

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**MANANOLIGOSSACARÍDEO EM DIETAS PARA  
LARVAS E JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO**  
*(Oreochromis niloticus)*

Autor: Kátia Kalko Schwarz  
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Maio - 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**MANANOLIGOSSACARÍDEO EM DIETAS PARA  
LARVAS E JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO**  
*(Oreochromis niloticus)*

Autor: Kátia Kalko Schwarz  
Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Maio – 2009

**VIVER, MORRER,  
RENASCER AINDA  
TAL É A LEI.**

*Allan Kardec*

Ao

Meu pai Vitaly Kalko e à minha mãe Myra Fofanoff Kalko, ambos *in memoriam*, que me amaram muito, ensinaram o que é a vida, me prepararam-me para o futuro e me protegem até hoje de onde estão....

Ao

meu filho Douglas Kalko Schwarz, a pessoa que mais amo na vida, razão da minha existência, que compreendeu a minha ausência, nos momentos de estudos na UEM

Ao

meu marido Roberto Luiz Schwarz pelo companheirismo, estímulo constante, sempre me apoiando nos momentos mais difíceis, às vezes suprindo o papel de mãe e pai ao mesmo tempo, e patrocinando, acreditando no que era melhor para nós três

A

minha irmã Natacha Kalko, pela ajuda e incentivo, nos momentos mais difíceis das nossas vidas

Aos

meus companheiros e irmãos, que sempre me estimularam Prof. Dr. Reinaldo Spitzman, Walmor Zimmermann, Mário e Vilma Garcia, Eunice Munhoz, Izael dos Santos, Euclides e Leila Camargo, Edna, Luciano e Adriana Appel

Aos

familiares, que sempre acreditaram na minha capacidade

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya**, que por além de cumprir eficientemente com o papel de um orientador de Pós-Graduação, me orientou-me para a vida, para a profissão, alertando sempre o proceder de forma digna, ética, séria e correta.

À **SAF DO BRASIL**, em especial ao **Dr. Alfredo de Andrade Navaro**, pessoa de espetacular importância, pela oportunidade oferecida de apoio técnico e financeiro da tese, proporcionando o aprimoramento, e a participação em vários eventos científicos, inclusive internacionais.

As empresas **CATALLINI, FERTIPAR, BUNGUE, COAMO** e **IMPETRAX, AQUABEL E ALISUL (Sr. Sérgio Malawasi)** pela doação de materiais de uso permanente e de consumo para a realização dos experimentos da tese.

À Universidade Estadual de Maringá, por ter-me possibilitado desenvolver este trabalho.

AO NUPELIA/UEM pelo uso do laboratório T10.

À Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de Paranaguá/FAFIPAR, ao diretor **Prof. MSc. Antônio Alpendre da Silva**, e a todos os estagiários do Laboratório de Nutrição de Peixes, em especial pela aluna **Mirian Cristina Gualdezi**.

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela qualidade de ensino.

Ao Prof. **Dr. Makoto Matsushita**, que me proporcionou o conhecimento científico dos ácidos graxos na composição corporal de peixes marinhos.

A **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Raquel Marçal** pelo grande papel que teve no auxílio para a confecção de Lâminas histológicas e orientações de grande valia.

Ao Prof. **Dr. Júlio Damascena**, pelos ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Sebastião Franco**, orientador de mestrado sempre prestativo e amigo e ao **Prof. Dr. Fabiano Dahke** pelo auxílio na explicação de métodos estatísticos.

A funcionária do LANA **Sr<sup>a</sup> Creuza de Souza Azevedo**, pela grande ajuda nas análises laboratoriais, pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas de doutorado/mestrado, que estudaram comigo, aos companheiros do T10, e em especial a grande colega e amiga de doutorado **Carina Sherer**.

E a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

KÁTIA KALKO SCHWARZ, filha de Vitaly Kalko e Myra Fofanoff Kalko, nasceu em São Paulo/SP, no dia 15 de outubro de 1968.

Em dezembro de 1997, concluiu o curso de Zootecnia, nas Faculdades Integradas Espírita.

Em dezembro de 1998, concluiu o curso de especialização em Metodologia do Ensino Superior, IPBEX.

Em fevereiro de 2001, foi contratada como professora colaboradora, do departamento de Zootecnia pela Universidade Federal do Paraná.

Em Junho de 2002 obteve o grau de Mestre, pela Universidade Federal do Paraná, em Ciências Veterinária, na área de Produção Animal.

Em junho de 2002, trabalhou como docente no CESCAGE (Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais) no Curso de Agronomia e Zootecnia. Neste mesmo período iniciou suas atividades de gerente de pesquisa e desenvolvimento de produtos, com a empresa Beraca Sabará, na linha de aditivos para ração animal (*Yucca sidigera*, *Quilaya saponária Molina*).

Em março de 2006 iniciou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de Doutorado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá.

Em agosto de 2006 foi contratada como professora efetiva da Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de Paranaguá/FAFIPAR, do Curso de Ciências Biológicas.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	1
<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> .....	1
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	2
1) Introdução Geral.....	2
2) Revisão de Literatura.....	4
2.1) Tilápia do Nilo.....	4
2.2) Prebióticos.....	4
2.3) Mananoligossacarídeo-MOS.....	5
2.3) Morfologia Intestinal.....	7
2.4) Reversão Sexual.....	10
3) Literatura Citada.....	11
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	16
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	17
<b>Mananoligossacarídeo em dietas no período de reversão sexual de tilápia do Nilo</b> <b>(<i>Oreochromis niloticus</i>)</b> .....	18
<b>RESUMO</b> .....	18
<b>ABSTRACT</b> .....	19

<b>Introdução</b> .....	20
<b>Material e Métodos</b> .....	21
<b>Resultados e Discussão</b> .....	26
<b>Conclusão</b> .....	33
<b>Literatura Citada</b> .....	34
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	37
<b>Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)</b> .....	38
<b>RESUMO</b> .....	38
<b>ABSTRACT</b> .....	39
<b>Introdução</b> .....	40
<b>Material e Métodos</b> .....	41
<b>Resultados e Discussão</b> .....	47
<b>Conclusão</b> .....	55
<b>Literatura Citada</b> .....	56
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	59

## TABELAS DO APÊNDICE

CAPÍTULO 2	Página
Tabela 1 – Ingredientes e sua participação percentual na dieta controle.....	22
Tabela 2 – Desempenho de larvas de tilápia do Nilo, na fase de reversão, alimentadas em dietas com níveis crescentes de mananoligossacarídeo (MOS).....	26
Tabela 3 – Composição química da carcaça de larvas de tilápia do Nilo na fase de reversão, alimentadas com dietas sem e com níveis crescentes de mananoligossacarídeo (base na matéria natural).....	27
Tabela 4 – Parâmetros morfométricos da porção média do intestino de larvas de tilápias do Nilo alimentadas com dietas em níveis crescentes de mananoligossacarídeo/MOS e medida do comprimento do intestino.....	28
CAPÍTULO 3	
Tabela 1 – Composição percentual na dieta controle.....	42
Tabela 2 – Desempenho de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de mananoligossacarídeo (MOS).....	47
Tabela 3 – Composição química da carcaça de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas sem e com níveis crescentes de mananoligossacarídeo (base na matéria natural).....	49
Tabela 4 – Coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca, energia bruta, proteína bruta e cinzas para juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de mananoligossacarídeo.....	49
Tabela 5 - Altura das vilosidades intestinais, número de vilos por campo de captura de imagem e número de células caliciformes/vilo na porção média do intestino de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de mananoligossacarídeo/MOS.....	51

## FIGURAS DO APÊNDICE

### CAPÍTULO 2

Página

Figura 2 - Imagem de microscópio ótico acoplado ao sistema analisador de imagens Leica (Image-Pro Plus versão 4.5.0.27). Observar as diferenças da densidade de vilos e da integridade do tecido intestinal. A 0%, B 0,15%, C 0,30%, D 0,45%, E 0,60%, F 0,70% de MOS na dieta. CA= células caliciformes; V= vilosidades. Coloração: PAS. Barra 100 $\mu$ m.....32

### CAPÍTULO 3

Figura 1 – Em A 0%; B 1%, C 2%, D 3% de mananoligossacarídeo (MOS) na dieta. Observar a integridade da altura das vilosidades intestinais em B, C e D. Destacando as vilosidades (VC) em B, muscular da mucosa (M), e célula caliciforme (Ca) em C. Coloração PAS. Barra 200 $\mu$ .....54

## RESUMO

Foram realizados dois trabalhos para avaliar a utilização de mananoligossacarídeo (MOS) em dietas para larvas e juvenis de tilápias do Nilo nas fases de larva e juvenil sobre o desempenho e morfologia intestinal. No primeiro trabalho, larvas de tilápias do Nilo ( $n=1500$ ,  $P=0,01g \pm 0,001g$ ), foram distribuídas aleatoriamente em 30 tanques de 100 litros cada, durante 30 dias. Os peixes foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, sendo seis tratamentos com cinco repetições. A dieta controle foi elaborada para conter aproximadamente 35% de proteína bruta e 3100 kcal de ED/kg com o MOS incluído na proporção de 0; 0,15, 0,30, 0,45, 0,60 e 0,75% da dieta. No segundo trabalho, foram utilizados 224 peixes, com peso vivo inicial médio de aproximadamente 25g. Os peixes foram distribuídos em um delineamento em blocos ao acaso, sendo considerado como bloco cada tanque de 1000 L com 16 gaiolas de  $0,12 m^3$  cada, com uma gaiola de cada tratamento. Os tanques foram mantidos em sistema de recirculação (10 L/minuto/tanque) de água com aeração suplementar e biofiltro, alimentados manualmente, quatro vezes por dia, durante 53 dias. Foi utilizada dieta controle com 28,5% de proteína bruta e 2855 kcal de energia digestível/kg sem MOS, sendo adicionado MOS nas proporções de 1, 2 e 3% da dieta controle. Os coeficientes de digestibilidade foram determinados pelo método de Guelph

modificado e o óxido de cromo foi utilizado como indicador. No primeiro trabalho, com o aumento nos níveis de inclusão de MOS nas dietas, foi observado aumento linear sobre o comprimento do intestino, altura das vilosidades intestinais e densidade dos vilos. Não houve diferença para composição corporal, ganho em peso, peso final, comprimento final, fator de condição e sobrevivência e número de células caliciformes do intestino das larvas. Foi observado efeito quadrático a conversão alimentar em que o melhor resultado foi estimado com 0,34% de MOS, respectivamente. No segundo trabalho, não foi observado efeito dos níveis de inclusão de MOS sobre o consumo, índice hepatossomático, sobrevivência, umidade e cinzas na corporal, coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, energia bruta, proteína bruta, extrato etéreo e disponibilidade das cinzas, densidade de vilos e número de células caliciformes por vilos. Os melhores resultados de consumo, conversão alimentar, taxa de eficiência proteica, e teores de proteína e extrato etéreo na carcaça foram obtidos em peixes que consumiram a dieta com 1% de MOS. Concluiu-se que o melhor nível de inclusão de MOS em dietas para larvas e juvenis de tilápias do Nilo é de 0,34% e 1%, respectivamente.

**Palavras-chave:** desempenho, digestibilidade, morfologia intestinal, peixe, prebiótico

## ABSTRACT

Two works were carried out to evaluate mannanoligosaccharides (MOS) inclusion in Nile tilapia (larvae and juveniles) on performance and gut morphology. In the first work, Nile tilapia larvae ( $n = 1500$ ,  $P = 0.01 \pm 0.001$ g) were randomly distributed in 30 tanks of 100 liters each, for 30 days. The fish were distributed in a randomized block design with six treatments and with five replicates. The control diet was elaborated to contain approximately 35% of crude protein and 3,100 kcal DE/kg and MOS was included at 0, 0.15, 0.30, 0.45, 0.60 and 0.75% of diet. In the second work a total of, 224 fish with an average initial weight of approximately 25 g were distributed in a randomized blocks design, as block was considered each tank of 1,000 L with four cages (0.12 m<sup>3</sup> each), with one cage from each treatment. A recirculation systems (10 L/minute/tank) with supplemental aeration and a biofilter was used. The fish were fed manually, four times a day byfor 53 days. A control diet with 28.5% crude protein and 2855 kcal of digestible energy/kg was used and MOS was included at 1, 2 and 3% of the control diet. The apparent digestibility coefficients were determined by modified Guelph method using chromic oxide as inert indicator. In the first work, a linear increase on the intestine length, intestinal villous height and villi density was observed according to the dietary MOS inclusion. No differences of dietary MOS on body composition, weight gain, weight final, final length, condition factor, survival and number of goblet cells of the gut of the larvae were observed. A quadratic effect on feed conversion ratio was observed with according to the MOS inclusion and the best value

was estimated with 0.34%, respectively. In the second work, no effects of MOS on feed intake, hepatosomatic index, survival, body moisture and ash, apparent digestibility coefficients of dry matter, gross energy, crude protein, ether extract and ash availability and number of goblet cells per villus were observed. The best values of feed intake, feed conversion ratio, protein efficiency ratio, and body composition were observed in fish fed with 1% of dietary MOS. It was concluded that 0,34% and 1% of dietary MOS is adequate for Nile tilapia, larvae and juveniles, respectively.

**Key words:** performance, digestibility, intestinal morphology, fish, prebiotic.

## CAPÍTULO 1

### **CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

# INTRODUÇÃO

## 1. Introdução Geral

A aquicultura brasileira tem crescido acima da média mundial desde 1995. Nos anos de 2003 e 2004, o crescimento foi de 21,1% ao ano enquanto a aquicultura mundial cresceu aproximadamente 9,5% no período de 1991 a 2004 (Ostrensky et al., 2008).

A tilápia -do -Nnilo (*Oreochromis niloticus*) tem sido a espécie de peixe mais criada no Brasil, pelo conhecimento da sua reprodução, programas de melhoramento genético e adaptação. Por outro lado, faltam informações referentes à nutrição, principalmente sobre a utilização de aditivos que possam contribuir para a melhoria do desempenho e da saúde dos peixes.

O Brasil, atualmente é o maior produtor de tilápias da América do Sul e, globalmente, está entre os dez maiores (FAO, 2006). No Paraná, conforme dados estatísticos da Secretaria Especial da Aquicultura e Pesca/SEAP (2008) a produção de tilápia em 2005 foi de aproximadamente 12 mil toneladas. Embora o Paraná seja o maior produtor de tilápias no Sul do Brasil (2º em âmbito nacional) o Estado do Ceará produziu naquele mesmo ano 16,8 toneladas de tilápia, necessitando o Paraná aprimorar técnicas de nutrição e manejo desta espécie. Com relação à nutrição, existem restrições do uso de alguns promotores de crescimento em dietas para animais, principalmente os antibióticos e quimioterápicos, que podem causar grandes impactos ambientais, quando são consideradas as criações aquícolas (Silva & Nörnberg, 2003). Para evitar ou diminuir o uso de antibióticos e quimioterápicos em dietas para peixes, os piscicultores e fabricantes de rações têm buscado alternativas, para melhorar o desempenho zootécnico e a saúde dos peixes com a utilização de prebióticos e probióticos.

O prebiótico mananoligossacarídeo (MOS), é um produto originado da parede celular de levedura, que tem na sua composição cerca de 40% de  $\beta$ -glucanos, 40% de  $\alpha$ -mananos, 28% de proteínas, 7% de lipídeos, 3% de substâncias inorgânicas e 2% de hexosaminas e quitina (SAF Agri, 2004). A utilização de leveduras e subprodutos tem demonstrado efeitos positivos sobre o desempenho produtivo de peixes (Sakai, 1999; Ortuño et al. 2002; Li & Gatlin, 2003, 2004; Hisano et al., 2004, 2008).

Schwarz et al. (2005) utilizaram níveis crescentes de mananoligossacarídeo na alimentação de pós-larva de robalo-peva (*Centropomus paralellus*), nos níveis de 0,1, 0,2 e 0,3% de MOS/ton de ração. Os peixes tratados com MOS apresentaram menor estresse comportamental durante o manejo diário quando comparados com os animais não tratados, sendo isto mais evidente com a utilização de 0,3%. Houve diferença estatística entre os tratamentos, sendo que 0,3% resultou em melhores taxas no ganho em peso, comprimento e altura do peixe, quando comparado com os outros tratamentos. Apresentou, também, uma homogeneidade de lote, o que é de suma importância em criações intensivas.

No entanto, como existem limitações na inclusão de valores elevados de levedura desidratada em dietas para organismos aquáticos, quer seja para o processamento ou pela presença de fatores antinutricionais, tem-se optado pela utilização de MOS, que atua como imunoestimulante, melhorando a resposta produtiva dos animais em período de estresse.

Parece haver evidências que teores maiores de MOS podem vir a ser testados, para obtenção de resultados interessantes em criações intensivas de alevinos de peixes tanto marinhos quanto de águas interiores (Schwarz et al., 2005). Para isto existe a necessidade de conhecer o modo de ação do mananoligossacarídeo em dietas para larvas e juvenis de tilápias do Nilo.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. Tilápia -do -Nnilo

As tilápias são peixes da família *Cichlidae* (Moreira et al., 2001) nativas da África, e encontram-se difundidas globalmente. A maioria das espécies, possuem as características desejáveis em peixes destinados à exploração comercial, adaptabilidade às condições ambientais, boa conversão alimentar, rápido ganho em peso, e carne com alto valor nutricional e comercial. Existem cerca de 77 espécies de tilápias, e basicamente três gêneros de tilápias são de maior importância, sendo a espécie *Oreochromis niloticus*, conhecida como tilápia -do -Nnilo, a mais produzida no Brasil.

As tilápia -do -Nnilo passou a ser a espécie mais cultivada no Brasil a partir de 2002. Em 2004 a sua produção representou 26% do total produzido pela aquicultura nacional, considerando que o país respondeu por 64% da produção total da espécie e 67% em receitas geradas pelo cultivo da mesma, na América do Sul em 2004, seguido pela Colômbia com uma produção de 26% (Ostrensky et al., 2008). No Brasil, em 1996 foi introduzida a linhagem Tailandesa que apresenta maior crescimento que a linhagem anteriormente utilizada e em 2002 foi introduzida uma nova linhagem de tilápia do Nilo, da empresa GenoMar. A GenoMar Supreme® Tilapia, é uma linhagem amplamente difundida em diversos países (Zimmermann & Fitzsimmons, 2004).

### 2.2. Prebióticos

A utilização de pré-nutrientes na nutrição de peixes parece ser uma alternativa interessante, principalmente por não causar danos ao meio ambiente e apresentar boa biossegurança, sendo de fácil incorporação durante o processamento de rações e pelas respostas positivas de desempenho zootécnico (Hisano et al., 2004).

De acordo com a Instrução Normativa nº 13/2004 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) os prebióticos são aditivos zootécnicos, sendo considerados ingredientes que não são digeridos pelas enzimas digestivas do hospedeiro, mas que são fermentados pela flora bacteriana do trato digestório originando substâncias que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas e inibem a colonização de bactérias patogênicas ou indesejáveis.

Os prebióticos são compostos biologicamente seguros à saúde humana e animal, justificando a sua utilização em substituição a alguns fármacos veterinários usados na

prevenção de alterações do trato digestório e/ou como promotor de crescimento (Silva & Nöenberg, 2003). Alguns açúcares absorvíveis ou não, fibras, álcoois de açúcares e oligossacarídeos estão dentro deste conceito de prebióticos (Gibson & Roberfroid, 1995; Silva, 2000; Junqueira, 2001). Por outro lado, um produto para ser considerado prebiótico não pode ser hidrolisado ou absorvido no intestino delgado, sendo um substrato seletivo para um determinado grupo de bactérias comensais benéficas, capaz de alterar positivamente a microbiota intestinal e a induzir efeitos luminiais ou sistêmicos que sejam benéficos ao hospedeiro. A maioria dos oligossacarídeos não digestíveis têm sido utilizados como prebióticos, devido a sua seletividade fermentativa (Silva & Nöenberg, 2003).

Os oligossacarídeos, cadeias curtas de polissacarídeos, compostos de três a dez açúcares simples ligados entre si, são os ingredientes que satisfazem a esses requerimentos com eficiência. Para Bacila (2003) os oligossacarídeos, possuem de dois até 10 unidades de monossacarídeos. As cadeias de oligossacarídeos são processadas no complexo de Golgi nas células intestinais produtoras de muco, nas células caliciformes, que teriam ligação com este processo de liberação de muco intestinal (Alberts et al. 2004; Junqueira & Carneiro, 2005). Esta possibilidade pode indicar que algumas partículas de oligossacarídeos, provindas dos prebióticos possam ser absorvidas no trato gastrointestinal.

As características gerais dos prebióticos, segundo Gibson e Roberfroid (1995) não devem ser metabolizados ou absorvidos durante a sua passagem pelo trato digestivo superior e servirem como substrato a uma ou mais bactérias intestinais, benéficas (estas serão estimuladas a crescer e /ou tornarem-se metabolicamente ativas). Além de possuírem a capacidade de alterar a microbiota intestinal de maneira favorável à saúde do hospedeiro, induzindo efeitos benéficos, sistêmicos na luz intestinal do hospedeiro.

Os prebióticos atuam estimulando o crescimento de diversas bactérias intestinais benéficas, cujos metabólitos atuam também na redução do pH, além de diminuir os sítios de aderência, imobilizando e reduzindo a capacidade de fixação de algumas bactérias patogênicas na mucosa intestinal (Silva, 2000).

O mananoligossacarídeos (MOS), de acordo com Abraham & Beachey (1985) e Firon et al. (1987) são derivados de glucomanoproteínas oriundas da parede celular de leveduras. O modo de ação dos MOS é a adsorção de agentes patogênicos, bloqueando a sua colonização. As bactérias patogênicas colonizam o trato gastrointestinal ligando-se aos açúcares manose na superfície do intestino. Ao fornecer uma rede de manose no

complexo manano, os patógenos ligam-se à rede e são expelidos do sistema. Também foi demonstrado que além dos coliformes, a salmonela e os clostrídios podem ser removidos desta forma (Feeding Times, 1998), sendo promissor em dietas para animais domésticos (Sisak, 1994; Zennoh, 1995; Vander Beke, 1997 e Newman, 2000).

A parede celular representa de 15 a 30% da matéria seca total da levedura (Hough, 1990 e Rose, 1993) e possuem cerca de 40% de  $\beta$ -glucanos, 40% de  $\alpha$ -mananos, 28% de proteínas, 7% de lipídeos, 3% de substâncias inorgânicas e 2% de hexosaminas e quitina. O glucano representa o componente estrutural mais abundante e se localiza na parte interna da parede, enquanto o manano se localiza-se na parte externa (Hough, 1990).

O glucano é altamente ramificado com moléculas de glicose com ligações  $\beta$  1-3 e  $\beta$  1-6. A cadeia principal é composta por unidades de glicose com ligação  $\beta$  1-6 e a cadeia lateral por ligações  $\beta$  1-3. O manano também contém ramificações com a cadeia principal composta por ligações  $\alpha$  1-6 e  $\alpha$  1-4, e algumas cadeias laterais ligadas por  $\alpha$  1-3, e que podem estar complexados com treonina e serina das cadeias polipeptídicas (Spring, 2000).

A utilização destes polissacarídeos melhora a saúde de peixes (Robertsen et al., 1994; Sakai, 1999), considerando que o MOS atua sobre o sistema imunológico e na prevenção da colonização de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal do animal (Spring, 2000; Staykov et al., 2005; Staykov et al., 2007), melhorando o desempenho de peixes (Zou & Li, 2004; Culjak et al., 2006; Staykov et al., 2007). Além disso, melhora a utilização de alguns nutrientes (Hisano et al., 2005) e, conseqüentemente, o desempenho produtivo dos mesmos (Schwarz et al., 2002; Li & Gatilin III, 2003; Schwarz et al., 2005), havendo poucas informações das ações desses prebióticos sobre a morfologia intestinal de peixes.

Li & Gatilin III (2003) afirmaram que o prebiótico além de melhorar a digestibilidade dos ingredientes da dieta funcionam como promotores de crescimento, e também como imunoestimulantes, melhorando as condições do trato digestório, sendo este um novo conceito na aquicultura. Zhou & Li (2004) que trabalharam com dosagens de MOS em juvenis de carpas (*Cyprinus carpio* Var. *Jian*) obtiveram os melhores resultados de desempenho com a dosagem de 0,24% de inclusão de MOS na dieta. Schwarz et al. (2005) utilizaram dosagens crescentes de MOS na alimentação de robalo-peva (*Centropomus paralellus*) nas dosagens de 0,1% , 0,2% e 0,3% nas dietas.

Por meio de análise descritiva, os autores citaram que os peixes que receberam a dieta com MOS apresentaram menor estresse comportamental durante o manejo diário, quando comparados com os peixes que receberam a dieta sem MOS, sendo isto mais evidente nos peixes que consumiram a dieta com 0,3% de MOS, que apresentaram os melhores resultados de ganho em peso e uniformidade de lote.

Hisano et al. (2006) avaliaram levedura íntegra (2%), levedura autolisada (2%), parede celular (0,3%) e uma dieta controle em dietas para alevinos de tilápia do Nilo e constataram que a inclusão de levedura íntegra, a autolisada e a parede celular resultou em melhora na conversão alimentar dos peixes, sendo observado maior consumo e taxa de eficiência proteica pelos peixes que receberam dieta com levedura autolisada. Além disso, os autores demonstraram que a inclusão de parede celular de levedura nas proporções de 0,1; 0,2; e 0,3% e levedura íntegra e autolisada nas dosagens de 1, 2 e 3% não alteraram os padrões de tilápia do Nilo, demonstrando que podem ser utilizados com segurança para comporem dietas para esta espécie.

Staykov et al. (2007) estudaram os efeitos do MOS em dietas de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) com peso inicial de 30 g, criadas em tanques rede e concluíram que a ação do MOS melhorou o desempenho e a resposta imunológica dos peixes.

Hisano et al. (2008) citaram que a parede celular apresenta proteína de baixa digestibilidade. Porém quando são considerados os polissacarídeos que constituem a parede celular, a digestibilidade da fração proteica pode beneficiar a população de bactérias probióticas, além de influenciar na melhora do sistema imunológico de peixes e camarões, sugerindo seu uso como alimento funcional.

### **2.3. Morfologia Intestinal**

Os peixes possuem uma grande variedade de hábito alimentar, podendo ser herbívoros, carnívoros ou omnívoros, planctófagos, detritívoros, iliófagos e microfagos. Porém esta classificação pode apresentar sobreposição, pois um peixe pode ser planctófago e micrófago, ou detritívoro e iliófago. Os peixes apresentam diversas adaptações do sistema digestório conforme a especialização necessária para ingerir, digerir e absorver os diferentes tipos de alimentos. Com relação ao intestino, que normalmente é um longo tubo com pregas tendo como função complementar a digestão iniciada no estômago e absorver nutrientes, água e íons, podendo apresentar cecos

pilóricos, que são projeções digitiformes da região proximal, sendo uma adaptação para aumentar a área do intestino proximal, mais desenvolvidos em peixes carnívoros e reduzidos ou ausentes nos herbívoros. Em teleósteos, na primeira porção do intestino, ocorre a absorção de nutrientes como os monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos e na segunda porção é responsável pela entrada de macromoléculas por pinocitose (Baldisseroto, 2002).

O trato gastro-intestinalgastrointestinal de peixes compreende um órgão tubular que inicia na boca e termina no ânus, dividindo-se em três seguimentos a considerar o intestino anterior, médio e anal. O tamanho do trato gastro-intestinalgastrointestinal dos peixes é de 0,2 a 2,5 vezes o comprimento do corpo, nos peixes carnívoros. Nos onívoros é de 0,6 a 8,0 vezes e nos herbívoros é de 08 a 15,0 vezes o tamanho do corpo (Poli et al, 2004).

De acordo com Wheeler & Burkitt (1994) quatro fatores importantes combinam-se para proporcionar uma maior área de superfície intestinal:

- a) O intestino delgado é extremamente longo;
- b) A mucosa e submucosa são dispostas em pregas circulares denominadas plicas circulares ou válvula de Kerckring, que são particularmente numerosas no jejuno;
- c) Há extensos microvilos na superfície luminal dos enterócitos, que são as células cilíndricas que recobrem as vilosidades e as criptas, estas células são responsáveis pelo processo de digestão e absorção.

Fischer da Silva (2001), Macari & Maiorka (2000), Komm (1978) citaram que em aves, quanto maior o tamanho da vilosidade intestinal, maior é a capacidade que o animal possui para a absorção de alimentos.

Para Junqueira & Carneiro (2005) a camada muscular da mucosa localiza-se imediatamente sob as criptas da mucosa e separa a mucosa da submucosa. A submucosa vascular estende-se para as plicas circulares e forma o seu centro. As túnica circular interna e longitudinal externa da camada muscular são responsáveis pela atividade peristáltica contínua do intestino delgado. A função do intestino delgado é o movimento rítmico dos vilos, devido à contração das células musculares lisas presentes no eixo dos vilos, contraindo-se várias vezes por minuto, bombeando o comprimento dos capilares linfáticos na direção dos vasos linfáticos do mesentério. Esta contração do intestino é formada por eixos de inervação: *i) intrínseco* que é constituído pelos neurônios que formam o plexo nervoso mioentérico, localizado entre as subcamadas muscular externa

e interna e o plexo submucoso, localizado na submucosa, sendo responsáveis pelas contrações intestinais que ocorrem na ausência da inervação extrínseca. *ii) extrínseca* é formada por fibras colinérgicas do parassimpático que estimulam a atividade do músculo liso intestinal e por fibras adrenergéticas do simpático que atenuam a atividade desta musculatura.

Vilos ou vilosidades intestinais são invaginações da mucosa que se projetam na luz do intestino delgado, seu comprimento segundo Junqueira & Carneiro (2005) varia de 0,5 a 1,5mm. Entre os pontos de inserção dos vilos da mucosa observam-se orifícios onde desembocam as criptas, que na sua profundidade aparecem às células enterodócrinas, responsáveis pelo produto de secreção (Komm, 1978), incluindo a secretina, somatostatina, enteroglucagon e serotonina (Wheater & Burkitt, 1994), produtoras de albumina bactericida (Wilsch, 1999) além da reposição dos enterócitos, que são responsáveis pela digestão e absorção em aves (Ito, 1994).

Wheater & Burkitt (1994) citaram que os processos de absorção são totalmente dependentes dos mecanismos que ocorrem na mucosa intestinal, assim a integridade das células que compõem a mucosa intestinal é de fundamental importância para a absorção de nutrientes.

Os enterócitos são as principais células com capacidade para transportar monômeros para o interior da célula e para a corrente sanguínea, através da membrana baso lateral. A maturação do enterócito ocorre durante o processo de migração da cripta para a ponta do vilos, sendo dependente de estímulos para sua diferenciação. O número e tamanho dos vilos dependem do número de células que o compõe, assim quanto maior o número de células, maior o tamanho do vilos. Entre as fendas intercelulares dos enterócitos encontram-se os linfócitos, onde desempenham um papel importante na defesa imunológica do trato (Wheater & Burkitt, 1994).

A existência da fimbria (glicocalix) dos microvilos do enterócito é muito proeminente, confere proteção contra autodigestão e atua como o local para absorção de enzimas digestivas pancreáticas. Outra função das fimbrias está associada à presença de receptores que são capazes de ligar-se a bactérias patogênicas e não patogênicas, e neste sentido manter a sanidade da mucosa intestinal (Butolo, 2001; Macari & Maiorka, 2000; Wheater & Burkitt, 1994).

## 2.4. Reversão Sexual

A reversão sexual é uma prática utilizada em tilapicultura, que tem como objetivo a produção de progênie 100% machos de tilápias. É um processo em que larvas recém - eclodidas, ou seja, possuindo tecidos ainda indiferenciados das gônadas das fêmeas se convertam em tecido testicular (Mardini et al., 2005).

A alta capacidade de reprodução precoce e constante da tilápia do Nilo resulta na superpopulação, sendo evidente uma maior competição pelo alimento e consequentemente um crescimento insuficiente e sem uniformidade do lote (Sanches & Hayashi, 1999; Moreira et al., 2001).

Pinto et al.(2007) citaram que apesar do potencial da exploração em sistema de criação em escala industrial, a produtividade de tilápias poderia ser aumentada, principalmente, devido à baixa disponibilidade de alevinos monosexo de boa qualidade, sendo dessa forma interessante a produção de percentagens maiores de alevinos machos. Portanto, a utilização de tilápias apresenta-se mais vantajosa quando são utilizadas populações de monosexo masculinas, uma vez que os machos de tilápias apresentam maior crescimento que as fêmeas.

No período de reversão sexual as larvas utilizadas são as que têm até uma semana de vida e comprimento não superior a 8 mm. A temperatura da água deverá ser ao redor de 25 a 28°C. O período de tratamento com hormônio na ração é de 25 a 30 dias e nesta fase ocorrem muitas mortalidades.

A técnica da reversão sexual mais utilizada consiste no preparo de dieta com a adição de 60 gramas do hormônio 17 $\alpha$ -metiltestosterona em um litro de álcool etílico a 95% (Popma & Green, 1990; Guerrero III & Guerrero, 1997; Moreira et al., 2001; Pinto et al., 2007). A utilização desta técnica é essencial para uma atividade economicamente viável (Bombardelli et al., 2004). Com esta técnica, ou seja, com todos os indivíduos revertidos a machos, há possibilidade de aumento na homogeneidade do lote, bem como evitar a reprodução de tilápias nos tanques ou em tanques redes de terminação.

### 3. Literatura Citada

- ABRAHAM, S. N.; BEACHEY, E. H. **Host Defensi Mechanisms**. Gallin and A. s. Fauci (eds) Raven Press, New York, 1985.
- ALERTS, B. et al. **Biologia Molecular da célula**. 4ªed, Ed. Artmed. Porto Alegre, 2004.
- BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. São Paulo: Robe, 2ª Ed, 583p, 2003.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria. Ed. UFSM, 2002.
- BOMBARDELLI, R. A.; HAYASHI, C.; MEURER, F. et al. Masculinização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por banhos de imersão e o andrógeno dissolvido em solução de dimetilsulfóxido (DMSO). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. Maringá, v. 26, nº 2, p. 209-215, 2004.
- BUTOLO, E. A. F. Leveduras vivas e termolizadas na alimentação animal. **Simpósio Sobre Ingredientes na Alimentação Animal**. Campinas, 2001.
- CULJAK, V.; BOGUT, G; HAS-SHON, E; et al. K. Effect of Bio-MOS on performance and health of luvenile carp. **In: Nutrition and biotechnology in the feed and food industries: Alltech's 22and Annual Symposium**, Lexington, 2006.
- FEEDING TIMES. Antibióticos: a resistência já é realidade. Revista Feeding Times. Dublin, Republic of Irland. v. 03, nº1, 1998.
- FIRON, N.; ASHKENAZI; et al. **Infect And Immun**. 55:p. 472-476, 1987.
- FISCHER DA SILVA, A. V. **Efeitos da restrição alimentar precoce e da glutamina no desempenho e na mucosa intestinal em frangos**. Jaboticabal, 2001. 77 f. Tese (Doutorado em produção animal)- Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista.
- FOOD AND AGRICULTURES ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of Food Insecurity in the World. Vialle Delle Terme di Caracalla, 00153, Rome, Italy, 2006.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 125; 1995.
- GUERRERO III, R. D.; GUERRERO, L.A. Effects of androtenedione and mathyltestosterone on *Oreochromis niloticus* fry treated for sex reversal in outdoor net enclosure. **In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE**, 4 Orlando, v.12, p. 772-777, 1997.

- HISANO, H. **Levedura desidratada íntegra, autolisada e parede celular como pró-nutrientes para tilápia do Nilo**. 2005. 90 fls. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- HISANO, H.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M. et al. Zinco e levedura desidratada de álcool, como pró-nutrientes para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum Animal Sciences**. v. 26, n.2, p. 171-179, 2004.
- HISANO, H.; S., MAELI, D. P.; BARROS, M. M. et al. Levedura íntegra e derivados do seu processamento em rações para tilápia do Nilo: aspectos hematológicos e histológicos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**. v. 28, n.4, p. 311-318, Oct./Dec., 2006.
- HISANO, H.; SAMPAIO, F. G.; BARROS, et.al. Composição nutricional e digestibilidade aparente da levedura íntegra, da levedura autolisada e da parede celular pela tilápia-do-Nilo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n.1, p. 43-49, jan./mar. 2008.
- HOUGH, J. S. **Biotechnology de La cerveza y de malta**. Zaragoza: Acribia, 1990.
- ITO, N. M. K. Fisiopatologia do aparelho digestivo. **FACTA**, p. 170, 1994.
- JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Biologia celular**. 8ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2005.
- JUNQUEIRA, O. M. Avanços na nutrição de aves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA/III CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA. (XI: 2001: Goiânia). **Anais....** Goiânia: UFG, 2001.
- KOMM, F. H. **Atlas de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1978.
- LI, P.; GATLIN III, D.M. Evaluations of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as feed supplement for hybrid bass (*Morone chrysops x M. saxatilis*). **Aquaculture**. V. 219, p. 681-692. 2003.
- LI, P.; GATLIN III, D.M. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid bass (*Morone chrysops x M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 231, p. 445-4456, 2004.
- MACARI, M; MAIORKA, A. Função gastrointestinal e seu impacto no rendimento avícola. In: CONFERÊNCIA APINCO, 2000, Campinas. **Anais**, v. 2. Campinas: FACTA, 2000. 161-174.

- MARDINI, C. V.; MARDINI, L. B. L. F. **Cultivo de peixes e seus segredos**. Canoas: Ulbra, 2000.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 13/2004. Diário Oficial da União de 01/12/2004, seção 1, p.63.
- MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; et al. **Fundamentos da Moderna Aquicultura**. Ulbra. Canoas/RS. 200p. 2001.
- NEWMAN; K. E. Mannan oligosaccharide – A review of scientific data on this novel ingredient. **Alltech Technical Publications**. 2000.
- ORTUÑO, J; CUESTA, A. RODRIGUEZ, A.; et al. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Spaurus auratus* L.) **Veterinary Immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 85, p.41-50, 2002.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: O desafio é crescer**. Editores Antonio Ostrensky, José Roberto Borghetti e Doris Soto. Brasília, 276p., 2008.
- PINTO, C. S. R. M.; VERANI, N. F.; CAMPOS, B. E. S.; et al. Masculinização da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes rações e diferentes doses de 17 a-metiltestosterona. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Vol.29, nº3, 2000.
- POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, A; BELTRAME, E. **Aquicultura; Experiências Brasileiras**. Multitarefa, Florianópolis, 2004.
- POPMA, T. J.; GREEN, B. W. Aquacultural production manual: sex reversal of tilapia in earthen ponds. **R. Dev. Ser.**, Alabama, v.35, p.1-15, 1990.
- ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J.B.B *Glucans as immunostimulants in fish*. In: Stolen, J., Fletcher, T.C. (Eds) Modulators of Fish Immune Responses. **SOS Publications**, Fair Haven, NJ, pp 83-99, 1994.
- ROSE, A.H. Composition of the envelope layers of *Sacharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 74, p. 110-118, 1993.
- SAF DO BRASIL, PRODUTOS ALIMENTÍCIOS LTDA. Encarte: **Saf agri**, Rio de Janeiro, 2004.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v.172, p. 63-92, 1999.

- SANCHES, L. E. F.; HAYASHI, C. Densidade de estocagem no desempenho de larvas de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L), durante a reversão sexual. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 21, p. 619-625, 1999.
- SCHWARZ, K. S.; FRANCO, S.; FEDALTO, M. **Substituição de probióticos e prebióticos na alimentação de frangos e corte**. UFPR (Dissertação), Curitiba, 83p., 2002.
- SCHWARZ, K. S.; FANTA, E.; WERNECK, et al. **Dados preliminares do desenvolvimento e ganho de massa corpórea como consequência da utilização de mananoligossacarídeo na alimentação de juvenis de robalo-peva (*Centropomus parallelus*) e sua relação com as características teciduais**. UFPR, <http://25pgbiocel.bio.ufpr/ResumosPUB/0049.html>, Curitiba, 2005.
- SECRETARIA ESPECIAL DE AQUÍCULTURA E PESCA/SEAP. Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos renováveis – IBAMA. Diretoria de fauna e recursos pesqueiros. Estatística da pesca, 2005. Produção da aquíicultura, segundo as principais espécies de água doce. Disponível em [http://www.presidencia.gov.br/estrutura\\_presidencia/seap/estatistica/](http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/estatistica/), Acesso em 17/set/2008.
- SILVA, E. N. Probióticos e Prebióticos na alimentação de aves. **Conferência Apinco' 2000**. São Paulo: Facta, 2000.
- SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes – Revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 983-990, set-out, 2003.
- SISAK. **Alltech Technical Publications**. 1994.
- SPPRING, P. Yeast's secret wear pon aids animal production. **Feed Mix**. Special, p. 32, 2000.
- STAYKOV, Y.; DENEV, S; SPRING, P. **Influence of dietary mannan oligosaccharide (Bio-MOS) on e growth rate and immune of common carp (*Cyprinus carpio* L.)**. In: Howell B, Flos R (eds) Lessons from the past to optimize the future. European Aquaculture Societ, Special Publication. N 35, june, p. 431-432, 2005.
- STAYKOV, Y.; SPRING, P; SWEETMAN, J. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquacult Int**, v. 15, p. 153-161, 2007.
- VANDER, B. **Alltech Technical Publications**. 1997.
- WILSCH, U. **Histologia**. 5ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999.

- WHEATER, P. R.; BURKITT, H. G; DANIELS, V. **Histologia funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1994.
- ZENNOH. **Alltech Technical Publications**. 1995.
- ZHOU, X. Q.; LI, Y, L. The effects of Bio-Mos® on intestinal microflora and immune function of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio Var. Jian*). In: NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES: Proceedings of Alltec's 20<sup>th</sup> annual symposium, Lexington, 2004.
- ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. **Tilapicultura intensiva**. Cap. 9. Tópicos especiais em piscicultura de água doce. Tropical e intensiva. ESALQ/USP, S.P. Aquabio, 2004.

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar a inclusão de mananoligossacarídeo (MOS) em dietas de larvas no período de reversão sexual e juvenis de tilápias do Nilo sobre o desempenho produtivo, composição química da carcaça, parâmetros morfométricos da mucosa intestinal, coeficientes de digestibilidade da energia e nutrientes.

## CAPÍTULO 2

### **Mananoligossacarídeo em dietas para larvas de tilápias do Nilo no período de reversão sexual**

## **Mananoligossacarídeo em dietas para larvas de tilápias do Nilo no período de reversão sexual**

**RESUMO** - Este experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição de Peixes da Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de Paranaguá/FAFIPAR, objetivando avaliar níveis crescentes de mananoligossacarídeo (MOS) na dieta de larvas de tilápias do Nilo (linhagem Supreme®) na fase de reversão sexual durante 30 dias. Larvas de tilápia do Nilo (n=1500, P=0,01g ± 0,001g), foram distribuídas aleatoriamente em 30 tanques de 100 litros cada. Os peixes foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos e cinco repetições. A dieta controle (isenta de MOS) foi elaborada para conter aproximadamente 35% de proteína bruta e 3100 kcal de ED/kg. Os demais tratamentos foram suplementados com 0,15, 0,30, 0,45, 0,60 e 0,75% de MOS em substituição ao milho da dieta controle. Com o aumento nos níveis de inclusão de MOS nas dietas, foi observado aumento linear sobre o comprimento do intestino, altura das vilosidades intestinais e densidade dos vilos. Não houve diferença para composição corporal, ganho em peso, peso final, comprimento final, fator de condição e sobrevivência e número de células calciformes do intestino das larvas. Foi observado efeito quadrático a conversão alimentar em que os melhores resultados foram estimados com 0,34% de MOS, respectivamente. Concluiu-se que a utilização de MOS em dieta para larvas de tilápia - do N-nilo melhora a conversão alimentar, aumento do comprimento do intestino, altura das vilosidades e densidade de vilos intestinal, sendo que a inclusão de 0,34% de MOS é adequada em dietas para larvas de tilápias do Nilo.

Palavras-chave: desempenho, prebiótico, mucosa intestinal, peixe.

**Mannanligosaccharides in diets for Nile tilapia during the sexual reversion period**

**ABSTRACT** - This experiment was conducted in the Laboratory of Fish Nutrition of the Faculty State of Philosophy, Sciences and Letters of Paranaguá/FAFIPAR, to evaluate increasing levels of mannanligosaccharides (MOS). Nile tilapia larvae during the sex reversal were used. Nile tilapia larvae ( $n = 1500$ ,  $p = 0.01 \pm 0.001g$ ), were randomly distributed in 30 tanks of 100 liters each, for 30 days. The fish were distributed in a randomized design with six treatments and with five replicates. The control diet was elaborated to contain approximately 35% of crude protein and 3,100 kcal DE/kg and MOS was included at 0, 0.15, 0.30, 0.45, 0.60 or 0.75% of diet. A linear increase on the intestine length, intestinal villous height and villi density was observed with according to the dietary MOS inclusion. No differences of dietary MOS on body composition, weight gain, weight final, final length, condition factor, survival and number of goblet cells of the gut of the larvae were observed. A quadratic effect on feed conversion ratio was observed with according to the MOS inclusion and the best value was estimated with 0.34%, respectively. It was concluded that dietary MOS improves feed conversion and increase the length, villi height and density of intestinal villi and 0.34% of dietary MOS is adequate to be included in Nile tilapia larvae diets.

**Key words:** performance, prebiotic, intestinal morphology, fish.

## Introdução

No Brasil, a tilápia -do N-nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie exótica mais criada em tanques rede. No ano de 2004 a sua produção foi de 26% do total produzido na aquicultura nacional, sendo que 64% da produção e 67% da receita foi gerada pela tilápia produzida na América do Sul em 2004 (Ostrensky et al., 2008).

A reversão sexual é uma prática utilizada na aquicultura que tem como objetivo a produção de progênie 100% machos, com o objetivo da maior uniformidade de lote, além das facilidades de manejo e alimentação. Para isso, o hormônio  $17\alpha$  - metiltestosterona é adicionado na dieta, para induzir a formação do tecido gônadal masculino (Moreira et al., 2001).

O mananoligossacarídeo (MOS), proveniente da parede celular da levedura *Sacharomyces cerevisiae*, tem sido utilizado em dietas com o objetivo de melhorar a conversão alimentar, a integridade da mucosa intestinal e a saúde dos peixes, resultando em melhor ganho econômico, sendo este um novo conceito na aquicultura (Li & Gatlin III, 2004).

O MOS é um prebiótico, possuindo na sua composição química cerca de 40% de  $\beta$ -glucanos, 40% de  $\alpha$ -mananos, 28% de proteínas, 7% de lipídeos, 3% de substâncias inorgânicas e 2% de hexosaminas e quitina. O glucano representa o componente estrutural mais abundante e se localiza na parte interna da parede, enquanto o manano se localiza na parte externa (Hough, 1990).

A utilização destes polissacarídeos melhora a saúde de peixes (Robertsen et al., 1994; Sakai, 1999), atuando sobre o sistema imunológico e na prevenção da colonização de bactérias patogênicas no trato gastrintestinal do animal (Spring, 2001). Além disso, melhora a utilização de alguns nutrientes (Hisano, 2005) e, conseqüentemente, o desempenho produtivo dos mesmos (Li & Gatlin III, 2003;

Schwarz et al., 2005), havendo poucas informações sobre as ações desses prebióticos sobre a morfologia intestinal de peixes, especialmente durante a indução da reversão de sexo de tilápias, período em que a taxa de mortalidade é alta.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar níveis crescentes de MOS em dietas de larvas de tilápia no período de reversão sexual, sobre o desempenho produtivo, comprimento intestinal, morfolometria das vilosidades intestinais e contagem das células caliciformes.

### **Material e Métodos**

Larvas de tilápia do Nilo ( $n=1500$ ;  $P = 0.01 \pm 0,001$  g), oriundas da piscicultura Aquabel – Rolândia-PR, foram distribuídas aleatoriamente em 30 tanques de 100 litros cada, no Laboratório de Nutrição de Peixes da Faculdade Estadual de Filosofia, Ciências e Letras de Paranaguá/FAFIPAR, de novembro a dezembro de 2007, durante 30 dias.

Os peixes foram distribuídos em um experimento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições, sendo considerado como unidade experimental cada tanque de 100 L com 50 larvas.

A dieta controle foi elaborada para conter aproximadamente 35% de proteína bruta, 3124 kcal de ED/kg (Tabela 1), de forma a atender as exigências recomendadas pelo NRC (1993), para as tilápias. Como prebiótico, o MOS utilizado foi o produto comercial SAF-Mannan® contendo 23% de  $\beta$ -glucano e 21% de  $\alpha$ -mananos, 28% PB, 1% P, 95% MS, 20% gordura e 4% de cinzas, sendo o produto comercial incluído na proporção de 0; 0,15, 0,30, 0,45, 0,60 e 0,75% da dieta, em substituição ao milho.

Todos os alimentos foram moídos em moinho martelo com peneira contendo orifícios de 0,5 mm de diâmetro. Após adição e homogeneização dos ingredientes, foi

feita a inclusão de hormônio masculinizante. O hormônio  $17\alpha$  – metiltestosterona foi diluído na proporção de 60 mg em 400 ml de álcool 90°, e adicionado a dieta, sendo secado por 12 horas em temperatura ambiente, conforme recomendação de Hayashi (1995).

A dieta total foi distribuída, inicialmente, em seis refeições, às 08:00, 11:00, 14:00, 17:00, 20:00 e 23:00 horas. Posteriormente, após uma semana, as larvas receberam quatro refeições às 8:00, 12:00, 18:00 e 23:00 horas, por meio de arraçamento manual até saciedade aparente.

Diariamente, os tanques foram sifonados para a retirada das fezes, sendo mantida a renovação de 10% do volume total de água de cada tanque. A temperatura foi mensurada diariamente pela manhã às 8:00 horas e no período da noite às 23:00 horas. O pH, nitrito, amônia e oxigênio dissolvido para acompanhamento de qualidade da água dos peixes foram medidos a cada três dias, por Kit digital portátil. O oxigênio dissolvido foi mantido entre 4,0 a 6,0 mg/L por meio de pedra porosa acoplada a um soprador e, sendo a temperatura mantida entre 26 a 30°C por aquecedores de 80 Watts.

Tabela 1. Composição percentual e calculada (matéria natural) da dieta controle.

Ingrediente	(%)
Farelo de soja	50,00
Milho em grão	27,30
Farelo de trigo	9,20
Farinha de peixe	8,00
Fosfato bicálcico	1,50
Óleo de soja	2,90
DL-metionina	0,16
L-treonina	0,18
Suplemento mineral vitamínico <sup>1</sup>	0,50
BHT	0,02
Sal comum	0,24
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>
Matéria seca (%) <sup>1</sup>	92,53
Energia digestível (kcal/kg) <sup>2</sup>	3124
Proteína bruta (%) <sup>2</sup>	35,00
Fibra bruta (%) <sup>2</sup>	4,26
Extrato etéreo (%) <sup>2</sup>	5,38
Cálcio (%) <sup>2</sup>	1,20
Fósforo disponível (%) <sup>1</sup>	0,65

<sup>1</sup>Suplemento Mineral Vitamínico: Composição por kg: Vit. A=1200.000UI; vit. D3=200.000UI; vit. E=12.000 mg; vit. K3=2.400 mg; vit. B1=4.800 mg; vit. B2=4.800 mg; vit. B6=4.000 mg; vit. B12=4.800 mg; ácido fólico= 1.200 mg; pantotenato de Ca=12.000 mg; vitamina C=48.000 mg; biotina=48 mg; colina=65.000 mg; niacina=24.000 mg; Cu=600 mg; Fe=10.000 mg; Cu= 600 mg; Mg= 4.000 mg; Zn=6.000mg; I=20 mg; Co=2 mg e Se=20 mg. A adição de MOS foi realizada por meio da substituição do milho.

<sup>2</sup> De acordo com Pezzato et al. (2002).

Ao final do experimento, em cada unidade experimental, três peixes foram retirados ao acaso, abatidos pela secção medular, pesados, medidos o comprimento corporal e do intestino, sendo retirada a porção média, para as análises das vilosidades intestinais de cada tratamento, totalizando 90 peixes abatidos e 15 por tratamento para esta análise.

No preparo do tecido para a análise microscópica, a porção média dos intestinos coletados ficaram emergidos no período de 24 horas em solução fixadora de alfaque (85% de álcool 85°, 10% de formaldeído e 5% de ácido acético glacial), e o material foi transferido para a solução em álcool 70% por mais 24 horas.

O processamento das lâminas histológicas foi realizado no Laboratório de Histotécnica Animal da Universidade Estadual de Maringá, conforme procedimento de rotina, sendo submetido à desidratação, por tratamento com álcool em concentrações crescentes (70 a 100%). As amostras foram então diafanizadas e incluídas em parafina histológica. Os cortes foram realizados com sete micrômetros de espessura, cortados no sentido longitudinal, semis-seriados e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e outro conjunto de lâminas coradas pelo processo de histoquímica Schiff o PAS (do inglês Periodic acid-Schiff) por este reativo ter afinidade com as moléculas de glicogênio e proteoglicanas, presentes em células produtoras de muco, como as caliciformes para a sua melhor visualização.

Cada lâmina histológica, continha cerca de 12 porções de tecido, para análise. As imagens das lâminas histológicas foram capturadas com o auxílio de microscópio ótico acoplado a uma câmara de captura de imagem, com computador contendo placa de TV ao sistema analisador de imagens Leica (Image-Pro Plus versão 4.5.0.27).

Para as lâminas histológicas analisadas, foram escolhidos pelo critério de integridade seis tecidos por lâmina e por peixe. Foram medidas cinco vilosidades por tecido obtido por campo de captura de imagem, totalizando a leitura de 450 vilos por tratamento. Em seguida, foi realizada a captura de imagens por meio do “software”

Ipwin32.ex/image-Pro Plus, para a mensuração da altura das vilosidades, em micrometro e contagem de células caliciformes por vilo, em aumento de 40X. A densidade de vilos foi contada, de acordo com o campo de captura, ou seja, foram contadas todas as vilosidades contidas no campo de captura de imagem.

Todos os peixes foram pesados em balança analítica (0,0001 g) no início e no final do experimento, sendo o comprimento total obtido por meio de paquímetro digital eletrônico, com calibração e precisão.

A taxa de eficiência proteica foi calculada de acordo com a expressão descrita por Jauncey & Ross (1982). A composição química da carcaça foi obtida utilizando-se todos os peixes de cada unidade experimental com vísceras e escamas, excluindo-se os peixes utilizados para análise histológica. As análises bromatológicas foram realizadas conforme Silva & Queiroz (2002) no Laboratório de Nutrição Animal/LANA na Universidade Estadual de Maringá/UEM.

As análises químicas das dietas, carcaças foram analisadas no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá – UEM, seguindo a-se metodologia citada por Silva & Queiroz (2006).

O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ij} = b_0 + b_1(h_i - h) + b_2 (h_i - h)^2 + e_{ij}$$

*Em que:*

$Y_{ij}$  = observação referente ao tanque j, em que se utilizará o nível de mananligossacarídeo i;

$b_0$  = constante;

$b_1$  = coeficiente linear de regressão da variável Y, em função do nível de mananligossacarídeo i;

$h_i$  = porcentagem de nível de mananligossacarídeo ; sendo  $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$  e  $i_1 = 0, i_2 = 0,15, i_3 = 0,30, i_4 = 0,45, i_5 = 0,60, i_6 = 0,75$  de mananligossacarídeo.

$h$  = média da porcentagem do nível de mananligossacarídeo; e

$e_{ij}$  = erro aleatório associado a cada observação.

Os dados foram submetidos às análises de variância e regressão poligonal, por intermédio do programa SAEG (Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas) (UFV, 2000).

### **Resultados e Discussão**

Os valores dos parâmetros físico-químicos da água dos tanques, foram de 19 a 31°C, oxigênio dissolvido de 4,0 a 6,0mg/l, pH entre 6 a 7,5, amônia com valor médio de 0,25mg/l e nitrato 0,50mg/l, sendo que estes valores não diferiram entre os tratamentos. A variação dos parâmetros da qualidade da água se deu em virtude de alterações bruscas climáticas que ocorreram durante o período experimental.

Os valores médios de peso inicial, peso final, comprimento final, ganho de peso diário, fator de condição e sobrevivência das larvas de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de MOS, estão apresentados na Tabela 2.

Não foram observadas diferenças ( $P>0,05$ ) para peso final, ganho em peso, comprimento final, consumo de ração e taxa de sobrevivência para as larvas de tilápia do Nilo na fase de reversão sexual, e alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de MOS.

Tabela 2 – Desempenho de larvas de tilápia do Nilo, na fase de reversão, alimentadas com dietas com níveis crescentes de mananoligossacarídeo

Variável	Mananoligossacarídeo (%)						
	0	0,15	0,30	0,45	0,60	0,75	CV <sup>1</sup>
Peso inicial (mg)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
Peso final (mg)	0,70	0,69	0,75	0,72	0,69	0,80	15,19
Ganho em peso (mg)	0,70	0,69	0,74	0,72	0,68	0,80	15,31
Comprimento Inicial (mm)	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	5,59
Comprimento final (mm)	34,26	34,15	35,26	34,89	33,12	35,88	13,47
Conversão alimentar <sup>2</sup>	2,23	1,60	1,50	1,65	1,82	1,49	11,91
Taxa de sobrevivência	61,50	69,60	72,00	63,00	68,80	62,50	10,17

<sup>1</sup> Coeficiente de variação

<sup>2</sup> Efeito quadrático ( $P < 0,05$ ): conversão alimentar =  $(Y = 2,1687 - 0,0403X + 0,0588X^2 \ R^2 = 0,91)$ .

Para a taxa de sobrevivência, considerando a variação de temperatura que ocorreu durante o experimento (22 a 31°C), os valores obtidos são importantes, pois um dos problemas enfrentados pelas empresas de larviculturas e das pisciculturas são as altas taxas de mortalidade que ocorrem no início do povoamento dos tanques, devido entre outros fatores a variação da temperatura, é considerandao-se um constante desafio que ocorre em condições práticas.

De acordo com Tachibana et al. (2004), os valores de mortalidade obtidos no presente experimento são considerados comuns durante a fase de reversão sexual, em produções comerciais. Os dados de sobrevivência obtidos no presente estudo aproximaram-se dos valores encontrados por Maracanas (1997) que observou taxa de sobrevivência de tilápia do Nilo da linhagem tailandesa no valor de 62,50%, aproximando-se também dos valores encontrados por Vera Cruz & Mair (1994) com a taxa de 69%, para larvas de tilápias do Nilo.

Foi observado efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) na conversão alimentar, em que a melhor conversão foi estimada com 0,34% de MOS.

O melhor resultado de conversão alimentar provavelmente estão relacionados com o melhor aproveitamento das dietas em função do tempo de trânsito, digestibilidade e absorção dos nutrientes da dieta. Além disso, destaca-se a ação destes polissacarídeos em melhorar a saúde dos peixes (Robetsen et al., 1994; Sakai, 1999), atuando sobre o sistema imunológico e na prevenção da colonização de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal do animal (Spring, 2001). Também melhora a utilização de alguns nutrientes (Hisano, 2005) e, conseqüentemente, o desempenho produtivo dos mesmos (Li & Gatilin III, 2003; Schwarz et al., 2005).

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para a composição química da carcaça de larvas de tilápia do Nilo, na fase de reversão sexual para os teores de umidade, proteína, extrato etéreo, cinzas, cálcio e fósforo (Tabela 3).

Tabela 3 - Composição química da carcaça de larvas de tilápia do Nilo na fase de reversão, alimentadas com dietas com níveis crescentes de mananoligossacarídeo (matéria natural).

Variável	Mananoligossacarídeo (%)						CV <sup>1</sup>
	0	0,15	0,30	0,45	0,60	0,75	
Umidade	82,99	82,59	82,97	82,90	83,16	82,22	1,26
Proteína	10,58	10,69	10,57	10,67	10,51	10,99	2,09
Extrato etéreo	8,51	8,10	8,25	8,40	8,40	7,54	8,43
Cinzas	2,47	2,68	2,67	2,54	2,58	2,82	2,73
Cálcio	0,80	0,81	0,69	0,76	0,76	0,86	11,55
Fósforo	0,51	0,63	0,55	0,61	0,60	0,51	9,22

<sup>1</sup>Coeficiente de variação

Com o aumento nos níveis de inclusão de MOS nas dietas foi observado efeito quadrático sobre os dados da altura de vilosidades intestinais, e efeito linear para densidade de vilos e comprimento de intestino, não havendo diferença significativa para o número de células caliciformes (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros morfométricos da porção média do intestino e comprimento do intestino de larvas de tilápias do Nilo alimentadas com dietas em níveis crescentes de mananoligossacarídeo.

Parâmetro	Mananoligossacarídeo (%)						CV <sup>1</sup>
	0	0,15	0,30	0,45	0,60	0,75	
Altura do vilos (µm) <sup>2</sup>	37,53	44,69	41,37	43,30	49,83	47,95	16,18
Densidades de vilos <sup>2</sup>	7,60	8,13	9,00	9,55	9,61	9,35	17,62
Células caliciformes/vilos	6,34	7,64	8,01	7,67	7,19	8,43	15,49
Comprimento intestino total (mm)	97,84	126,37	127,7	129,25	138,41	139,08	16,52

<sup>1</sup> Coeficiente de variação

<sup>2</sup> Efeito linear: altura de vilos =  $Y=39,1370 + 13,1030X$ :  $R^2=0,68$ ; densidade de vilos =  $Y=7,872 + 2,71324X$ :  $R^2=0,80$ ; comprimento de intestino =  $Y=108,306 + 47,9577X$ .  $R^2 = 0,73$

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os trabalhos de Iji et al. (2001), Maiorka et al (2001) e Schwarz et al. (2002) que testaram o uso de mananoligossacarídeo na dieta de frangos de corte, obtendo valores significativos para altura de vilosidades.

Loddi (2003) avaliou o efeito da adição de MOS e acidificante orgânico sobre o desempenho e desenvolvimento da mucosa do intestino delgado de aves, observou que a suplementação com o MOS melhorou a conversão alimentar e aumentou a altura e perímetro de vilos, e que adição de MOS associado ou não a acidificantes orgânicos não influenciou a densidade de vilos em nenhuma porção do intestino delgado. Por outro lado, os dados deste experimento revelaram que o MOS teve influência positiva na densidade de vilos e o comprimento do intestino, obtendo assim uma mucosa com maior integridade.

No presente trabalho, os efeitos de MOS sobre os parâmetros de comprimento do intestino e altura de vilosidades podem ser explicados pela redução da colonização de bactérias, porque atua inibindo a aderência destas ao enterócito, por meio da ligação

com o glicocalix. A exclusão competitiva, também tem como princípio a aderência de bactérias não patogênicas, a sítios de ligação dos enterócitos (glicocalix) nos diferentes segmentos do trato gastrointestinal (Furlan, 2005).

Porém, conforme Gibson & Roberfroid, (1995) os prebióticos, em geral, não devem ser hidrolisados ou absorvidos no intestino delgado, e normalmente atuam como um substrato seletivo para um determinado grupo de bactérias comensais benéficas, sendo capaz de alterar de forma benéfica a microbiota intestinal. Isto leva a concluir, que uma vez o trato estando em condições saudáveis, a integridade da mucosa intestinal, tem melhores condições de desenvolvimento e “performance”, resultando em uma mucosa com vilos íntegros, de tamanho e densidade maiores, resultando no incremento do comprimento intestinal.

Os oligossacarídeos, presentes nos prebióticos, possuem de duas até 10 unidades de monossacarídeos (Bacila, 2003). As cadeias de oligossacarídeos são processadas no complexo de Golgi, nas células intestinais produtoras de muco (células caliciformes) teriam ligação com este processo de liberação de muco intestinal (Alberts et al., 2004; Junqueira & Carneiro, 2005). Esta possibilidade pode vir a ser um indício de que algumas partículas de oligossacarídeos, provindas dos prebióticos, possam ser absorvidas no trato gastrointestinal.

Outro fator de considerável relevância, é que os açúcares presentes no MOS, têm ligação com a formação e constituição com o citoesqueleto celular, conforme Alberts et al. (2004). E estas por sua vez, podem ter alguma influência na composição do tecido gastrointestinal, melhorando a sua morfologia.

Esta ligação pode interferir na integridade da mucosa, principalmente dos enterócitos, na sua borda escova ou nas microvilosidades, o que confere a capacidade desta célula absorptiva, resultar maior eficiência. Considerando ainda que o

posicionamento, conforme Furlan (2005) do glicocálix não apenas atua como um sistema de aderência da bactéria ao enterócito, mas que pode armazenar e concentrar as enzimas digestivas produzidas pelas bactérias, que atuariam sobre a mucosa, intestinal.

Junqueira & Carneiro (2005) citaram que, quanto maior o tamanho da vilosidade intestinal, maior é a capacidade que o animal possui para a absorção de alimentos. Isto vem ao encontro com os resultados obtidos, pois os tratamentos que tiveram MOS na sua composição resultaram no aumento da vilosidade intestinal, densidade de vilos e no comprimento do intestino. Culminando com isso uma maior área de absorção de nutrientes, confirmando assim os resultados de conversão alimentar, principalmente por não ter havido diferença significativa no consumo de ração e ganho em peso.

Com relação à contagem do número de células caliciformes os resultados obtidos no presente estudo revelaram algumas considerações de grande relevância, considerando que a principal função das células caliciformes é a produção de muco, que é constituído por glicoproteínas intensamente hidrofílicas, cuja função principal é proteger e lubrificar o revestimento do intestino (Junqueira & Carneiro, 2004). Quando um epitélio intestinal apresenta grande número de células caliciformes, isto pode ser um indicativo de um processo de agressão causado por bactérias, fungos, toxinas entre outros. Foi observado neste estudo que embora não haja diferença significativa entre os tratamentos para o número de células caliciformes ( $P > 0,05$ ), estas não aumentaram a sua quantidade em relação ao aumento da altura das vilosidades intestinais. Este fato pode ser um indicativo que uma vez a vilosidade estando em estado de integridade, e aliado a ação do MOS em atuar na redução de colonização por bactérias enteropatogênicas, o trato gastrointestinal intestinal pode estar em equilíbrio, não necessitando para isso de um “turnover” celular, para a regeneração ou integridade do tubo digestório de peixes.

A integridade da mucosa intestinal pode ser visualizada na Figura 1, onde são apresentadas as imagens da porção média do intestino de tilápias, após o período de reversão sexual, observando a densidade de vilos e altura das vilosidades intestinais das larvas tratadas com MOS na dieta.

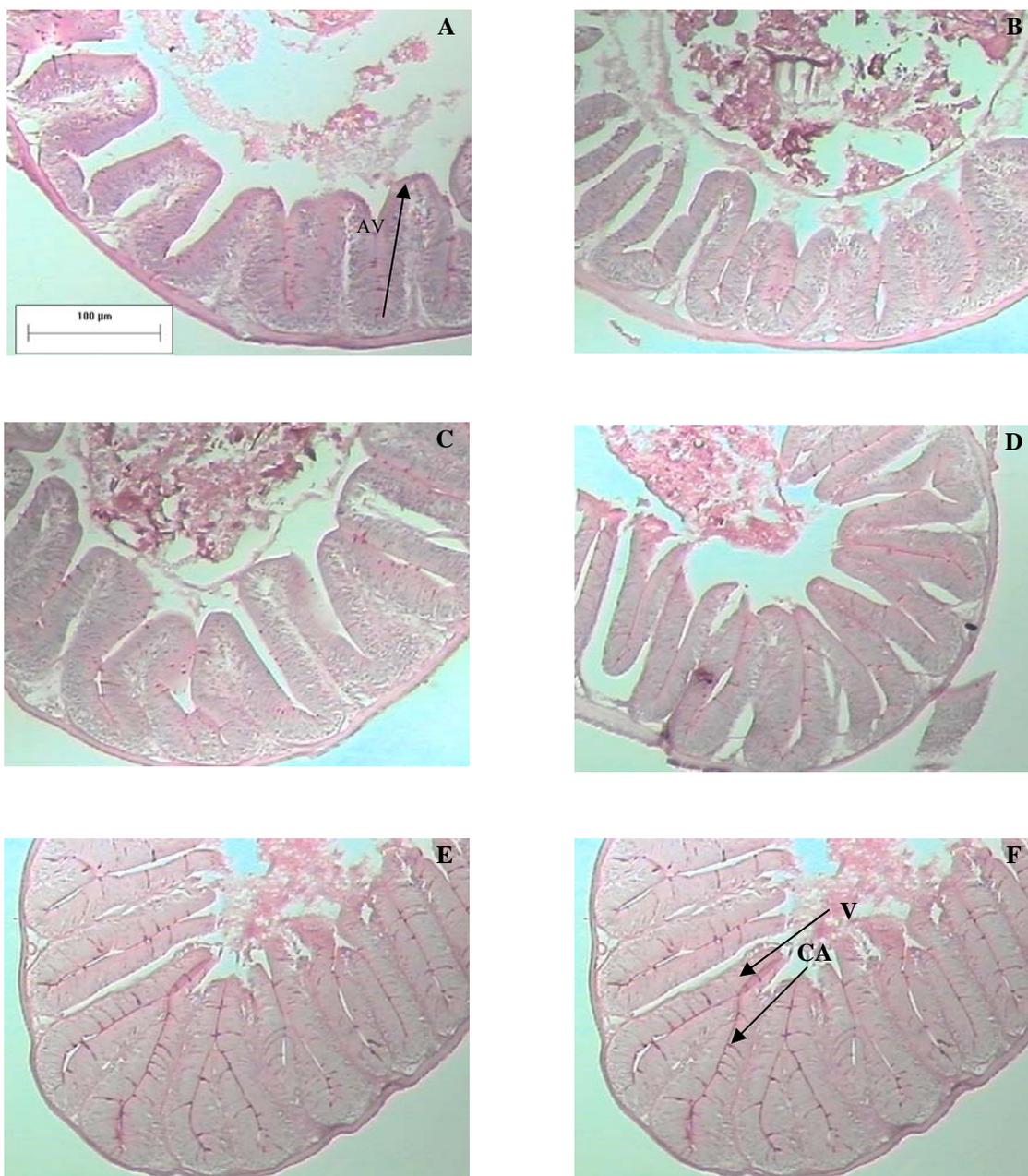


Figura 1: Imagem de microscópio óptico acoplado ao sistema analisador de imagens Leica (Image-Pro Plus versão 4.5.0.27). Observar as diferenças da densidade de vilos e da integridade do tecido intestinal. A 0%, B 0,15%, C 0,30%, D 0,45%, E 0,60%, F 0,70% de MOS na dieta. AV= altura de vilosidade; CA= células calciformes; V= vilosidades. Coloração: P.A.S. Barra 100µm.

Os dados do presente estudo demonstraram a ação prebiótica do MOS em dietas para larvas de tilápias do Nilo, durante o período de reversão sexual. A ação do MOS sobre a morfometria intestinal e possivelmente por outros mecanismos, contribuem para uma melhor saúde intestinal, propiciando melhor utilização dos nutrientes e consequentemente o desempenho produtivo dos peixes.

### **Conclusões**

A utilização de 0,34% de MOS é recomendado em dietas para larvas de tilápias do Nilo para o desempenho produtivo, podendo o prebiótico ser incluído em até 0,75% da dieta, sem prejuízos sobre a conversão alimentar, resultando em melhorias nas características morfométricas do intestino.

### Literatura Citada

- ALERTS, B. et al. **Biologia Molecular da célula**. 4ªed, Ed. Artmed. Porto Alegre, 2004.
- BACILA, M. **Bioquímica veterinária**. São Paulo: Robe, 2ª Ed, 583p, 2003.
- FURLAN, R. L. Avaliação e uso de pré e probióticos. VI SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA. Chapecó, 05 a 07 de abril de 2005.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M.M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125; 1995.
- HAYASHI, C. Breves considerações sobre tilápias. In: RIBEIRO, R.P.; HAYASHI, C; FURUYA, W. M.. (Eds). **Curso de piscicultura – criação racional de tilápias**. 1 ed. Maringá: ADUEM, p.4, 1995.
- HISANO, H. **Levedura desidratada íntegra, autolizada e parede celular como pró-nutrientes para tilápia do Nilo**. 2005. 90 fls. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- HOUGH, J. S. **Biotechnology de La cerveza y de malta**. Zaragoza: Acribia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1990.
- IJI, P.A.; SAKI, A.A.; TIVEY, D.R. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. **J. Sci. Food Agric.**, v.81, p. 1186-1192, 2001.
- JAUNCEY, K.; ROSS, B. **A guide to tilapia feeds and feeding**. Scotland: University, 1982.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Biologia celular**. 8ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2005.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008.
- LI, P.; GATLIN III, D.M. Evaluations of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as feed supplement for hybrid bass (*Morone chrysops x M. saxatilis*). **Aquaculture**. V. 219, p. 681-692. 2003.
- LI, P.; GATLIN III, D.M. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid bass

- (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 231, p. 445-4456, 2004.
- LODDI, M.M. **Probióticos, prebióticos e acidificantes orgânicos em dietas para frangos de corte**. 2003. Tese (Doutorado em Zootecnia), FCAV, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.
- MAIORKA, A.; SANTINI, E.; SUGETA, S.M. et al. Utilização de prebióticos, probióticos ou simbióticos em dietas para frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n.1, 2001.
- MARACANAS, JM et al. Genotype and environment: A comparative evaluation of four tilapia stocks. In Fiji, *Aquaculture*, v. 150, p. 11-24, 1997.
- MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; et al. **Fundamentos da Moderna Aquicultura**. ULFLA, Canoas, 2001.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC **Nutrient Requirements of warmwater fishes and shellfishes**. Washington: National Academy Press. 1993. 102p.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: O desafio é crescer**. Brasília, 276p., 2008.
- PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; PEZZATO, A.C. et al. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.4, p.1595-1604, 2002.
- ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J.B.B *Glucans as immunostimulants in fish*. In: Stolen, J., Fletcher, T.C. (Eds) **Modulators of Fish Immune Responses**. SOS Publications, Fair Haven, NJ, pp 83-99, 1994.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, C. **Análise de alimentos** (Métodos químicos e biológicos). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- SPPRING, P. Yeast's secret wear on aids animal production. **Feed Mix**. p. 32, 2001.
- TACHIBANA, L.; CASTAGNOLI, N.; PEZZATO, L. E.; et al. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. **Acta Scientiarum Animal Sciences**. v. 26, n. 3, p.305-311, 2004.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v.172, p. 63-92, 1999.
- SCHWARZ, K. S.; FRANCO. S; FEDALTO, M. Substituição de probióticos e prebióticos na alimentação de frangos e corte. UFPR (Dissertação), Curitiba, 83p., 2002.

- SCHWARZ, K. S.; FANTA, E.; WERNECK, P. R.; et al. Dados preliminares do desenvolvimento e ganho de massa corpórea como consequência da utilização de mananoligossacarídeo na alimentação de juvenis de robalo-peva (*Centropomus parallelus*) e sua relação com as características teciduais. **UFPR**, <http://25pgbiocel.bio.ufpr/ResumosPUB/0049.html>, Curitiba, 2005.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 4ª ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- UFV – UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. SAEG – **Sistema de análises estatísticas e genéticas**. Versão 8.0 Viçosa, MG: 2000. (CD-ROM).
- VERA CRUZ, E. M. & MAIR, G.C. Conditions for effective androgen sex reversal in *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v.122, p.27-248, 1994.

## CAPÍTULO 3

**Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo**

## **Mananligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo**

**RESUMO** – O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a inclusão de mananligossacarídeo (MOS) em dietas para juvenis de tilápias do Nilo. Foram utilizados 224 peixes, com peso vivo inicial médio de aproximadamente 25g. Os peixes foram distribuídos em um delineamento em blocos ao acaso, sendo considerado como bloco cada tanque de 1000 L com 16 gaiolas de 0,12 m<sup>3</sup> cada, com uma gaiola de cada tratamento. Os tanques foram mantidos em sistema de recirculação (10 L/minuto/tanque) de água com aeração suplementar e biofiltro, alimentados manualmente, quatro vezes por dia, durante 53 dias. Foi utilizada dieta controle com 28,5% de proteína bruta e 2855 kcal de energia digestível/kg sem MOS para as demais dietas. Foi adicionado MOS nas proporções de 1, 2 ou 3% em substituição ao milho da dieta controle. Os coeficientes de digestibilidade foram determinados pelo método de Guelph modificado e o óxido de cromo foi utilizado como indicador. Não foi observado efeito dos níveis de inclusão de MOS sobre o consumo, índice hepatossomático, sobrevivência, umidade e cinzas na corporal, coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, energia bruta, proteína bruta, extrato etéreo e disponibilidade das cinzas, densidade de vilos e número de células caliciformes por vilos. Os melhores resultados de consumo, conversão alimentar, taxa de eficiência proteica, e teores de proteína e extrato etéreo na carcaça foram obtidos em peixes que consumiram a dieta com 1% de MOS. Concluiu-se que a inclusão de até 1% de MOS é adequada em dietas para juvenis de tilápias do Nilo.

Palavras-chave: desempenho, prebiótico, mucosa intestinal, peixe.

## **Mannanligosaccharides in diets for Nile tilapia, juveniles**

**ABSTRACT** - This study was carried out to assess the inclusion of mannanligosaccharides (MOS) in diets for Nile tilapia juveniles. Two-hundred and twenty fish with an average initial weight of approximately 25g were used, distributed in a randomized blocks design, as block was considered each tank of 1,000 L with four cages (0.12 m<sup>3</sup> each), with one cage from each treatment. A recirculation systems (10 L/minute/tank) with supplemental aeration and a biofilter was used. The fish were fed manually, four times a day byfor 53 days. A control diet with 28.5% of crude protein and 2855 kcal of digestible energy/kg was used and MOS was included at 1, 2 or 3% of the control diet. The apparent digestibility coefficients were determined by modified Guelph method using chromic oxide as inert indicator. No effects of MOS on feed intake, hepatossomatic index, survival, body moisture and ash, apparent digestibility coefficients of dry matter, gross energy, crude protein, ether extract and ash availability and number of goblet cells per villus were observed. The best values of feed intake, feed conversion ratio, protein efficiency ratio, and body composition were observed in fish fed with 1% of dietary MOS. It was concluded that 1% of dietary MOS is adequate for Nile tilapia, juveniles.

Key words: performance, prebiotic, intestinal morphology, fish.

## Introdução

No Brasil, a tilápia do Nilo-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie de peixe mais criada em sistema intensivo. Em função do rápido crescimento, boa conversão alimentar e carne com características sensoriais desejáveis, sendo possível a comercialização de filés sem espinhos intramusculares, o que facilita sua comercialização nos mercados interno e externo.

A restrição ao uso de antibióticos e quimioterápicos na nutrição animal, como promotores de crescimento, ocorre em função da possível resistência cruzada de patógenos em seres humanos, e alternativas nutricionais estratégicas são necessárias para suprir esta necessidade (Mountzouris et al., 2006). Para isso, tem-se preconizado o uso de promotores de crescimento alternativos na nutrição animal, que não proporcionem resíduos na carcaça e ao ambiente. Entre estes promotores, os probióticos, prebióticos, simbióticos e nutracêuticos têm sido estudados.

O mananoligossacarídeo (MOS) é um prebiótico, derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que possui cerca de 40% de  $\beta$ -glucanos, 40% de  $\alpha$ -mananos, 28% de proteínas, 7% de lipídeos, 3% de substâncias inorgânicas e 2% de hexosaminas e quitina. O glucano é mais abundante e fica localizado se localiza na parte interna da parede, enquanto o manano fica se localiza na parte externa (Hough, 1990). Um dos modos de ação do MOS, é a adsorção de agentes patógenos que podem colonizar o trato gastrintestinal ligando-se aos açúcares manose na superfície do intestino. Ao fornecer uma rede de manose no complexo manano, os patógenos ligam-se à rede e são expelidos do sistema (Feeding Times, 1998).

O MOS pode melhorar a saúde de peixes (Robertsen et al., 1994; Sakai, 1999), considerando a sua ação no sistema imunológico e na prevenção da colonização de bactérias patogênicas no trato digestivo (Staykov et al., 2005; Staykov et al., 2007),

melhorando o desempenho de peixes (Zou & Li, 2004; Culjak et al., 2006; Staykov et al., 2007).

Em robalo-peva (*Centropomus paralellus*) 0,3% de MOS na dieta apresentou melhores resultados no ganho em peso, comprimento, altura do peixe, homogeneidade de lote e menor estresse comportamental durante o manejo diário (Schwarz et al., 2005). Hisano et al. (2006) observaram em tilápias um maior perímetro das vilosidades intestinais, sem alteração nos padrões hematológicos, em peixes que receberam dietas com parede celular de levedura de cana de açúcar. Os resultados obtidos por estes autores demonstraram haver possibilidade de melhores efeitos com a inclusão de níveis superiores a 0,3% dos componentes de parede celular.

Na criação intensiva, os peixes são submetidos ao estresse constante pelas altas taxas de densidade preconizadas, sendo importante a utilização de compostos que possam contribuir para a saúde dos peixes, e que irão refletir de forma direta ou indireta sobre o desempenho produtivo.

Resultados positivos também foram obtidos por Staykov et al. (2007) que estudaram os efeitos do MOS em dieta de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) em tanques rede, concluindo que a ação do MOS melhorou o crescimento, taxa de sobrevivência e imunidade dos peixes.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar dietas contendo 0, 1, 2 e 3% de MOS sobre o desempenho produtivo, coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes e da mucosa intestinal de juvenis de tilápia do Nilo.

### **Material e Métodos**

Juvenis de tilápia do Nilo (n=224; P=23,0 1,5 g), originados da Piscicultura Aquabel – Rolândia-PR, foram distribuídos aleatoriamente em 16 gaiolas de 0,12 m<sup>3</sup>

cada, no Laboratório de Aquicultura – DBI/Nupelia/UEM, de fevereiro de 2006 a abril de 2006, durante 53 dias.

Os peixes foram distribuídos em um experimento em blocos ao acaso, sendo considerado como bloco cada tanque de 1000 L com quatro gaiolas (0,12m<sup>3</sup> cada) com uma repetição de cada tratamento. Os tanques foram mantidos em um sistema de recirculação contínuo de água (10 L/minuto), aeração complementar por meio de um soprador de forma a manter os valores de oxigênio entre 5 a 6 mg/L.

A dieta controle foi elaborada para conter aproximadamente 28% de proteína bruta, 2900 kcal de ED/kg (Tabela 1), de forma a atender as exigências recomendadas pelo NRC (1993), para a espécie. Como prebiótico, o MOS utilizado foi o produto comercial (SAF-Mannan®) contendo 23% de  $\beta$ -glucano e 21% de  $\alpha$ -mananos, 28% de proteínas, 7% de lipídeos, 3% de substâncias inorgânicas e 2% de hexosaminas e quitina, sendo o produto comercial incluído na proporção de 0; 1; 2; e 3% da dieta.

Todos os alimentos foram moídos em moinho martelo, com peneira de 0,5 mm, de forma a se obter grânulos com diâmetro igual ou inferior a 0,50 mm. Após adição e homogeneização dos ingredientes, foi adicionada água (52°C) na proporção de 30% sobre o peso seco da dieta, sendo as dietas granuladas em moedor de carne e desidratadas em estufa de ventilação forçada por 12 horas.

Tabela 1 - Composição percentual na dieta controle.

Ingrediente	(%)
Farelo de soja	50,00
Milho em grão	27,30
Farelo de trigo	9,20
Farinha de peixe 55%	8,00
Fosfato bicálcico	1,50
Óleo de soja	2,90
DL-metionina	0,16
L-treonina	0,18
Suplemento mineral vitamínico <sup>1</sup>	0,50
BHT	0,02
Sal comum	0,24
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>
Matéria seca (%) <sup>2</sup>	90,643
Energia digestível (kcal/kg) <sup>2</sup>	2855
Proteína bruta (%) <sup>2</sup>	28,51
Fibra bruta (%) <sup>2</sup>	4,26
Extrato etéreo (%) <sup>2</sup>	3,68
Cálcio (%) <sup>2</sup>	1,20
Fósforo disponível (%) <sup>3</sup>	0,65

<sup>1</sup> Suplemento Mineral Vitamínico: Composição por kg: Vit. A=1200.000UI; vit. D3=200.000UI; vit. E=12.000 mg; vit. K3=2.400 mg; vit. B1=4.800 mg; vit. B2=4.800 mg; vit. B6=4.000 mg; vit. B12=4.800 mg; ácido fólico= 1.200 mg; pantotenato de Ca=12.000 mg; vitamina C=48.000 mg; biotina=48 mg; colina=65.000 mg; niacina=24.000 mg; Cu=600 mg; Fe=10.000 mg; Cu= 600 mg; Mg= 4.000 mg; Zn=6.000mg; I=20 mg; Co=2 mg e Se=20 mg. A adição de MOS foi realizada por meio da substituição do milho.

<sup>2</sup> Valores determinados no Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal – DZO/UEM

<sup>3</sup> De acordo com Furuya et al. (2001)

A dieta total foi distribuída em três refeições, às 8h, 14h e 17 horas, por meio de arraçamento manual até saciedade aparente.

Ao longo de todo o experimento foram mensurados os parâmetros de temperatura, pH e oxigênio dissolvido da água dos tanques, por meio de Kit digital portátil. O oxigênio dissolvido foi mantido entre 4 a 6 mg/L por meio de pedra porosa acoplada a

um soprador e, sendo a temperatura mantida entre 28 a 30°C por meio de aquecedores de 200 Watts e termostato. Todos os peixes foram pesados em balança semianalítica semi-analítica (0,001 g) no início e no final do experimento.ca

Em cada unidade experimental, após um jejum de 12 horas, três peixes foram retirados ao acaso, emergidos em solução anestésica de Eugenol: 300mg/L (Vidal et al., 2008), pesados, medidos e abatidos pela secção medular e retirados à porção média do intestino, para as análises da mucosa intestinal de cada tratamento, totalizando 48 peixes abatidos, sendo 12 por tratamento. Os peixes para esta análise ficaram cerca de doze horas em jejum.

Após 24 horas de permanência em solução de “Bouin”, o material foi lavado em álcool 70% até a retirada do ácido pícrico e, em seguida, submetido à desidratação, por tratamento com álcool em concentrações crescentes (70 a 100,0%). As amostras foram então diafanizadas e incluídas em parafina histológica. Os cortes transversais, com sete micrômetros de espessura, semiseriados semi-seriados, foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e outros cortes na mesma proporção foram corados pela citoquímica com o ácido periódico de Schiff o PAS (do inglês Periodic acid-Schiff) por este reativo ter afinidade com as moléculas de glicogênio e proteoglicanas, presentes em células produtoras de muco, como as caliciformes. As lâminas histológicas foram analisadas com o auxílio de microscópio ótico acoplado ao sistema analisador de imagens Leica (Image-Pro Plus versão 4.5.0.27).

Foram analisados dez cortes por lâmina histológica, onde foram escolhidos, pelo critério de nitidez e integridade do corte, três tecidos por lâmina histológica e medidas três vilosidades, totalizando a leitura de 108 vilos por tratamento. Em seguida, foi realizado no Laboratório de Metrologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná/Curitiba a captura de imagens por meio do “software” Ipwin32.ex/image-Pro

Plus, para a mensuração da altura das vilosidades, em micrômetro e contagem de células caliciformes por vilo medido (do início do vilo, região da cripta ao ápice da vilosidade) em aumento de 40X.

A composição química da carcaça foi obtida utilizando-se oito peixes de cada unidade experimental. O índice hepatossomático foi calculado da razão entre o peso do fígado o peso vivo do peixe, de acordo com a expressão:

$$IHS = \frac{PF}{PV} \cdot 100$$

*Em que:*

*IHS = índice hepatossomático-somático;*

*PF = peso do fígado (g);*

*PV = peso vivo (g).*

A taxa de eficiência proteica foi calculada de acordo com a expressão descrita por Jauncey & Ross (1982):

$$TEP = \frac{GP}{PC}$$

*Em que:*

*TEP = taxa de eficiência proteica (%);*

*GP = ganho em peso (g);*

*PC = proteína consumida (g).*

Para a determinação dos coeficientes de digestibilidade aparente, as dietas utilizadas no experimento de desempenho foram moídas e, como indicador, foi adicionado 0,1% de óxido de cromo ( $Cr_2O_3^{III}$ ). Em seguida foi adicionada água (52 °C; 30% peso seco da dieta) para posterior granulação em moinho de carne elétrico e secagem em estufa de ventilação forçada (52 °C) durante 12 horas.

Para a coleta de fezes de cada dieta, 22 peixes ( $25 \pm 8$  g) foram distribuídos em dois tanques de digestibilidade de 200L cada, sendo a coleta de fezes realizada diariamente às 8 e 17 horas, durante cinco dias para formar um “pool” de amostras

de cada tanque tipo funil, que foi considerado como repetição. Para a troca de dieta foi estabelecido intervalo de cinco dias para adaptação dos peixes a nova dieta. O material coletado foi desidratado em estufa de ventilação forçada à temperatura de 55 °C durante 48 horas. Após secagem, o material foi moído em moinho bola, identificado e armazenado em refrigerador para posterior análise.

Os coeficientes de digestibilidade da energia e nutrientes das dietas foram determinados de acordo com a expressão descrita por Nose (1960):

$$CDA = 100 - \left[ 100 \cdot \left( \frac{\%I_d}{\%I_f} \right) \cdot \left( \frac{\%N_f}{\%N_d} \right) \right]$$

*Em que:*

*CDA = coeficiente de digestibilidade aparente (%);*

*%I<sub>d</sub> e %I<sub>f</sub> = % Indicador na dieta e nas fezes, respectivamente;*

*%N<sub>f</sub> e %N<sub>d</sub> = % de nutriente nas fezes e na dieta, respectivamente.*

As análises químicas das dietas, carcaças e fezes foram analisadas no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá –UEM, seguindo -sea metodologia citada por Silva & Queiroz (2006).

Para as análises estatísticas dois métodos foram utilizados o teste de Dunett e de regressão poligonal, sendo que para o teste de Dunett o modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ij} = b_o + S_i + e_{ij}$$

*Em que:*

*Y<sub>ij</sub> = observação referente ao tanque j, em que se utilizará o nível MOS<sub>i</sub>*

*b<sub>o</sub> = constante*

*S<sub>i</sub> = efeito da suplementação na dieta i; sendo i = níveis 0, 1, 2 e 3%*

*e<sub>ij</sub> = erro aleatório associado a cada observação*

A análise por regressão poligonal, o modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ij} = b_o + b_1(h_i-h) + b_2 (h_i-h)^2 + e_{ij}$$

*Em que:*

$Y_{ij}$  = observação referente ao tanque j, em que se utilizará o nível MOS i;

$b_o$  = constante;

$b_1$  = coeficiente linear de regressão da variável Y, em função do nível de MOS i;

$h_i$  = porcentagem de nível de MOS; sendo  $i = 1, 2, 3, 4$  e  $i_1 = 0, i_2 = 1, i_3 = 2$  e  $i_4 = 3\%$  de MOS.

$h$  = média da porcentagem do nível de MOS; e

$e_{ij}$  = erro aleatório associado a cada observação.

Os dados foram submetidos às análises pelo teste de Dunett utilizando o programa Statistix.

## **Resultados e Discussão**

Não houve mortalidade durante o período experimental, e não foi observado efeito ( $P > 0,05$ ) dos níveis de inclusão de MOS sobre o ganho de peso, consumo alimentar, índice hepatossomático e rendimento de carcaça. A utilização de MOS influenciou o consumo, conversão alimentar e taxa de eficiência proteica dos peixes (Tabela 2).

Tabela 2 – Desempenho de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de mananoligossacarídeo (MOS).

Variável	Mananoligossacarídeo (%)				CV <sup>1</sup>
	Controle	1	2	3	
Peso inicial (g)	23,96	24,25	23,65	23,83	1,73
Ganho em peso (g)	62,61	67,38	66,85	60,90	5,38
Consumo alimentar (g/peixe)	92,14	90,51	93,44	91,52	4,23
Conversão alimentar <sup>2</sup>	1,47 <sup>a</sup>	1,35 <sup>b</sup>	1,40 <sup>ab</sup>	1,51 <sup>a</sup>	3,21
Taxa de eficiência proteéica <sup>2</sup>	2,43 <sup>b</sup>	2,66 <sup>a</sup>	2,56 <sup>ab</sup>	2,38 <sup>b</sup>	3,30
Rendimento de carcaça	86,63	86,04	86,59	86,31	1,31
Índice hepatossomático	2,72	2,54	3,02	3,52	21,9

<sup>1</sup> Coeficiente de variação.

<sup>2</sup> Letras distintas na mesma linha, indicam diferenças pelo teste de Dunett ( $P > 0,05$ ) entre as médias dos tratamentos e grupo controle.

Os resultados de ganho em peso obtidos pelos peixes que receberam dietas suplementadas com o MOS, de acordo com o teste de Dunett ( $P > 0,05$ ) corroboram com os encontrados por Hisano et al. (2005), que não observaram diferenças sobre o ganho em peso de juvenis de tilápias alimentados com dietas sem e com 0,1, 0,2 e 0,3% de inclusão de componentes da parede celular de levedura de cana que apresenta composição similar ao do MOS.

Por outro lado, o teste de regressão poligonal obtido por este estudo mostrou um efeito quadrático para o ganho de peso, conversão alimentar e taxa de eficiência proteéica, corroborando com Zou & Li, (2004), Culjak et al. (2006) e Staykov et al. (2007), que trabalharam com carpa (*Cyprinus carpio* Var. Jiam), carpa (*Cyprinus carpio* L) e truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) respectivamente. Estes autores trabalharam com a dosagem aproximada de 0,2% de MOS na dieta e obtiveram valores significativos no desempenho produtivo, para os peixes tratados com MOS na dieta.

As respostas de conversão alimentar e taxa de eficiência proteéica obtidas pelos peixes que receberam as dietas com o MOS, encontradas nesta pesquisa, podem estar

relacionados com os efeitos benéficos dos componentes da parede celular sobre uma menor taxa de passagem da dieta conforme Dabrowski et al. (1980), possibilitando melhor digestão e absorção dos nutrientes. Também deve ser considerado que os PNAs (polissacarídeos não amiláceos), sendo que os  $\beta$ -glucanos são polímeros lineares de glicose e os  $\alpha$ -mananos são constituídos de polímeros de glicose e manose, podendo aumentar a viscosidade do bolo alimentar, diminuindo a velocidade de trânsito e consequentemente de consumo, pois a formação de gel pode dificultar a digestão. Além da menor taxa de passagem da dieta a utilização da proteína obtida pelos peixes, pode estar relacionada pelo fato do MOS possuir na sua composição química proteínas, entre outras substâncias que poderiam ter contribuído para uma maior eficiência proteica. A adição de MOS resulta em melhora na saúde dos peixes (Robertsen et al., 1994; Sakai, 1999), considerando sua ação sobre o sistema imunológico e na prevenção da colonização de bactérias patogênicas no trato gastrintestinal do animal (Spring, 2001; Staykov et al., 2005; Staykov et al., 2007), resultando em melhoria do desempenho de peixes ( Li & Gatilin III, 2003; Zou & Li, 2004; Schwarz et al., 2005; Culjak et al., 2006; Staykov et al., 2007) melhoria da digestibilidade de alguns nutrientes (Hisano et al., 2005).

Não foi observado efeito ( $P>0,05$ ) dos níveis de inclusão de MOS sobre os teores de umidade, extrato etéreo e cinzas da carcaça. Por outro lado, a inclusão de MOS resultou em efeito quadrático e significância pelo teste de Dunnett ( $P<0,05$ ) sobre o conteúdo de proteína e extrato etéreo na carcaça dos peixes alimentados com MOS (tabela 3).

Tabela 3 - Composição química da carcaça de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas sem e com mananoligossacarídeo (matéria natural).

Variável	Mananoligossacarídeo (%)				CV <sup>1</sup>
	0	1	2	3	
Umidade	70,01	70,91	70,18	72,03	0,74
Proteína <sup>2</sup>	16,73 <sup>a</sup>	15,77 <sup>ab</sup>	16,21 <sup>ab</sup>	14,74 <sup>b</sup>	2,28
Extrato etéreo <sup>2</sup>	10,18 <sup>a</sup>	9,38 <sup>b</sup>	9,21 <sup>b</sup>	9,05 <sup>b</sup>	3,67
Cinzas	3,21	2,91	3,07	2,99	8,47

<sup>1</sup> Coeficiente de variação.

<sup>2</sup> Letras distintas na mesma linha, indicam diferenças pelo teste de Dunett ( $P < 0,05$ ).

No presente estudo, o menor conteúdo de gordura corporal em peixes que receberam dietas com MOS parece ter pouca relação com o conteúdo de proteína da carcaça em detrimento à deposição de gordura.

Também, não foi observado efeito ( $P > 0,05$ ) da inclusão de MOS sobre os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, energia bruta e cinzas. A inclusão de MOS resultou em efeito ( $P < 0,05$ ) sobre o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína, porém sem efeito pelo teste de Dunett (Tabela 4).

Tabela 4 – Coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca, energia bruta, proteína bruta e cinzas de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas sem e com mananoligossacarídeo.

CDA (%)	Mananoligossacarídeo (%)				CV <sup>1</sup> (%)
	0	1	2	3	
Matéria seca	63,80	63,62	63,56	63,52	0,37
Energia bruta	78,20	76,28	76,08	77,35	1,35
Proteína bruta	85,57	88,17	90,41	86,96	1,20
Cinzas	72,99	78,46	78,86	75,14	8,69

<sup>1</sup> Coeficiente de variação

Contrariamente ao obtido no presente trabalho, Hisano et al. (2005) observaram efeito linear crescente da inclusão de parede celular de levedura sobre o coeficiente de digestibilidade aparente dos minerais. No presente estudo, o elevado coeficiente de variação, de 8,69%, em relação ao observado no trabalho do autor anteriormente citado, de 5,28%, pode ter contribuído para as diferenças quanto ao resultado da análise estatística da adição de componentes de parede celular sobre o aproveitamento da fração dos minerais da dieta.

Os piores resultados sobre o ganho em peso, conversão alimentar, taxa de eficiência proteica, baixa retenção de proteína na carcaça e coeficiente de digestibilidade da proteína em peixes alimentados com o valor de 3% da inclusão de MOS na dieta, podem estar relacionadas ao fato da levedura que originou o MOS ter apresentado uma parede celular bastante espessa, podendo representar até 30% da MS total, que são relativamente resistentes à degradação enzimática no trato gastrintestinal, o que teria prejudicado a eficiência de utilização das dietas. A baixa digestibilidade da parede celular da levedura (34,7%) foi determinada por Hisano et al. (2005), para juvenis de tilápias do Nilo. Além disso, os resultados negativos podem estar relacionados com o aumento da viscosidade das dietas que dificultam o acesso das enzimas digestivas aos nutrientes o que piora a digestibilidade da proteína, conforme observado na tabela acima (se fosse pela presença de PNA a digestibilidade da energia, dos minerais e da gordura também seriam prejudicados).

Com o aumento nos níveis de inclusão de MOS nas dietas foi observado significância sobre a altura das vilosidades intestinais (vilos) e nenhuma pelo teste de Dunett, como descritos na Tabela 5.

Tabela 5- Altura das vilos, densidade de vilos e número de células caliciformes/vilo do intestino de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas sem e com mananoligossacarídeo.

Parâmetro	Mananoligossacarídeo (%)				CV <sup>1</sup>
	0	1	2	3	
Altura do vilo ( $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup>	313,53	344,54	345,08	352,76	11,82
Densidade de vilos	7,75	8,43	8,37	8,96	10,15
Células caliciformes/vilo	16,25	16,87	17,42	17,13	20,31

<sup>1</sup> Coeficiente de variação

Os resultados do presente estudo mostram que embora pelo teste de Dunett não apresentar diferenças significativas para os parâmetros de morfometria da mucosa intestinal, o número de células caliciformes foram proporcionais a altura de vilosidades intestinais. As células caliciformes, de acordo com Macari et al. (2002) tem a função de produção de muco e são secretoras de glicoproteínas. Estas por sua vez, têm uma longa porção polissacarídica, que as torna hidrofílicas e viscosas. A principal função destas glicoproteínas é ao de proteger o epitélio intestinal da ação de enzimas digestivas e efeitos abrasivos da digesta, bem como atuar como uma barreira protetora para patógenos intestinais.

Por meio deste estudo, pode ser considerado que estas células estariam mais ativas ou em maior quantidade na presença de patógenos, sugerindo que durante a fase experimental pouco desafio ocorreu.

Hisano et al. (2006) concluíram que a parede celular de levedura nas proporções de 0,1; 0,2; e 0,3% na dieta de tilápias, confrontando com levedura íntegra e autolisada, proporcionou maior perímetro das vilosidades intestinais. Embora não fosse mensurado neste trabalho o perímetro e sim a altura dos vilos, podendo ser este um indicativo da ação benéfica do MOS na mucosa intestinal de tilápias. O efeito linear nas alturas das vilosidades intestinais conforme é aumentado a dosagem de MOS, melhora a conversão

alimentar independente de outras respostas de desempenho. Porém algum fator antinutricional ou de desbalanceamento devem ter ocorrido, conforme já discutido anteriormente principalmente para o tratamento com a inclusão de 3% de MOS na dieta.

Em estudo com frango de corte, Iji et al. (2001) observaram que a suplementação de diferentes níveis de MOS (0,0; 0,1; 0,3; 0,5%), resultou em aumento no comprimento do jejuno dos animais alimentados com 0,5% do produto comercial, quando comparado aos dos demais tratamentos. No entanto, os autores constataram que não houve influência dos diferentes níveis de suplementação em relação aos índices morfométricos de profundidade de cripta, comprimento e área superficial das vilosidades, no jejuno e íleo.

Maiorka et al. (2001) realizaram experimento com frangos de corte, utilizando prebióticos, probióticos e simbióticos na dieta de frangos de corte, sendo que os resultados mostraram que o tratamento que utilizou prebiótico, houve aumento das vilosidades intestinais. Schwarz et al. (2002) em experimento com frangos de corte, encontraram maior altura de vilosidade, e menor profundidade de cripta para os tratamentos que continham mananoligossacarídeo e saponina (*Quilaya saponaria Molina*) na dieta.

Os polissacarídeos presentes na parede celular, também podem ter influenciado positivamente a microbiota intestinal. No entanto, o modo de atuação sobre o trato digestório e sua digestão e absorção ainda são poucos conhecidos em peixes e não há relatos de efeitos prebióticos e modulação do crescimento e fixação de bactérias probióticas, que poderiam beneficiar o animal e proporcionar melhor equilíbrio da microbiota intestinal (Hisano et al., 2005).

Por outro lado Silva (2000), em estudo realizado com aves, citou que o modo de ação dos probióticos, é atuar alimentando e estimulando o crescimento de diversas

bactérias intestinais benéficas, cujos metabólicos atuam, também, reduzindo o pH através do aumento da quantidade de ácidos orgânicos presentes nos cecos, os ácidos graxos acético, butírico e propiônico, que diminuem o pH intestinal, além de diminuir os sítios de aderência, imobilizando e reduzindo a capacidade de fixação de algumas bactérias patogênicas na mucosa intestinal. A integridade e uniformidade dos vilos são de grande relevância, devendo ser considerado o número e altura dos vilos, sendo importante uma densidade compatível com a altura, entendendo que deve existir um limite de crescimento máximo das vilosidades, ao ser considerado a área da luz intestinal, espaço este fundamental para a passagem do alimento, favorecendo também a mobilidade intestinal, e produção de muco.

De acordo com Randall et al. (2000) para a maioria dos vertebrados, a taxa de absorção é geralmente proporcional à área da superfície da membrana apical das células que revestem o epitélio, esse grande aumento da área superficial aumenta a absorção de substâncias digeridas no meio líquido intestinal.

O aumento da altura das vilosidades intestinais pode favorecer a absorção de nutrientes da dieta, melhorando a taxa de conversão alimentar, ou seja, em tilápias é possível afirmar que quanto maior a altura das vilosidades, observando sempre a densidade dos vilos, maior área de absorção da digesta ocorrerá, e como consequência a menor taxa de conversão alimentar. Também pode ser observado um incremento dos vasos internos dos vilos apresentados bem como a integridade da mucosa intestinal na figura 2.

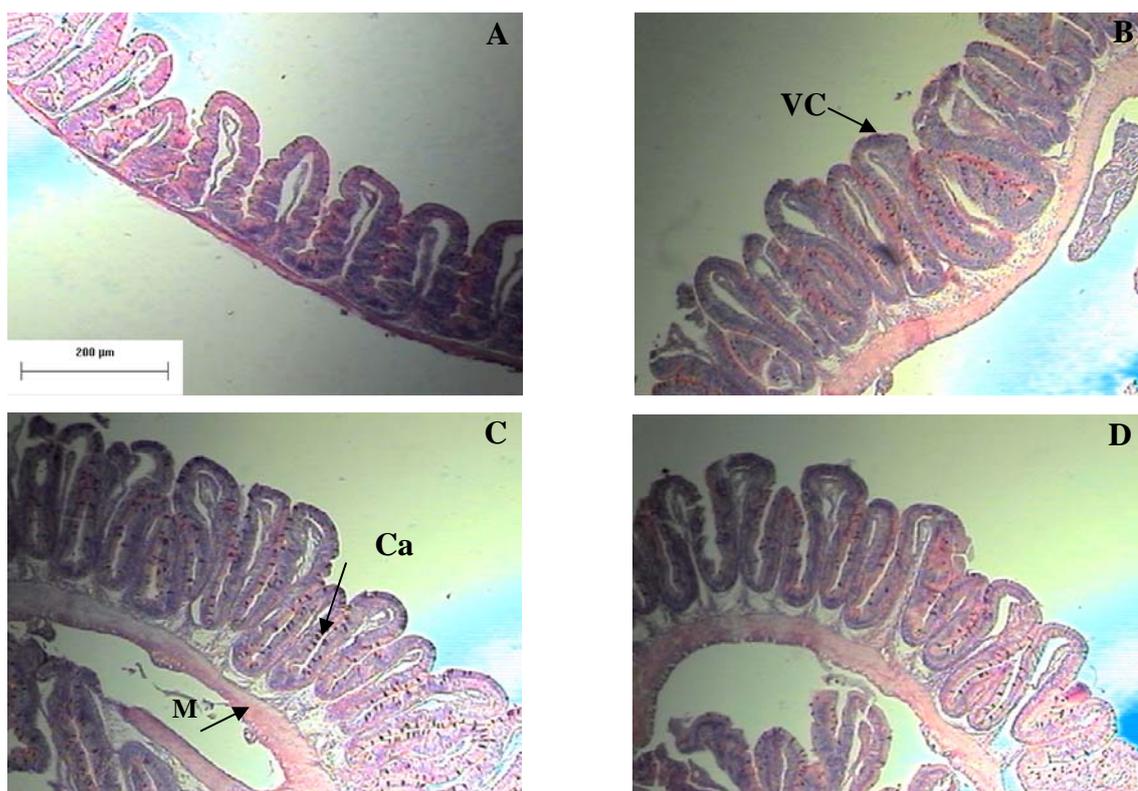


Figura 2. Em A 0%; B 1%, C 2%, D 3% de mananoligossacarídeo (MOS) na dieta. Observar a integridade da altura das vilosidades intestinais em B, C e D. Destacando as vilosidades (VC) em B, muscular da mucosa (M), e célula caliciforme (Ca) em C. Coloração PAS. Barra 200µ.

Com a intensificação na criação e a utilização de linhagens mais produtivas, o uso de prebióticos tem sido preconizado em dietas para peixes objetivando melhorias no desempenho produtivo e na saúde dos peixes. De acordo com os dados obtidos no presente trabalho, observou-se que a inclusão de MOS em dietas para juvenis de tilápia do Nilo favoreceu a conversão alimentar.

### Conclusão

A inclusão de 1% de mananoligossacarídeo é adequada em dietas para juvenis de tilápias do Nilo.

### Literatura Citada

- CULJAK, V.; BOGUT, G; HAS-SHON, E et al. Effect of Bio-MOS on performance and health of juvenile carp. **In: Nutrition and biotechnology in the feed and food industries**: Alltech's 22nd annual symposium, Lexington, 2006.
- DABROWSKI, K.; HASSARD, S.; QUINN, J.; et al. Effect of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and on the utilization of the diet. **Aquaculture**, v. 21, p. 213-232, 1980.
- FEEDING TIMES. Antibióticos: a resistência já é realidade. Revista Feeding Times. Dublin, Republic of Ireland. v. 03, nº1, 1998.
- HISANO, H. **Levedura desidratada íntegra, autolisada e parede celular como pró-nutrientes para tilápia do Nilo**. 2005. 90 fls. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- HISANO, H.; S., MAELI, D. P.; BARROS, M. M. et al. Levedura íntegra e derivados do seu processamento em rações para tilápia do Nilo: aspectos hematológicos e histológicos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**. v.28, n.4, p. 311-318, Oct./Dec., 2006.
- HOUGH, J. S. **Biotecnologia de La cerveza y de malta**. Zaragoza: Acribia, 1990.
- FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, n.4, p. 1125-1131, 2001.
- IJI, P.A.; SAKI, A.A.; TIVEY, D.R. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. **J. Sci. Food Agric.**, v.81, p. 1186-1192, 2001.
- JAUNCEY, K.; ROSS, B. **A guide to tilapia feed and feeding**. Scotland: University of Stirling, 1982. 111pp.
- LI, P.; Gatlin III, D.M. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). **Aquaculture**, v. 219, p. 681-692, 2003.
- MACARI, M; FURLAN, R.L; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. FUNEP, Jaboticabal, 2002.

- MAIORKA, A.; SANTINI, E.; SUGETA, S.M. et al. Utilização de prebióticos, probióticos ou simbióticos em dietas para frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n.1, 2001.
- MOUNTZOURIS, K. C.; BALASKAS, C.; FAVA, F. et al. Profiling of composition and metabolic activities of the colonic microfora of growing pigs fed diets supplemented with prebiotic oligosaccharides. **Anaerobe**, v. 12, p. 178-185, 2006.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC **Nutrient Requirements of warmwater fishes and shellfishes**. Washington: National Academy Press. 1993. 102p.
- NOSE, T. On the digestion of food protein by gold-fish (*Carassius auratus* L.) and rainbow trout (*Salmo irideus* G.). **Bulletin Freshwater Fish Research Laboratory**, v.10, p.11-22, 1960.
- RANDALL, D; BURGGREN, WARREN; FRENCH, KATHLEEN. Fisiologia Animal. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan. p. 595-598, 2000.
- ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J.B.B *Glucans as immunostimulants in fish*. In: Stolen, J., Fletcher, T.C. (Eds) **Modulators of Fish Immune Responses**. SOS Publications, Fair Haven, NJ, pp 83-99, 1994.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v.172, p. 63-92, 1999.
- SCHWARZ, K. S.; FRANCO. S; FEDALTO, M. **Substituição de probióticos e prebióticos na alimentação de frangos e corte**. UFPR (Dissertação), Curitiba, 83p., 2002.
- SCHWARZ, K. S.; FANTA, E.; WERNECK, P. R.;et al. Dados preliminares do desenvolvimento e ganho de massa corpórea como consequência da utilização de mananoligossacarídeo na alimentação de juvenis de robalo-peva (*Centropomus parallelus*) e sua relação com as características teciduais. **UFPR**, <http://25pgbiocel.bio.ufpr/ResumosPUB/0049.html>, Curitiba, 2005.
- SILVA, E. N. Probióticos e Prebióticos na alimentação de aves. **Conferência Apinco' 2000**. São Paulo: Facta, 2000.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3ª ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235p.
- SPRING, P. Yeast's secret weapon aids animal production. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. *Anais...* Campinas, Brasil: CBNA, p 41-50, 2001

- STAYKOV, Y.; DENEV, S; SPRING, P. **Influence of dietary mannan oligosaccharide (Bio-MOS) on the growth rate and immune of common carp (*Cyprinus carpio* L.)**. In: Howell B, Flos R (eds) Lessons from the past to optimize the future. European Aquaculture Society, Special Publication. N 35, June, p. 431-432, 2005.
- STAYKOV, Y.; SPRING, P; SWEETMAN, J. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquacult Int**, v. 15, p. 153-161, 2007.
- VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L. et al. Eugenol como anestésico para tilápia do Nilo. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, 2008.
- ZHOU, X. Q.; LI, Y, L. The effects of Bio-Mos® on intestinal microflora and immune function of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* Var. Jian). In: NUTRITIONAL BIOTECHNOLOGY IN THE FEED AND FOOD INDUSTRIES: Proceedings of Alltec's 20<sup>th</sup> annual symposium, Lexington, 2004.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As barreiras comerciais impostas pela comunidade Europeia com relação a uso de antimicrobianos na dieta de animais têm interferido na comercialização de carnes para estes países. Com relação ao peixe, como a tilápia do Nilo, espécie mais criada globalmente, as barreiras ainda são maiores, pois a água não pode ser contaminada por antibióticos, o que resultaria em um impacto ambiental.

O mananoligossacarídeo (MOS) é um prebiótico oriundo da parede celular de leveduras amplamente utilizado geralmente como imunestimulante e melhorador de desempenho para animais.

A utilização de MOS na dieta de tilápias do Nilo resulta em melhora das características da mucosa intestinal, em larvas após e ou durante o período de reversão sexual deste peixe, aumentando a altura das vilosidades intestinais, comprimento do intestino e com isso melhorando as taxas de conversão alimentar. Parece haver evidências de uma maior eficiência do uso do MOS nas primeiras semanas de vida de tilápias do Nilo, visto que para os juvenis, a significância dos parâmetros morfométricos da mucosa intestinal foram menos evidentes, quando comparados com os resultados na fase de reversão sexual.

É possível que outros mecanismos relacionados aos efeitos do MOS sobre a população microbiana, sobre a taxa de passagem e no sistema imunológico dos peixes contribuam para os resultados positivos do MOS.

O MOS pode ser adicionado como prebiótico em dietas para larvas e juvenis de tilápias do Nilo para melhoria da conversão alimentar, sendo necessário considerar a análise econômica da sua inclusão, bem como os efeitos sobre condições de desafio.