e composição centesimal das dietas basais.

Ingredientes	Quantidade (%)	
	Piloto	Experimento
Farinha de peixe ¹	47,00	41,00
Farelo de soja	20,00	23,00
Protenose	-	14,20
Farelo de milho	17,34	13,00
Quirera de arroz	12,40	5,80
Óleo de fígado de bacalhau ²	1,42	1,30
Óleo de soja	1,24	1,10
Premix vitamínico-mineral ³	0,60	0,60
Vitamina C ⁴	0,07	0,07
<i>Composição centesimal (% na matéria seca)</i>		
Matéria seca	94,44	95,29
Proteína bruta	44,25	43,83
Lipídios totais	10,30	10,98
Extrato não-nitrogenado	26,97	22,82
Fibra bruta	4,04	3,88
Cinzas	8,88	13,78

¹ Piloto - Coresa (Chile). Matéria seca: 89,30%, proteína bruta: 69,01%, cinzas: 15,82%; Experimento – Nicoluzzi Rações Ltda (Penha, Brasil). Matéria seca: 94,91%, proteína bruta: 54,16%, lipídios totais: 16,54%, cinzas: 27,36%.

² Delaware LTDA (Porto Alegre, Brasil).

³ DSM Produtos Nutricionais Brasil (São Paulo, Brasil). Composição por kg do produto: vitamina A: 2.500.000 UI; vitamina D3: 625.000 UI; vitamina E: 12.500 UI; vitamina K3: 375 mg; vitamina B1: 500 mg; vitamina B2: 1.500 mg; vitamina B6: 750 mg; vitamina B12: 7.500 µg; niacina: 7.500 mg; ácido pantotênico: 3.000 mg; biotina: 75 mg; ácido fólico: 1.000 mg; colina: 75.000 mg; ferro: 25.000 mg; cobre: 12.500 mg; zinco: 25.000 mg; manganês: 12.500 mg; selênio: 75 mg; iodo: 375 mg e cobalto: 200 mg.

⁴ DSM Produtos Nutricionais Brasil (São Paulo, Brasil). Rovimix Stay-C 35 (L-ácido ascórbico-2-monofosfato).

Piloto

Peixes

Os juvenis de jundiá foram obtidos por desova induzida e a larvicultura realizada em laboratório. Durante a primeira semana após a eclosão, as larvas foram alimentadas com náuplios de *Artemia* sp., com substituição gradual para dieta artificial fabricada no laboratório (46,83% proteína bruta). Grupos de 14 peixes com peso médio de $1,06 \pm 0,07$ g foram distribuídos em cada uma das 28 unidades experimentais de 16 L, as quais eram ligadas a um sistema de recirculação de água com temperatura controlada a $32 \pm 1,58$ °C para evitar infestação por ictio (Fracalossi et al. 2003). Durante os quinze dias de aclimatação para o início do ensaio, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração fabricada em laboratório (Tabela 1) até saciedade aparente e as fezes e restos de ração, sifonados antes da primeira alimentação.

Alimentação e infestação experimental

As menores concentrações de ácido caprílico tiveram como base os valores utilizados por Hirazawa et al. (2001c) contra *C. irritans*. Assim, no presente estudo, foram testadas sete concentrações de ácido caprílico: 0 (controle), 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10; e 12,5 g kg⁻¹ de ração. Para incorporação na dieta basal (Tabela 1), cada volume de ácido caprílico (na forma de ácido graxo livre) foi diluído em álcool etílico comercial, na proporção de 100 mL kg⁻¹ de ração e a solução foi borrifada sobre as rações moídas (1 a 1,4 mm). As rações foram secas em estufa a 50 °C durante 2 h e armazenadas em frascos plásticos em freezer a -20°C até o uso. Cada uma das dietas experimentais foi fornecida aleatoriamente a quatro grupos de 14 peixes durante 45 dias. Terminado o período de alimentação, os peixes de cada unidade experimental foram pesados em conjunto para determinação do ganho em peso e devolvidos às respectivas unidades experimentais para a infestação experimental.

A infestação experimental foi feita 24 h após a pesagem dos peixes. O inóculo para infestação foi obtido de jundiás infestados com ictio, mantidos em aquário. Os trofozoítos destes peixes foram raspados da pele com lâmina de bisturi e coletados em placa de Petri com água do aquário. Em seguida, com auxílio de uma pipeta Pasteur, os trofozoítos foram coletados em um béquer de vidro com 350 mL de água desclorada. A solução foi incubada por aproximadamente 24 h até a eclosão dos terontes. Após eclosão, uma amostra de 2 mL da solução foi coletada para contagem dos terontes em câmara de Sedgwick-Rafter. Para imobilizar os terontes e facilitar a contagem foram adicionados 0,5 mL de formalina 4%. A concentração obtida para a infestação foi de 755 terontes peixe⁻¹. Para a infestação experimental, o volume das unidades experimentais foi reduzido para cerca de 2 L. Foi mantida aeração constante e os peixes foram expostos aos terontes por 2 h. Em seguida, o volume de água foi restabelecido, o sistema de recirculação desconectado para evitar contaminação entre as unidades experimentais e os filtros biológicos individuais, presentes nas unidades desde o início do experimento, foram acionados. Para cada dose testada, uma repetição foi mantida como controle negativo da infestação, ou seja, recebeu o mesmo manejo, mas não foi infestada com terontes. Durante o período de infestação, a temperatura da água das unidades experimentais ficou em $17,6 \pm 1,2$ °C. No dia 10 pós-infestação (PI), três peixes por unidade

experimental (n=12), inclusive aqueles dos controles negativos, foram sacrificados e fixados em formol 4% para determinação da intensidade média de infestação segundo Bush, Lafferty, Lotz & Shostak (1997). A contagem do número de trofozoítos por peixe foi feita sob microscópio estereoscópico (40×). A mortalidade foi registrada diariamente até o dia 19 PI. O experimento foi encerrado no dia 20 PI, quando não houve mais mortalidades e o número de peixes sobreviventes foi determinado.

Experimento

Peixes

Os juvenis de jundiá foram obtidos também por desova induzida e, durante a larvicultura, foram mantidos em sistema fechado com filtro biológico, água em salinidade 3 ‰ e temperatura constante de $26,4 \pm 0,4$ °C para evitar possível infestação por ictio antes do Experimento. A alimentação foi a mesma do Piloto (náuplios de *Artemia* sp. e transição para dieta artificial). Em seguida, grupos de 20 peixes ($0,71 \pm 0,07$ g) foram transferidos para cada uma das 35 unidades experimentais (40 L volume útil, sistema fechado com filtro biológico individual) mantidas à temperatura ambiente de $23,3 \pm 0,7$ °C. Os peixes foram aclimatados durante 25 dias antes do início do ensaio, quando a salinidade foi reduzida de 3 ‰ para 0 ‰ e os peixes foram alimentados uma vez ao dia à tarde com ração comercial (45% de proteína bruta) até saciedade aparente. As fezes foram sifonadas das unidades experimentais no período da manhã e o volume retirado foi repostado com água previamente desclorada.

Alimentação e infestação experimental

As doses de ácido caprílico (1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 12,5 g kg⁻¹ ração) foram incorporadas à dieta basal (Tabela 1) da mesma forma que no ensaio Piloto. Desta vez, entretanto, foi possível a determinação da concentração de ácido caprílico nas rações e constatou-se a perda de aproximadamente 60% deste. Portanto, as concentrações finais de ácido caprílico nas rações foram de 0; 0,5; 1,1; 2,0; 3,0; 4,5 e 5,2 g kg⁻¹. Os teores (%) de lipídios totais e de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, n-3 e n-6 foram de $10,67 \pm 0,25$; $3,05 \pm 0,22$; $3,19 \pm 0,05$; $3,46 \pm 0,05$; $1,50 \pm 0,02$ e $1,95 \pm 0,03$, respectivamente. Cada uma das dietas experimentais foi fornecida aleatoriamente a cinco grupos de 20 peixes durante 35 dias à taxa de 4% da biomassa.

Terminado o período de alimentação, os peixes de cada unidade experimental foram pesados em conjunto. Um *pool* de cinco peixes por tratamento foi amostrado e liofilizado para posterior determinação da composição em ácidos graxos. Para a infestação experimental, os demais peixes foram transferidos para unidades menores, contendo 2 L de água desclorada e aeração constante, onde foram expostos aos terontes (140 terontes peixe⁻¹) por 3 h. Os terontes foram obtidos da mesma forma que no Piloto. Para cada dose testada, uma repetição foi mantida como controle negativo da infestação. Após a infestação, os peixes foram devolvidos para as suas respectivas unidades experimentais juntamente com a água de infestação. No dia 5 PI, três peixes por unidade experimental (n=15) foram sacrificados, fixados em formol 4% e depois mantidos em álcool 70% para determinação da intensidade média de infestação (Bush et al. 1997). A contagem do número de

trofozoítos foi feita sob microscópio estereoscópico (40×). A mortalidade foi registrada diariamente até a sua totalidade no dia 19 PI.

Extração de lipídios e determinação da composição em ácidos graxos

Esta determinação foi possível apenas no Experimento e não estava disponível durante a realização do ensaio Piloto. Os peixes amostrados no Experimento (*pool* de cinco em cada tratamento) foram eviscerados, triturados e liofilizados. Em seguida, as massas liofilizadas de peixe foram trituradas em almofariz com pistilo, acondicionadas em potes plásticos à temperatura ambiente até análise.

A extração de lipídios dos peixes e das rações experimentais foi feita seguindo o método de Bligh & Dyer (1959). Para a determinação da composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa, foi feita transmetilação de acordo com o método de Hartman & Lago (1973), usando solução de cloreto de amônia e ácido sulfúrico em metanol como agente esterificante. A cromatografia gasosa foi realizada em um cromatógrafo gasoso Varian, modelo 3900, equipado com amostrador automático; injetor split, razão 75:1; coluna capilar Chrompack CP-SIL 88 (100 m × 0,25 mm d.i., 0,20 µm de filme); detector por ionização em chama (FID) e um integrador com o aplicativo STAR. A temperatura da coluna foi programada para: temperatura inicial 120 °C (5 min⁻¹), aquecimento de 120 a 220 °C (3 °C min⁻¹) e de 220 a 235 °C (1 °C min⁻¹), permanecendo na temperatura de 235 °C por 12 minutos. O gás de arraste foi o hidrogênio, numa vazão de 1 mL min⁻¹ e o gás “make-up”, nitrogênio a 30 mL min⁻¹. A temperatura do injetor foi de 270 °C, a temperatura do detector, 300 °C e o volume de injeção, 1 µL. A identificação dos ácidos graxos foi realizada por meio da comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras de tecido e de ração com os padrões. Foram utilizados 37 padrões de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (Supelco 37 Component FAME Mix). A quantificação dos ácidos graxos foi realizada por normalização de área e os resultados expressos em g 100 g⁻¹ de amostra.

Análise estatística

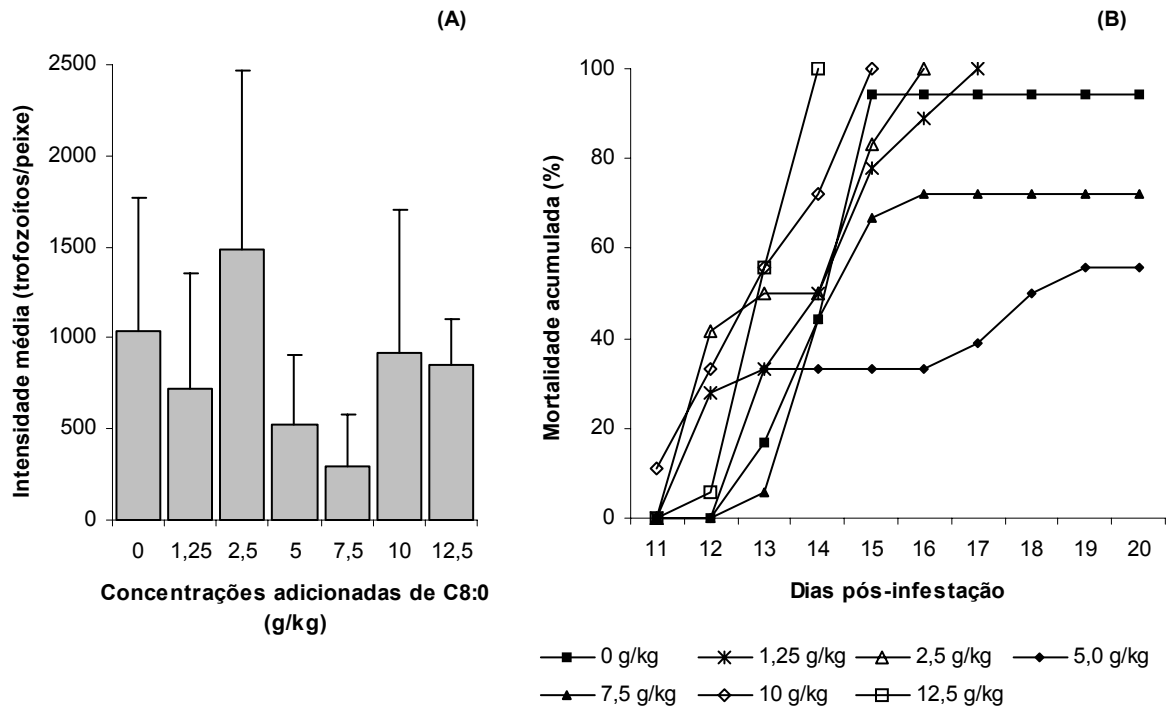
Para ambos os ensaios, os dados de ganho em peso, intensidade de infestação e mortalidade foram submetidos à análise de regressão polinomial. Contudo, para que as pressuposições fossem atendidas, os dados de intensidade de infestação foram transformados usando a função log₁₀. Os dados foram analisados usando o PROC REG do SAS (SAS/STAT software versão 9). O nível de significância adotado para verificar o ajuste dos modelos aos dados foi de 5%.

Resultados

O ganho em peso médio dos peixes no Piloto foi de $5,94 \pm 0,88$ g, após 45 dias de alimentação e temperatura média da água de $32 \pm 1,6$ °C, não havendo diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos. Durante a infestação experimental, as unidades experimentais foram desconectadas do sistema de recirculação e a temperatura da água caiu gradativamente para $17,6 \pm 1,2$ °C. Não foi possível a detecção de diferenças entre os tratamentos em relação à intensidade de infestação ou mortalidade devido à grande variação de respostas entre as unidades experimentais. Entretanto, houve uma tendência de menor infestação nos peixes alimentados com a concentração de $7,5$ g ácido caprílico kg^{-1} ($297 \pm 283,21$ trofozoítos peixe^{-1}) do que nas demais concentrações (Figura 1). Igualmente, apesar de não ser detectada diferença significativa, os peixes que receberam as concentrações de 5 e $7,5$ g ácido caprílico kg^{-1} ração apresentaram mortalidade de 56 e 72% , respectivamente, no dia 20 PI, enquanto que a mortalidade foi de 100% nos peixes que receberam as outras concentrações (Figura 1). Ainda, a mortalidade iniciou no dia 11 PI e os grupos suplementados com $12,5$; 10 ; $2,5$ e $1,25$ g ácido caprílico kg^{-1} ração acumularam 100% de mortalidade nos dias 14, 15, 16 e 17 PI, respectivamente.

No Experimento, o ganho em peso médio após 35 dias de alimentação à temperatura média da água de $23,3 \pm 0,7$ °C foi de $1,96 \pm 0,22$ g, não havendo diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$). Neste ensaio foi medida a composição, em % de lipídios totais e de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, n-3 e n-6 nos peixes, a qual foi de $12,66 \pm 1,19$; $3,80 \pm 0,31$; $4,01 \pm 0,43$; $3,67 \pm 0,33$; $1,64 \pm 0,14$ e $2,03 \pm 0,20$, respectivamente, refletindo a composição das rações. Entretanto, o ácido caprílico não foi detectado no tecido dos peixes, mesmo sendo utilizado padrão para tal. Como observado no Piloto, a intensidade de infestação não diferiu significativamente entre as concentrações de ácido caprílico testadas. Houve, entretanto, uma tendência à menor intensidade de infestação ($3 \pm 1,92$ trofozoítos peixe^{-1}) nos peixes que receberam a concentração de $3,0$ g ácido caprílico kg^{-1} de ração (Figura 1), bem como à menor mortalidade nos grupos suplementados com $0,5$ e $4,5$ g ácido caprílico kg^{-1} ração. A mortalidade iniciou no dia 10 PI e foi maior no dia 11 PI ($P < 0,05$). Não foi observada infestação nem mortalidade nos controles negativos de ambos os ensaios.

PILOTO



EXPERIMENTO

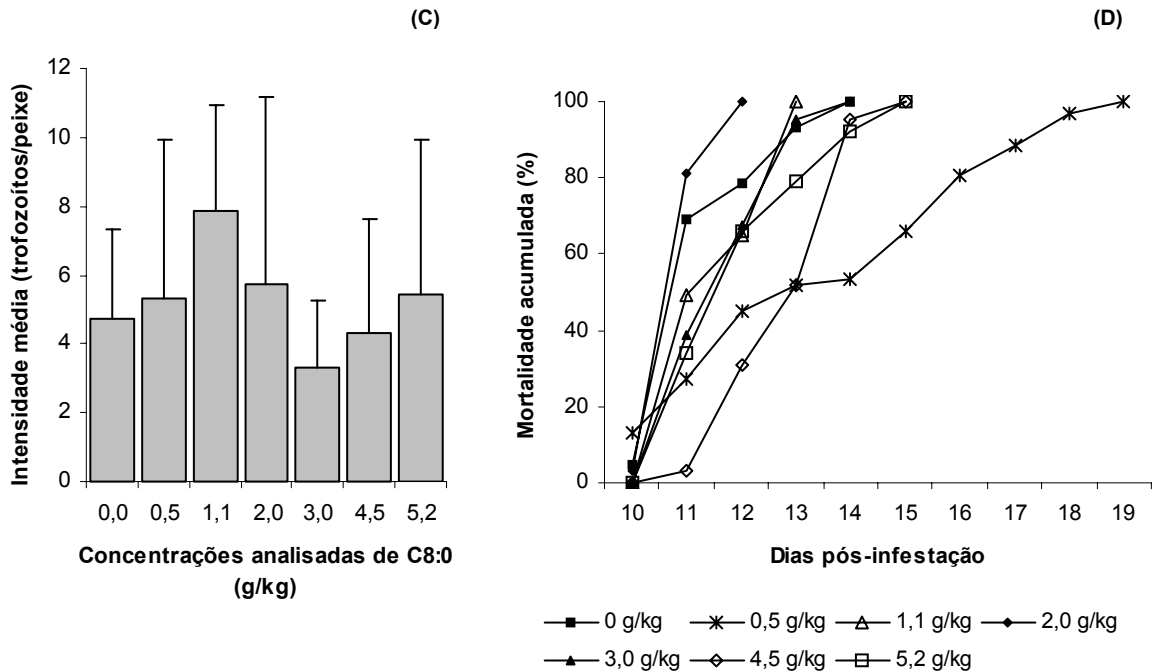


Figura 1 – Intensidade média de infestação de *Rhamdia quelen* após infestação experimental com *Ichthyophthirius multifiliis* no décimo dia pós-infestação no (A) Piloto (n=9) e no quinto dia pós-infestação no (C) Experimento (n=12). Mortalidade acumulada após infestação experimental por 20 dias no (B) Piloto e 19 dias no (D) Experimento. As barras verticais indicam desvio padrão.

Discussão

Um dos maiores entraves para o cultivo comercial de jundiás é a perda de alevinos causada por infestações com *I. multifiliis* durante o primeiro mês de vida. Tentativas de controle das infestações incluem a aplicação de produtos químicos nos viveiros, aumentando os custos de produção e os riscos ambientais. Assim, a administração oral de produtos naturais por meio da suplementação em rações é uma alternativa mais prática e de menor impacto ambiental. Dentre estes produtos estão os ácidos graxos, com destaque para os saturados de cadeia média (C6:0 a C12:0), havendo evidências do uso do ácido caprílico contra parasitos de peixes (Hirazawa et al. 2000, 2001a,b,c).

O ácido caprílico, um ácido graxo saturado presente em óleos vegetais (coco, babaçu) e em diversos tipos de leite, é um produto alimentício aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) como seguro (Generally Regarded as Safe, GRAS 184.1025) e estudos de toxicidade mostraram que não é tóxico mesmo em altas concentrações, com DL50 oral de 10,1 g kg⁻¹ em ratos (Jenner, Hagan, Taylor, Cook & Fitzhugh 1964). Apesar do mecanismo de ação da atividade bactericida ou parasiticida do ácido caprílico não ser conhecido, algumas teorias são propostas para explicar essa atividade dos ácidos graxos. Uma delas é que os ácidos graxos são adsorvidos na superfície celular bacteriana e inibem o metabolismo de glicose e, conseqüentemente, impedem o seu crescimento, como visto por Marounek et al. (2003) no estudo com *Escherichia coli*. Outra linha de pensamento é que os ácidos graxos interagem com os lipídios da membrana dos organismos unicelulares e alteram sua permeabilidade (Rohrer et al. 1986; Matsumoto et al. 1991; Akao, Fukunaga, Kondo & Tsuda 1992). E também que os ácidos graxos facilitam o transporte de prótons através da membrana desses organismos unicelulares, destruindo o gradiente de prótons e alterando o pH intracelular, o que inativa as enzimas e induz à lise celular (Lai, Okuda & Takahashi 1977). Assim, a eficiência de ácidos graxos, inclusive o ácido caprílico, tem sido relatada na literatura contra diversos microrganismos, *in vitro* e *in vivo*, em mamíferos e em peixes.

No presente estudo, a suplementação de ácido caprílico na ração não influenciou o crescimento dos peixes, pois não foram detectadas diferenças de ganho em peso nos ensaios. Da mesma forma, estudo com coelhos alimentados com ração suplementada com triacilglicerol comercial de ácido caprílico e ácido cáprico (54% e 45%, respectivamente) na concentração de 10 g kg⁻¹ durante seis semanas verificou que a suplementação diminuiu a mortalidade sem afetar o crescimento, o consumo e o rendimento de carcaça (Skrivanova & Marounek 2006). Já Mustafá, Nakagawa, Nakagawa, Ohya, Shimizu, Horikawa & Yamamoto (1991) alimentaram juvenis de ayu *Plecoglossus altivelis* com ração suplementada com 6% TCM (triacilgliceróis de cadeia média, 58,1% ácido caprílico) por um período maior de 86 dias e obtiveram maior ganho em peso com menor deposição de gordura visceral. Por outro lado, juvenis de red drum *Sciaenops ocellatus* apresentaram ganho em peso reduzido quando alimentados por seis semanas com dietas suplementadas com 3 e 6% de tricaprilina (triacilglicerol de ácido caprílico, 98%) (Craig & Gatlin 1995). Da mesma forma, larvas de carpa comum *Cyprinus carpio* apresentaram maior mortalidade e menor ganho em peso quando alimentados com 10% de tricaprilina, provavelmente pela reduzida palatabilidade da dieta (Fontagné, Pruszyński, Corraze & Bergot 1999). Ainda, Matsumoto et al. (1991) observaram redução

no apetite de caprinos com a adição de ácidos graxos livres na dieta (ácido caprílico e ácido cáprico) por apenas 5 dias, mas não com seus respectivos triacilgliceróis. A diminuição na palatabilidade da dieta pode ter sido causada pelo odor destes ácidos graxos. No Experimento deste estudo também foi observada discreta diminuição do apetite nos grupos alimentados com a concentração mais alta de ácido caprílico ($0,52 \text{ g kg}^{-1}$), que foi adicionada na forma de ácido graxo livre, mas não houve redução no ganho em peso após os 35 dias de alimentação. Assim, a influência da suplementação de ácidos graxos de cadeia média no ganho em peso depende da idade do organismo, da forma e da concentração do produto e da duração do período de alimentação.

As concentrações de ácido caprílico adicionadas às rações dos ensaios deste estudo foram as mesmas, porém, as concentrações puderam ser aferidas apenas nas rações do Experimento. A análise das dietas do Experimento revelou reduções de aproximadamente 60% nas concentrações de ácido caprílico. As perdas provavelmente ocorreram durante a incorporação do produto, secagem e/ou armazenagem das rações, uma vez que se utilizou ácido caprílico na forma de ácido graxo livre ou não-esterificado. Esta forma é mais volátil (sendo responsável pelo forte odor do produto) do que a monocaprina, a tricaprilina (mono e triacilgliceróis de ácido caprílico, respectivamente) ou o triacilglicerol de ácido caprílico combinado com outros ácidos graxos de cadeia média (TCM). Como as concentrações de ácido caprílico não foram determinadas nas dietas do ensaio Piloto não se pode afirmar, mas possivelmente o nível de perdas foi o mesmo das dietas do Experimento. O padrão de comportamento dos grupos nos dois ensaios em relação à intensidade de infestação é semelhante (Figura 1), o que reforça esta hipótese.

Matsumoto et al. (1991) também testaram ácidos graxos livres em seu estudo de defaunação de protozoários do rúmen de caprinos e obtiveram resultados positivos. Provavelmente essa resposta positiva esteja associada à utilização de doses maiores de ácido caprílico e ácido cáprico (50 g kg^{-1}) naquele estudo, as quais permitiram uma concentração suficiente, mesmo considerando-se as perdas. Em estudos *in vitro*, em que foram testados os produtos da hidrólise de triacilgliceróis de cadeia média, o ácido láurico foi eficaz contra larvas do helminto *Toxocara canis* (Kiuchi et al. 1987) e o ácido caprílico, contra a bactéria intestinal *Escherichia coli* (Marounek et al. 2003) e as bactérias causadoras de mastite em ruminantes (Nair, Joy, Vasudevan, Hinckley, Hoagland & Venkitanarayanan 2005). O ácido caprílico na forma livre foi testado *in vitro* e *in vivo*, mostrando-se eficiente no controle de oncomiracidios do monogenético *Benedenia seriola*, esporos do mixosporídio *Kudoa shiomitsui* (Hirazawa et al. 2000) e larvas e oncomiracidios do monogenético *Heterobothrium okamotoi* (Hirazawa et al. 2001b), parasitos de peixes. Contudo, os estudos realizados *in vivo* com *Cryptocaryon irritans* em pargo *Pagrus major* mantido a $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$, o ácido caprílico diminuiu o número de parasitos, mas não a mortalidade, quando comparado à eficiência a $17 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Hirazawa et al. 2001c). Os autores sugerem que o ácido caprílico seja metabolizado mais rapidamente em peixes após administração oral quando a temperatura da água é maior e, assim, a ação parasiticida ter sido menor a $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do que a $17 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Contra *H. okamotoi* a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ foi necessária suplementação maior do que $5 \text{ g ácido caprílico kg}^{-1}$ ração para se obter algum efeito (Hirazawa et al. 2001b). No presente estudo, apesar de concentrações maiores do que $5,2 \text{ g kg}^{-1}$ não puderem ter

sido testadas devido à perda, as concentrações de 3,0 e 4,5 g kg⁻¹ mostraram algum efeito, mesmo não significativo, na diminuição da infestação e na mortalidade à temperatura de 23,3 ± 0,7 °C.

São necessários ainda estudos sobre a influência da suplementação de TCM nas rações de peixes no controle de parasitos. Em mamíferos, os triacilgliceróis de cadeia média (<12C) são metabolizados diferentemente dos de cadeia longa, i.e., são hidrolisados no trato digestório e transportados, como ácidos graxos livres, via veia porta, diretamente para o fígado para oxidação mitocondrial e utilização antes de serem armazenados nos tecidos (Bach & Babayan 1982; Gurr & Harwood 1991). Em peixes, os ácidos graxos livres com menos de dez carbonos, solúveis no plasma, são absorvidos pela mucosa intestinal e transportados diretamente para o fígado e distribuídos para os tecidos periféricos (Sheridan 1988). Em salmão do Atlântico *Salmo salar*, 94% do ácido caprílico (C8:0) e 70% do ácido cáprico (C10:0) são absorvidos na região pilórica e em menor proporção no estômago (Rosjo, Nordrum, Olli, Krogdahl, Ruyter & Holm 2000). Segundo Bach & Babayan (1982) uma pequena fração de ácidos graxos livres aparece, por pouco tempo, na circulação periférica de mamíferos. Baseando-se nessa hipótese, Hirazawa et al. (2000, 2001a,b,c) sugerem a ação direta do ácido caprílico administrado via oral sobre os parasitos nos peixes. Pode ocorrer hemorragia por rompimento dos capilares nas infestações por ictio e o trofozoíto se alimentar com as células sangüíneas, mostrando assim que o parasito entra em contato com a circulação periférica após a invasão (Ewing & Kocan 1992). Entretanto, estudos mais aprofundados sobre a cinética do ácido caprílico são necessários para que essa hipótese seja comprovada. De fato, Fontagné et al. (1999) encontraram pequena deposição de ácido caprílico (0,3% dos ácidos graxos totais) em larvas de carpa comum *Cyprinus carpio* alimentados com dieta suplementada com 10% de tricaprilina. No presente estudo, não foi possível detectar o ácido caprílico no tecido do jundiá provavelmente porque a suplementação foi baixa.

O Experimento foi realizado utilizando-se as mesmas concentrações de ácido caprílico suplementadas no Piloto, mas um número maior de peixes e de repetições por tratamento, no intuito de diminuir as variações nas respostas medidas (intensidade de infestação e mortalidade). Contudo, as grandes variações ainda persistiram e não possibilitaram a detecção de diferenças significativas nesses parâmetros entre as concentrações de ácido caprílico suplementadas. A grande variação ocorrida pode ter sido causada, em parte, por detalhes do protocolo de infestação. Primeiramente, o número de trofozoítos desalojados dos jundiás foi pequeno, resultando em baixas concentrações de terontes para infestação no Piloto e no Experimento (755 e 140 terontes peixe⁻¹, respectivamente), quando comparadas a concentrações utilizadas, por exemplo, por Wahli et al. (1995) de 9,6 × 10³ e 2 × 10⁴ terontes peixe⁻¹ ou por Tojo & Santamarina (2001) de 1000 a 2000 terontes peixe⁻¹. A baixa concentração pode ter resultado também em distribuição heterogênea de terontes entre as unidades experimentais, interferindo assim na intensidade da infestação. Ainda, o número de terontes depende do tamanho dos trofozoítos que, por sua vez, depende do tempo de residência do parasito no hospedeiro (Ewing & Kocan 1992). Assim, é recomendado um ensaio para determinar qual o melhor momento para obtenção de inóculo, por meio do monitoramento do intervalo de aparecimento dos pontos brancos e do tempo de residência destes no peixe. Além disso, a infestação foi feita individualmente, com a inoculação de terontes em cada unidade experimental. Qualquer variação na

concentração de terontes inoculada nas unidades experimentais pode ter contribuído para o aparecimento de diferenças na intensidade de infestação e mortalidade. Desta forma, para evitar diferenças na concentração do inóculo, recomenda-se que a infestação experimental seja realizada em um só tanque, com os peixes de cada unidade experimental agrupados em tanques-rede, por exemplo.

Além disso, o fato da intensidade de infestação ter sido determinada no dia 10 PI no Piloto pode ter influenciado também na grande variação dos resultados. Provavelmente, os valores não são da infestação inicial, mas de auto-infestações subseqüentes, pois mais de um ciclo do parasito pode ter se completado mesmo a $17,6 \pm 1,2$ °C, e o número de terontes ser muito maior do que o inoculado. Isso pode ser comprovado com o início da mortalidade no dia seguinte à amostragem. Já no Experimento, mesmo considerando a baixa concentração do inóculo, como a amostragem foi feita no dia 5 PI, a intensidade de infestação foi muito menor, provavelmente então sendo o primeiro ciclo, pois a mortalidade teve início no dia 10 PI. Mas, com o início da mortalidade, a reprodução e eclosão dos terontes são exponenciais e a mortalidade acumulada cresce rapidamente, dificultando a detecção de diferenças estatísticas. Assim, a auto-infestação em escala exponencial pode ter anulado a ação do ácido caprílico, como se vê nos grupos suplementados com 5 e 7,5 g kg⁻¹ no Piloto, que apresentaram tendência à menor infestação e menor mortalidade, mas diferença estatística com os demais grupos não pôde ser observada. Igualmente, no Experimento, os grupos suplementados com 3,0 e 4,5 g ácido caprílico kg⁻¹ ração tenderam à menor infestação e à menor mortalidade, respectivamente, embora também não tenham sido significativas. Já a mortalidade dos grupos alimentados com 0,5 g ácido caprílico kg⁻¹ ração deve ser resultado de erro de infestação, possivelmente a má distribuição do inóculo de terontes nas unidades experimentais. Assim, para estudos futuros, o protocolo experimental de infestação deverá ser ajustado para evitar essas grandes variações.

Neste estudo, a suplementação de diferentes concentrações de ácido caprílico na ração de jundiá não influenciou significativamente o ganho em peso, intensidade de infestação por *I. multifiliis* e mortalidade. Contudo, como observado por Hirazawa et al (2001b), a eficiência da suplementação de ácido caprílico na ração para controle de parasitos não é diretamente proporcional à concentração. Os resultados do presente estudo e o dos referidos autores parecem indicar que existe uma faixa de concentração em que a ação parasiticida é eficiente. Portanto, com o protocolo experimental devidamente ajustado, para evitar perdas e grandes variações, mais estudos devem ser realizados com este e outros ácidos graxos de cadeia média suplementados na ração para testar sua eficiência no controle de infestações por *I. multifiliis*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Bromatologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL – Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Campinas, SP) pelo apoio na determinação da composição em ácidos graxos, à CAPES pela bolsa de mestrado concedida a F A Yasumaru, ao CNPq pelo financiamento com recursos do projeto CNPq 474338/04-5 – Nutrição do Jundiá, e ao Prof. Dr. M L Martins pelos comentários no manuscrito.

Referências bibliográficas

- Akao N., Fukunaga M., Kondo K. & Tsuda Y. (1992) In vitro assessment of morbidity of *Toxocara canis* larvae using a dye exclusion assay. *Japanese Journal of Parasitology* **41**, 519-526.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1999) *Official methods of analysis of AOAC* (ed. by P. Cunniff), 16th edition, 1141p. AOAC, Washington DC.
- Bach A. C. & Babayan V. K. (1982) Medium-chain triglycerides: an update. *The American Journal of Clinical Nutrition* **36**, 950-962.
- Bagni M., Romano N., Finioia M.G., Abelli L., Scapigliati G., Tiscar P.G., Sarti M. & Marino G. (2005) Short- and long-term effects of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish and Shellfish Immunology* **18**, 311-325.
- Baldisserotto B. & Radünz Neto J. (2004) *Criação de Jundiá*. Ed. UFSM, Santa Maria, Brazil. 232p.
- Bligh E. G. & Dyer W. G. (1959) A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**, 911-917.
- Borba M.R., Fracalossi D. M. & Freitas F. A. (2007) Efeito da suplementação de vitamina C na dieta sobre a susceptibilidade de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*, ao *Ichthyophthirius multifiliis*. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. **9** (no prelo).
- Buchmann K., Sigh J., Nielsen C. V. & Dalgaard M. (2001) Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Parasitology* **100**, 105-116.
- Bush A. O., Lafferty K. D., Lotz J. M., Shostak A. W. (1997) Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *The Journal of Parasitology*, **83**, 575-583.
- Craig S. R. & Gatlin D. M. (1995) Coconut oil and beef tallow, but not tricaprilyn, can replace menhaden oil in the diet of red drum (*Sciaenops ocellatus*) without adversely affecting growth or fatty acid composition. *Journal of Nutrition* **125**, 3041-3048.
- Cross M. L. (1994) Localized cellular responses to *Ichthyophthirius multifiliis*: protection or pathogenesis? *Parasitology Today* **10**, 364-368.
- EPAGRI/CEPA (2005) *Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina*. Florianópolis: EPAGRI/Instituto Ceba **1**, 401 p.
- Ewing M. S., Kocan K. M. & Ewing S. A. (1985) *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) invasion of gill epithelium. *Journal of Protozoology* **32**, 305-310.
- Ewing M. S. & Kocan K. M. (1992) Invasion and development strategies of *Ichthyophthirius multifiliis*, a parasitic ciliate of fish. *Parasitology Today* **8**, 204-208.
- Fontagné S., Pruszunski T., Corraze G. & Bergot P. (1999) Effect of coconut oil and tricaprilyn vs. triolein on survival, growth and fatty acid composition of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* **179**, 241-251.
- Fracalossi D. M., Zaniboni Filho E. & Meurer S. (2002) No rasto das espécies nativas. *Panorama da Aqüicultura* **12**, 43-49.
- Fracalossi D.M., Azevedo T. M. P. & Meyer G. (2003) 32°C water temperature or 8 g l⁻¹ NaCl are efficient treatments against ichthyophthiriasis for jundiá *Rhamdia quelen* fingerlings. In: *World Aquaculture 2003 Book of Abstracts*, p. 284. World Aquaculture Society, Salvador, Brazil.
- Gurr M. I. & Harwood J. L. (1991) Fatty acid structure and metabolism. In: *Lipid Biochemistry: An Introduction*, pp. 23-118. 4th ed, Chapman & Hall, Suffolk.

- Hartman L. & Lago R. C. A. (1973) Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice* **22**, 475-481.
- Haas W., Haberl B., Hofmann M., Kerschensteiner S. & Ketzer U. (1999) *Ichthyophthirius multifiliis* invasive stages find their fish hosts with complex behavior patterns and in response to different chemical signals. *European Journal of Protistology* **35**, 129-135.
- Hassinen J. B., Burbin G. T., Bernhart F. W. (1951) The bacteriostatic effects of saturated fatty acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **31**, 183-189.
- Hirazawa N., Ohtaka T. & Hata K. (2000) Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Aquaculture* **188**, 1-13.
- Hirazawa, N., Oshima, S. & Hata, K. (2001a) In vitro assessment of the antiparasitic effect of caprylic acid against several fish parasites. *Aquaculture* **200**, 251-258.
- Hirazawa N., Oshima S., Mitsuboshi T. & Hata K. (2001b) The anthelmintic effect of medium-chain fatty acids against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*: evaluation of doses of caprylic acid at different water temperatures. *Aquaculture* **195**, 211-223.
- Hirazawa N., Oshima S., Hara T., Mitsuboshi T. & Hata K. (2001c) Antiparasitic effect of medium-chain fatty acids against the ciliate *Cryptocarion irritans* infestation in the red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* **198**, 219-228.
- Jenner P., Hagan E., Taylor J., Cook E. & Fitzhugh O. (1964) Food flavorings and compounds of related structure: acute oral toxicity. *Food and Cosmetics Toxicology* **2**, 327-343.
- Kiuchi F., Miyashita N., Tsuda Y., Kondo K. & Yoshimura H. (1987) Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans: I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **35**, 2880-2886.
- Lai J-S., Okuda S. & Takahashi H. (1977) Lipid A, various fatty acids, and their derivatives as proton conductors in membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Journal of General and Applied Microbiology* **23**, 137-146.
- Marounek M., Skrivanova E. & Rada V. (2003) Susceptibility of *Escherichia coli* to C2 – C 18 fatty acids. *Folia Microbiologica* **48**, 731-735.
- Matsumoto M., Kobayashi T., Takenaka A. & Itabashi H. (1991) Defaunation effects of medium-chain fatty acids and their derivatives on goat rumen protozoa. *Journal of General and Applied Microbiology* **37**, 439-445.
- Mustafa G., Nakagawa H., Ohya S., Shimizu T., Horikawa Y. & Yamamoto S. (1991) Effects of various level of dietary medium chain triglycerides on growth and lipid reservation in Ayu. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**, 2327-2331.
- Nair M. K. M., Joy J., Vasudevan P., Hinckley L., Hoagland T. A. & Venkitanarayanan K. S. (2005) Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* **88**, 3488-3495.
- Nieman C. (1954) Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriological Reviews* **18**, 147-163.
- Rohrer L., Winterhalter K. H., Eckert J. & Köhler P. (1986) Killing of *Giardia lamblia* by human milk is mediated by unsaturated fatty acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **30**, 254-257.
- Rosjo C., Nordrum S, Olli J. J., Krogdahl A., Ruyter B. & Holm H. (2000) Lipid digestibility and metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed medium-chain triglycerides. *Aquaculture* **190**, 65-76.

- Sakai M. (1999) Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* **172**, 63-92.
- Sheridan M. A. (1988) Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology* **90B**, 679-690.
- Skrivanova V. & Marounek M. (2006) A note on the effect of triacylglycerols of caprylic and capric fatty acid on the performance, mortality, and digestibility of nutrients in young rabbits. *Animal Feed Science and Technology* **127**, 161-168.
- Tojo J. L. & Santamarina M. T. (2001) Attempts at oral pharmacological treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* **24**, 249-252.
- Wahli T., Meier W. & Pfister K. (1986) Ascorbic acid induced immune-mediated decrease in mortality in *Ichthyophthirius multifiliis* infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Acta Tropica* **43**, 287-289.
- Wahli T., Frischknecht M., Schmitt M., Gabaudan J., Verlhac V. & Meier W. (1995) A comparison of the effect of silicone coated ascorbic acid and ascorbyl phosphate on the course of ichthyophthiriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, **18**, 347-355.
- Yoshinaga T. & Dickerson H. W. (1994) Laboratory propagation of *Cryptocaryon irritans* on saltwater-adapted *Poecilia* hybrid, the black molly. *Journal of Aquatic Animal Health* **6**, 197-201.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Paralelamente ao ensaio Piloto, foi realizado um estudo suplementando-se a ração basal de jundiá com 0,1% de prebiótico (β 1-3 glucano de *Saccharomyces cerevisiae*, Biorigin, São Paulo) por 45 dias. Os peixes também foram infestados com ictio como no Piloto. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos alimentados com ração suplementada ou não com prebiótico quanto à intensidade média de infestação e a mortalidade. Os resultados estão apresentados no Apêndice A.

Durante a realização dos experimentos, as seguintes observações foram feitas:

As unidades experimentais menores (16 L) são ideais quanto ao tamanho, porém, sendo claras, os jundiás mimetizam o ambiente e também ficam claros, o que dificulta a visualização dos pontos brancos. Tanques escuros são mais indicados tanto para conforto do jundiá, um peixe de fundo, como para a visualização dos trofozoítos. O uso de canos de PVC como abrigo também é recomendado, contanto que seja suficiente para todos os indivíduos no tanque, caso contrário, os efeitos serão negativos, i.e., dominância e estresse. Foram construídas tampas teladas para os tanques para evitar que os jundiás saltassem e diminuísse o número de indivíduos por unidade experimental. A densidade também é um fator importante, pois os jundiás parecem se adaptar melhor quando estão em maior número, evitando a dominância e o crescimento heterogêneo. O uso de filtros biológicos em cada unidade experimental parece ter evitado uma infestação natural por ictio. Quando conectados ao sistema de recirculação do laboratório, invariavelmente ocorrem enfermidades, dentre elas o ictio. Os filtros biológicos foram improvisados com garrafas plásticas de 2 L, seixo de rio, brita e tubos de PVC. Ainda é preciso medir a capacidade de filtração desses filtros, principalmente de amônia e nitrito.

O protocolo de infestação experimental deve ser ajustado antes de se realizar estudos futuros com ictio. A infestação individual nas unidades experimentais favorece a heterogeneidade no número de terontes e aumenta a variação nos resultados, dificultando a detecção de diferenças significativas. Seria preciso também a observação empírica do tempo de residência do parasito no jundiá, de acordo com a temperatura, determinando assim o melhor momento para coleta de inóculo para a infestação experimental, pois o número de terontes eclodidos dependerá do tamanho do trofozoíto que, por sua vez, depende do tempo de residência no hospedeiro (alimentação e desenvolvimento). Além disso, essa observação do tempo é importante para determinação da intensidade média de infestação, i.e., o dia de amostragem, evitando-se a amostragem de peixes já auto-infestados no segundo ou terceiro ciclos. Após a alimentação profilática, a infestação deve ser feita em um único volume de água com uma única concentração de inóculo e os peixes separados em tanques-rede, por exemplo. Em seguida, os peixes podem ser devolvidos para suas respectivas unidades experimentais. Evitando assim as grandes variações nas infestações observadas neste estudo.

Para a extração de lipídios totais pelo método de Bligh & Dyer (1959), foram feitas algumas modificações. Antes da segunda dose de clorofórmio, 10 mL de solução KCl 5% foram adicionados à mistura para fazer com que o ácido caprílico (polar) fosse atraído pela fração de clorofórmio (fase analisada). Além disso, o extrato lipídico não foi seco em estufa a 100 ± 5 °C, para evitar perdas pelo

calor, mas em fluxo de nitrogênio por aproximadamente 30 minutos. Para estudos futuros, pode-se também diminuir o pH ($< 7,0$) para aumentar a afinidade do ácido caprílico pela fração do clorofórmio.

Outra sugestão é testar forma mais estável de ácido caprílico do que a de ácido graxo livre como a monocaprina ou a tricaprilina, além de compostos de triacilgliceróis de ácido caprílico e ácido cáprico (ou outros ácidos graxos de cadeia média), na tentativa de evitar as perdas ocorridas.

Estudos futuros poderiam ser feitos testando a suplementação durante a larvicultura ou testar a alimentação com doses maiores durante menos tempo. Além disso, se o ácido caprílico aparece na circulação periférica, mas por pouco tempo, talvez fosse interessante então continuar alimentando durante o período de infestação experimental. Nesse caso, o uso de filtros biológicos em cada unidade experimental é necessário para que a qualidade da água seja mantida adequada. Talvez a auto-infestação também devesse ser evitada, pois uma infestação exagerada pode anular a ação do ácido caprílico ou qualquer outro produto. A cinética dos ácidos graxos de cadeia média também deveria ser estudada, provavelmente com uso de marcadores radioativos. Outra alternativa é a determinação da composição do muco do jundiá, uma vez sabido que os terontes são atraídos por glicoproteínas e repelidos por glico-conjugados, e estudar possíveis maneiras de aumentar a concentração de glico-conjugados para diminuir infestações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- BAGNI, M., ROMANO, N., FINOIA, M.G., ABELLI, L., SCAPIGLIATI, G., TISCAR, P.G., SARTI, M. & MARINO, G. Short- and long-term effects of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish and Shellfish Immunology*, v. 18, p. 311-325, 2005.
- BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá. In: B. Baldisserotto e J. Radünz Neto (org.) **Criação de Jundiá**. Santa Maria: editora UFSM, 2004. p. 67-72.
- BORBA, M. R. **Efeito de níveis de suplementação de vitamina C na dieta sobre a susceptibilidade de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*, ao ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis***. 2005. 34f. Relatório final (Pós-doutorado em aqüicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- BORBA, M.R., FRACALLOSSI, D. M. & FREITAS, F. A. (2007) Efeito da suplementação de vitamina C na dieta sobre a susceptibilidade de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*, ao *Ichthyophthirius multifiliis*. *Acta Scientiarum*, v. 9, 2007 (no prelo).
- BRANDÃO, D. A. Profilaxia e doenças. In: B. Baldisserotto e J. Radünz Neto (org.) **Criação de Jundiá**. Santa Maria: editora UFSM, 2004. p. 161-189.
- BUCHMANN, K.; NIELSEN, M. E. Chemoattraction of *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) theronts to host molecules. *International Journal for Parasitology*. v. 29, p. 1415-1423, 1999.
- BUCHMANN, K.; SIGH, J.; NIELSEN, C. V.; DALGAARD, M. Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Parasitology*, v. 100, p. 105-116, 2001.
- BUCHMANN, K; JENSEN, P.B.; KRUSE, K.D. Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: *in vitro* experiments. *North American Journal of Aquaculture*, v. 65, p. 21-24, 2003.
- CARNEIRO, P. C. F. A produção do jundiá em cativeiro. In: B. Baldisserotto e J. Radünz Neto (org.) **Criação de Jundiá**. Santa Maria: editora UFSM, 2004. p. 117-141.
- CROSS, M. L. Localized cellular responses to *Ichthyophthirius multifiliis*: protection or pathogenesis? *Parasitology Today*, v. 10, n. 9, p. 364-368, 1994.
- DICKERSON, H. W.; CLARK, T. G. *Ichthyophthirius multifiliis*: a model of cutaneous infection and immunity in fishes. *Immunological Reviews*, v. 166, p. 377-384, 1998.
- EPAGRI/CEPA. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina**. Florianópolis: EPAGRI/Instituto Ceba, v.1, 401 p, 2005.
- EWING, M. S.; KOCAN, K. M. *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) exit from gill epithelium. *Journal of Protozoology*, v. 34, n. 3, p. 309-312, 1987.
- EWING, M. S.; KOCAN, K. M. Invasion and development strategies of *Ichthyophthirius multifiliis*, a parasitic ciliate of fish. *Parasitology Today*, v. 8, n. 6, p. 204-208, 1992.
- EWING, M. S.; KOCAN, K. M.; EWING, S. A. *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) invasion of gill epithelium. *Journal of Protozoology*, v. 32, n. 2, p. 305-310. 1985.
- EWING, M. S.; EWING, S. A.; KOCAN, K. M. *Ichthyophthirius* (Ciliophora): population studies suggest reproduction in host epithelium. *Journal of Protozoology*, v. 35, n. 4, p. 549-552, 1988.
- FRACALLOSSI, D. M.; ZANIBONI FILHO, E.; MEUER, S. No rasto das espécies nativas. *Panorama da Aqüicultura*, v.12, n.74, p. 43-49, nov/dez, 2002.

FRACALOSSO, D.M.; AZEVEDO, T. M. P.; MEYER, G. 32°C water temperature or 8 g l⁻¹ NaCl are efficient treatments against ichthyophthiriasis for jundiá *Rhamdia quelen* fingerlings. In: WORLD AQUACULTURE 2003, 2003, Salvador. *Book of Abstracts...* Salvador: World Aquaculture Society, p. 284, 2003.

FUJIMOTO, R. Y.; CARNEIRO, D. J. Adição de ascorbil polifosfato, como fonte de vitamina C, em dietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829). *Acta Scientiarum*, v. 23, n. 4, p. 855-861, 2001.

GARCIA, L. O.; BECKER, A. G.; COPATTI, C. E.; BALDISSEROTTO, B. Salt in the food and water as a supportive therapy for *Ichthyophthirius multifiliis* infestation on silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 38, n. 1, p. 1-11, 2007.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L. **Lipid Biochemistry: An Introduction**. 4^a ed., Suffolk: Chapman & Hall, 1991, 406p.

HAAS, W.; HABERL, B.; HOFMANN, M.; KERSCHENSTEINER, S.; KETZER, U. *Ichthyophthirius multifiliis* invasive stages find their fish hosts with complex behavior patterns and in response to different chemical signals. *European Journal of Protistology*, v. 35, p. 129-135, 1999.

HASSINEN, J. B.; DURBIN, G. T.; BERNHART, F. W. The bacteriostatic effects of saturated fatty acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 31, p. 183-189, 1951.

HINES, R. S.; SPIRA, D. T. *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet) in the mirror carp, *Cyprinus carpio* L. I. Course of infection. *Journal of Fish Biology*, v. 5, p. 385-392, 1973.

HINES, R. S.; SPIRA, D. T. Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* (L): II. Pathology. *Journal of Fish Biology*, v. 6, p. 189-196, 1974a.

HINES, R. S.; SPIRA, D. T. Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* (L): IV. Physiological dysfunction. *Journal of Fish Biology*, v. 6, p. 365-371, 1974b.

HIRAZAWA, N.; OHTAKA, T.; HATA, K. Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Aquaculture*, v. 188, p. 1-13, 2000.

HIRAZAWA, N.; OSHIMA, S.; HATA, K. In vitro assessment of the antiparasitic effect of caprylic acid against several fish parasites. *Aquaculture* v. 200, p. 251-258, 2001a.

HIRAZAWA, N.; OSHIMA, S.; HARA, T.; MITSUBOSHI, T.; HATA, K. Antiparasitic effect of medium-chain fatty acids against the ciliate *Cryptocaryon irritans* infestation in the red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture*, v. 198, p. 219-228, 2001b.

KIM, K. H.; CHOI, E. S. Treatment of *Microcotyle sebastis* (Monogenea) on the gills of cultured rockfish (*Sebastes schlegelii*) with oral administration of mebendazole and bithionol. *Aquaculture*, v. 167, p. 115-121, 1998.

KIUCHI, F.; MIYASHITA, N.; TSUDA, Y.; KONDO, K.; YOSHIMURA, H. Studies on crude drugs effective on visceral larva migrans. I. Identification of larvicidal principles in betel nuts. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 35, n. 7, p. 2880-2886, 1987.

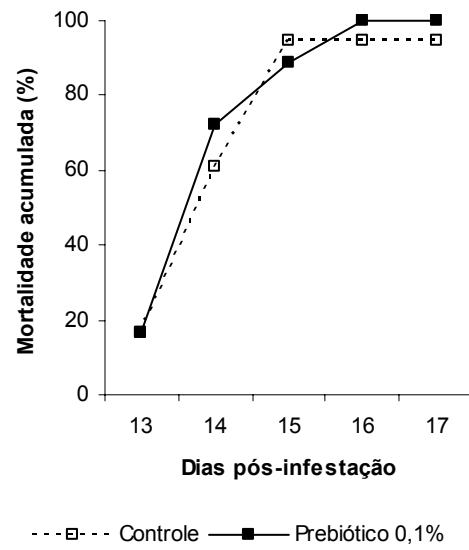
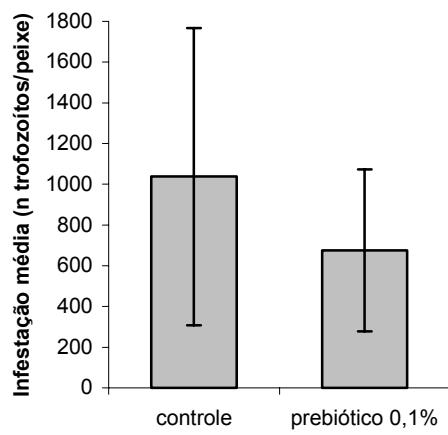
LAI, J. S.; OKUDA, S.; TAKAHASHI, H. Lipid A, various fatty acids, and their derivatives as proton conductors in membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 23, p. 137-146, 1977.

LI, M. H.; JOHNSON, M. R.; ROBINSON, E. H. Elevated dietary vitamin C concentrations did not improve resistance of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, against *Edwardsiella ictaluri* infection. *Aquaculture*, v. 117, p. 303-312, 1993.

- MAROUNEK, M., SKRIVANOVA, E.; RADA, V. Susceptibility of *Escherichia coli* to C2 – C18 fatty acids. *Folia Microbiologica*, v. 48, n. 6, p. 731-735, 2003.
- MATSUMOTO, M.; KOBAYASHI, T.; TAKENAKA, A.; ITABASHI, H. Defaunation effects of medium-chain fatty acids and their derivatives on goat rumen protozoa. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 37, n. 5, p. 439-445, 1991.
- NIEMAN, C. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriological Reviews*, v. 18, p. 147-163, 1954.
- PEREIRA JR., J.; VIANNA, R. T.; MORAIS, N. C. M. Revisão comentada dos parasitos associados a *Rhamdia*. In: A. T. Silva-Souza (org.) **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringá: Thader-Graf, 2006. p. 271-295.
- ROHRER, L.; WINTERHALTER, K.; ECKERT, J.; KÖHLER, P. Killing of *Giardia lamblia* by human milk is mediated by unsaturated fatty acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 30, n. 2, p. 254-257, 1986.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, v. 172, p. 63-92, 1999.
- TOJO, J. L.; SANTAMARINA, M. T. Attempts at oral pharmacological treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, v. 24, p. 249-252, 2001.
- VENTURA, M. T.; PAPERNA, I. Histopathology of *Ichthyophthirius multifiliis* infections in fishes. *Journal of Fish Biology*, v. 27, p. 185-203, 1985.
- WAHLI, T.; MEIER, W.; PFISTER, K. Ascorbic acid induced immune-mediated decrease in mortality in *Ichthyophthirius multifiliis* infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Acta Tropica*, 43, p. 287-289, 1986.
- WAHLI, T.; FRISCHKNECHT, M.; SCHMITT, M.; GABAUDAN, J.; VERLHAC, V.; MEIER, W. A comparison of the effect of silicone coated ascorbic acid and ascorbyl phosphate on the course of ichthyophthiriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 18, p. 347-355, 1995.
- YOSHINAGA, T.; DICKERSON, H. W. Laboratory propagation of *Cryptocaryon irritans* on saltwater-adapted *Poecilia* hybrid, the black molly. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 6, n. 3, p. 197-201, 1994.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resultados da suplementação ou não da ração de jundiá com 0,1% prebiótico na intensidade de infestação e na mortalidade acumulada.



APÊNDICE B – Unidades experimentais do ensaio Piloto (foto superior) e do Experimento (foto inferior).

