

EFEITOS FISIOLÓGICOS DA UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICO NA ALIMENTAÇÃO DE TAMBAQUI

Oba¹, E.T.; Corrêa², R.O.; Santos¹, J.S.; Borges¹, M., Tostes¹, L.V.;
Marinho¹, R.G.B.; Meyer², G.; Martins Júnior², H.

¹ Embrapa Amapá, Rod. Juscelino Kubitschek, km 05, no. 2600 cep 68903-419, Macapá, AP; eliane@cpafap.embrapa.br; ² Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

Palavras-chave: hematologia, desempenho, intermediários metabólicos.

INTRODUÇÃO

O tambaqui *Colossoma macropomum* é o principal peixe criado na região amazônica, em função da disponibilidade de alevinos, potencial de crescimento, alta produtividade, resistência ao manejo e pela qualidade de sua carne, muito apreciada por seu sabor, sendo considerado como importante fonte de proteína animal (ARAUJO-LIMA & GOULDING, 1997; VAL et al., 2000). No entanto, o alto custo com alimentação durante o cultivo desta espécie ainda dificulta o cultivo deste peixe.

Atualmente, muitas pesquisas vem sendo realizadas com o intuito de verificar os benefícios do uso de probióticos na aquicultura. Probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos suplementados aos alimentos e que afetam benéficamente o hospedeiro pela melhora em seu balanço intestinal (FULLER, 1989), promovendo a saúde (GATESOUBE, 1999). Desta maneira, o probiótico age no trato gastrointestinal conferindo controle de patógenos, desenvolvimento do sistema imune, promovendo benefícios nutricionais e favorecendo a barreira da mucosa intestinal (VAUGHAM et al., 2002).

Os parâmetros sanguíneos podem ser usados como indicadores biológicos no monitoramento da saúde dos peixes e do ambiente, como uma ferramenta na identificação do estresse que o ambiente pode impor aos peixes, visto que, o sangue é um tecido com propriedades muito especiais, o qual deve estar em equilíbrio com todos os demais tecidos do organismo, por desempenhar inúmeras funções diferenciadas, relacionadas à respiração, proteção, hemostasia, osmorregulação, transporte, defesa e nutrição (AFFONSO et al., 2002; CHAGAS & VAL, 2003; TAVARES-DIAS & MORAES, 2004; RIOS et al., 2005; SAMPAIO et al., 2008). Deste modo, a avaliação das características sanguíneas é uma maneira de detectar sintomas de estresse ou doenças, como as de caráter nutricional ou estado de saúde dos peixes, fornecendo inclusive informações relevantes para diagnósticos em populações em cativeiro.

Este estudo foi realizado para avaliar o efeito do fornecimento de probiótico, aplicado de duas formas (na composição e inoculado), em dietas práticas para juvenis de tambaqui, sobre seu desempenho produtivo e sobre sua condição fisiológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi desenvolvido na Estação de Piscicultura da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, no período de dezembro de 2009 a março de 2010. Foram utilizados 180 juvenis de tambaqui (peso inicial = 16,73 g ± 0,42), distribuídos em 9 tanques de 250 L, em regime de recirculação, filtragem e aeração contínua de água. O delineamento do experimento foi inteiramente ao acaso, com três tratamentos e três repetições. Foram desenhadas dietas experimentais, formuladas para serem isoprotéicas e isocalóricas, utilizando o software SUPER CRAC 5.5 (TD Software). As análises físico-químicas dos ingredientes foram realizadas no Laboratório da Agroindústria da Embrapa Amazônia Oriental, Belém (PA) e das rações experimentais no Laboratório de Bromatologia da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos (SP), segundo métodos recomendados pela AOAC (1990).

O probiótico foi adicionado à ração experimental de duas formas: na composição e inoculado. A ração experimental denominada como Probiótico na composição foi preparada com adição de 1% do probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*, Aquayeast®), sem passar pelo processo de ativação; já a ração experimental denominada como Probiótico inoculado foi preparada com adição de 0,4% do probiótico, que após passar pelo processo de ativação foi aspergida sobre a ração pronta. A ativação é o processo pelo qual ocorre a ativação do probiótico, pela adição em

água a 35°C com açúcar (50 g de açúcar a cada 100 g de Aquayeast®) e mantendo em repouso por uma hora, em pH de 4,6. As rações experimentais foram armazenadas envoltas por plástico preto, até o momento de fornecimento aos animais.

Os peixes foram previamente aclimatados por um período de 14 dias e, iniciado o experimento, o arraçoamento foi feito 2x/dia (8:00h e 16:00h), até a saciedade aparente, seis dias na semana. O monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água de cultivo foi realizado com análises diárias de oxigênio dissolvido, temperatura (YSI modelo 55), pH (YSI modelo pH100) e semanais de amônia, alcalinidade e nitrito (Alfakit).

Os peixes foram pesados no início e ao final do período experimental (59 dias) para obtenção dos pesos inicial e final. A taxa de crescimento específico (TCE: % dia⁻¹) e a conversão alimentar foram calculados utilizando as seguintes equações: $TCE = (100 (\ln W_t - \ln W_o)/T)$ e a $CA = \text{quantidade de ração consumida} / \text{ganho de peso}$. Imediatamente após a captura dos peixes, uma amostra de sangue foi coletada por punção do vaso caudal de cada peixe, com auxílio de seringas contendo EDTA 10%, sendo armazenados em microtubos e mantidos em gelo. Esta alíquota foi dividida em duas partes, para a realização das análises hematológicas e bioquímicas. As variáveis hematológicas determinadas foram: hematócrito (Hct): através da centrifugação de tubos capilares heparinizados em centrífuga de microhematócrito, a 5.000 rpm, com leitura da porcentagem de eritrócitos em cartões de leitura padronizados; concentração de hemoglobina (Hb): pelo método da cianometahemoglobina, sendo a leitura da absorbância realizada a 540 nm em espectrofotômetro, sendo o valor expresso em g.dL⁻¹; contagem de eritrócitos (Eri): uma amostra de sangue foi diluída em solução de azul de toluidina e formol-citrato, sendo os eritrócitos contados (eritrócitos · μL⁻¹) em câmara de Neubauer sob microscópio de luz. Os índices hematimétricos Volume Corpuscular Médio (VCM = fL), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM = g.dL⁻¹) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM = g.dL⁻¹) foram calculados utilizando os valores das variáveis hematológicas obtidos.

Após a centrifugação da segunda alíquota de sangue foi obtido plasma para as determinações bioquímicas. Este material foi congelado a -18°C até o momento das análises. Os níveis de glicose, proteína, colesterol, triglicérides e uréia foram determinados através de sistemas enzimáticos, adequados para cada um dos metabólitos, através de kits colorimétricos (Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda, Goiânia, GO). A determinação da glicose foi realizada pelo método enzimático, com leitura em comprimento de onda de 510 nm em espectrofotômetro, sendo o valor expresso em mmol/L. As proteínas plasmáticas totais foram determinadas pelo método biureto modificado, com leitura em 550 nm em espectrofotômetro, sendo o valor expresso em g/L. O nível de colesterol plasmático foi determinado através de método enzimático, com leitura em 510 nm em espectrofotômetro, sendo o valor expresso em mmol/L. A concentração de triglicérides no sangue foi determinada através de método enzimático, com leitura em 410 nm em espectrofotômetro, sendo o valor expresso em mmol/L. A concentração de uréia no plasma foi determinada através de método enzimático, com leitura em 600 nm em espectrofotômetro, sendo o valor expresso em mmol/L.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tab. 1 temos os valores de crescimento dos tambaquis, indicando que os peixes cresceram, mas que as dietas com probiótico, tanto na composição, quanto inoculado, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Esta semelhança no crescimento pode ser visualizado com os dados de TCE apresentados. Já os valores de CA indicaram que os tambaquis alimentados com ração com probiótico inoculado apresentaram maior consumo de ração, indicando que possivelmente, a melhor forma de inclusão do probiótico seja na composição da ração, isto é, no momento do preparo da ração. Importante salientar que a ração experimental utilizada neste estudo é uma ração peletizada e não extrusada.

A utilização de *S. cerevisiae* como probiótico em rações para alevinos de tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) não influenciou o desempenho produtivo e a sobrevivência em sistema de cultivo com desafio sanitário (MEURER et al., 2007). Da mesma forma como ocorreu com o desempenho de tambaquis do presente estudo, alimentados com a dieta com probiótico, independente da forma de adição.

De acordo com CORNELIO (2009), os probióticos (levedura e bactéria) podem ser utilizados como suplementos efetivos para ganho de peso de melhora da conversão alimentar, assim como para o aumento da resistência à infecção por patógenos em tilapia do Nilo. Desta maneira, poderiam ser os probióticos considerados como alternativa ao uso de antibióticos e quimioterápicos. A suplementação da levedura (*S. cerevisiae*), com adição entre 1,30 a 1,59%,

proporciona melhora no coeficiente de digestibilidade aparente de rações experimentais para tilápia do Nilo, melhorando o desempenho produtivo (HISANO et al., 2007).

Tabela 1. Desempenho de tambaqui, *C. macropomum*, alimentados com dietas com probiótico na composição e inoculado e controle. Valores são média \pm desvio padrão.

	Controle	Composição	Inoculado
Peso final (g)	61,14 \pm 16,83 ^a	62,84 \pm 20,33 ^a	55,91 \pm 12,05 ^a
Peso inicial (g)	16,69 \pm 0,64 ^a	16,90 \pm 0,58 ^a	16,55 \pm 0,53 ^a
TCE (% dia ⁻¹)	2,17 \pm 0,09 ^a	2,22 \pm 0,17 ^a	2,02 \pm 0,03 ^a
CA	1,32 \pm 0,01 ^{ab}	1,24 \pm 0,06 ^a	1,38 \pm 0,03 ^b

* Letras diferentes nas linhas P<0,05; letras iguais nas linhas P>0,05. TCE é a taxa de crescimento específico e CA é a conversão alimentar.

A adição de probiótico na composição da ração promoveu redução Hb e do CHCM dos tambaquís, em relação aos grupos Controle e Probiótico Inoculado. Ocorreu também um aumento do Hct (P<0,05) do grupo alimentado com dieta com probiótico na composição, em relação ao grupo Controle (Tab. 2). Muito provavelmente, a adição de probiótico na ração estimulou a renovação das células vermelhas do sangue, visto que, as células mais novas apresentam maior volume, por isto o valor aumentado do Hct, além de menor concentração de Hb, observado no valor de CHCM (ver RIOS et al., 2005, 2006).

Tabela 2: Variáveis hematológicas de tambaqui, *C. macropomum* (n=15), alimentados com dieta com adição de probiótico na composição e inoculado. Valores são média \pm desvio padrão.

	Controle	Probiótico Composição	Probiótico Inoculado
Hct (%)	26,67 \pm 2,04(15) ^a	28,93 \pm 1,91(15) ^b	27,13 \pm 3,07(15) ^{ab}
Hb (g/dL)	8,09 \pm 0,55(15) ^b	6,86 \pm 0,67(15) ^a	7,52 \pm 0,77(15) ^b
Eri (x 10 ⁶) μ L ⁻¹	1,30 \pm 0,21(15) ^a	1,27 \pm 0,20(12) ^a	1,33 \pm 0,20(15) ^a
VCM (fL)	209,19 \pm 28,98(15) ^a	233,51 \pm 37,79(15) ^a	208,45 \pm 45,18(12) ^a
HCM (g/dL)	64,16 \pm 13,72(15) ^a	55,61 \pm 11,38(15) ^a	57,98 \pm 12,80(12) ^a
CHCM (g/dL)	30,47 \pm 2,98(15) ^b	23,76 \pm 2,45(15) ^a	28,16 \pm 5,34(15) ^b

* Letras diferentes nas linhas P<0,05; letras iguais nas linhas P>0,05. Hct = hematócrito; Hb = concentração de hemoglobina; Eri = contagem de eritrócitos; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média.

A adição de probiótico na dieta para tambaquís não proporcionou alteração dos níveis de glicose, proteína, colesterol e triglicérides (Tab.3). A ração com probiótico inoculado promoveu aumento dos níveis de uréia, isto é, promoveu alteração no metabolismo das proteínas. Isto não foi observado no presente estudo com tambaquís.

Tabela 3: Intermediários metabólicos de tambaqui, *C. macropomum*, alimentados com dietas com adição de probiótico na composição e inoculado. Valores são média \pm desvio padrão.

	Controle	Probiótico Composição	Probiótico Inoculado
Glicose (mmol/L)	4,71 \pm 1,36 (10) ^a	4,47 \pm 0,72 (8) ^a	4,57 \pm 0,41 (8) ^a
Proteína (g/L)	36,13 \pm 1,48 (10) ^b	32,89 \pm 1,77 (8) ^a	31,65 \pm 1,40 (8) ^a
Colesterol (mmol/L)	3,81 \pm 0,41 (8) ^a	4,16 \pm 0,10 (8) ^a	4,04 \pm 0,21 (8) ^a
Triglicérides (mmol/L)	3,11 \pm 0,28 (8) ^a	2,78 \pm 0,55 (8) ^a	3,12 \pm 0,38 (8) ^a
Uréia (mmol/L)	23,31 \pm 0,97 (8) ^{ac}	22,23 \pm 1,54 (8) ^a	27,14 \pm 5,99 (8) ^{bc}

* Letras diferentes nas linhas P<0,05; letras iguais nas linhas P>0,05.

Os níveis de colesterol não mostraram alteração significativa (P>0,05; Tab. 3), entretanto, de acordo com HOLZAPFEL & SCHILLINGER (2002) a presença de probióticos na dieta promove a

diminuição dos níveis de colesterol. Provavelmente, a realização de mais estudos utilizando-se uma maior porcentagem de adição do probiótico na composição da dieta dos tambaquis possa promover a diminuição dos níveis de colesterol, possibilitando até mesmo melhora na condição de saúde dos animais.

CONCLUSÕES

A inclusão de probióticos nas dietas não prejudica o desempenho de tambaquis. Os efeitos benéficos da suplementação da dieta com probióticos, principalmente, como alternativa ao uso de antibióticos, por exemplo, necessitam da realização de mais estudos, de modo a averiguar a forma mais adequada de adição do probiótico na dieta de tambaquis cultivados e em qual proporção, assim como a realização de outros tipos de análise, como dos níveis das enzimas do estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFONSO, E.G.; POLEZ, V.L.P.; CORRÊA, C.F.; MAZON, A.F.; ARAÚJO, M.R.R.; MORAES, G.; RANTIN, F.T. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol.**, 133 C, 375-382.
- Association of Official Analytical Chemists – AOAC. 1990. Official methods of analysis. Washington D.C., 15th Ed., 1141 p.
- ARAÚJO-LIMA, C.R.M.; GOULDING, M. 1997. So fruitful fish: Ecology, conservation, and aquaculture of the Amazon's tambaqui. New York: Columbia University Press, 157p.
- CHAGAS, E.C.; VAL, A.L. 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 38 (3), 397-402.
- CORNELIO, F.H.G. 2009. Avaliação da suplementação de dois probióticos no desempenho zootécnico, digestibilidade de nutrientes e resistência à infecção por patógeno em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, 52 p.
- FULLER, R. 1989. A review: probiotic in man and animals. **Journal of Applied Environmental Microbiology**, v.63, p. 1034-1039.
- GATESOUBE, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v. 180, p. 147-165.
- HISANO, H.; NARVÁEZ-SOLARTE, W.V.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E. 2007. Desempenho produtivo de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com levedura e derivados. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 42, n. 7, p. 1035-1042.
- HOLZAPFEL, W.M.; SCHILLINGER, U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v. 35, p. 109-116.
- MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M.M.; FRECCIA, A.; MAUERWERK, M.T. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para alevinos de tilápia-do-nilo submetidos a desafio sanitário. **R. Bras.Zootec.**, v. 36, n. 5, p. 1219-1224.
- RIOS, F.S.; MORAES, G.; OBA, E.T.; FERNANDES, M.N.; DONATI, L.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. 2006. Mobilization and recovery of energy stores in traíra, *Hoplias malabaricus* Bloch (Teleostei, Erythrinidae) during long-term starvation and after re-feeding. **J. Comp. Physiol.**, v. 176B, p. 721-728.
- RIOS, F.S.; OBA, E.T.; FERNANDES, M.N.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. 2005. Erythrocyte senescence and hematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, 140 A, 281-287.
- SAMPAIO, F.G.; BOIJINK, C.L.; OBA, E.T.; SANTOS, L.R.B.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. **Comp. Biochem. Physiol.**, 147C, 43-51.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. 2004. Hematologia de peixes teleosteos. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 144 p.
- VAL, A.L.; ROLIM, P.R.; RABELO, H. 2000. Situação atual da aquicultura na região Norte. In: Valente, W.C.; Poli, C.R.; Pereira, J.A.; Borghetti, J.R. (Eds.), Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq/MCT.
- VAUGHAM, E.E.; DE VRIES, M.C.; ZOETENDAL, E.G.; BEM-AMOR, K.; AKKERMANS, A.D.L.; DE VOS, W.M. 2002. The intestinal LABs. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 341-352.