**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Determinação da exigência de vitamina E para o dourado *Salminus
brasiliensis* (Cuvier, 1816) e a avaliação do seu efeito imunomodulador**

Fernando Yugo Yamamoto

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2015

Fernando Yugo Yamamoto
Engenheiro de Aquicultura

**Determinação da exigência de vitamina E para o dourado *Salminus
brasiliensis* (Cuvier, 1816) e a avaliação do seu efeito imunomodulador**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ EURICO POSSEBON CYRINO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Yamamoto, Fernando Yugo

Determinação da exigência de vitamina E para o dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) e a avaliação do seu efeito imunomodulador / Fernando Yugo Yamamoto. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
73 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Antioxidante 2. Imunonutriente 3. Tocoferol 4. Imunomodulador I. Título

CDD 639.375
Y19d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À minha mãe Melcia
e ao meu pai Emílio,
pela infinita dedicação aos filhos,
pelo apoio e incentivo
durante esta jornada

Às amizades que fiz e até hoje cultivo

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino pelo voto de confiança, ensinamento, paciência e orientação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens, em especial ao Prof. Dr. Valdomiro Shigueru Miyada, pelo convívio e aprendizado durante meu estágio de docência.

À FAPESP e ao CNPq pelo financiamento da minha pesquisa e bolsa de estudos.

À Profa. Dra. Ligia Uribe Gonçalves pela amizade, incentivo e “sermões” durante a nossa convivência.

Ao Dr. Ricardo Basso Zanon, pela amizade e paciência ao me ensinar os protocolos imunológicos.

Aos amigos que fiz do programa PG-CAP e ao grupo de pesquisa do Setor de Piscicultura, pela ajuda, amizade, risadas e convívio: Sean V. Valente, Renan A. Donadelli, Eduardo D. França, Freddy A. A. Aguilar, Roselany O. Corrêa, Rafael S. C. Barone, Evandro K. Lorenz, Thaline M. P. da Cruz, Rafael E. Sabioni, Tarcila S. C. Silva, Thiago A. Freato, João F. A. Koch, e Fernando H. G. Cornélio.

Aos amigos de república e agregados, que foram essenciais durante essa jornada: João P.P. Winckler, Cristiano Bortoluzzi, José Guilherme M. Barbosa, Naiara S. Fagundes, Natália C. Milani, Gabriella B. de Oliveira, João P. D’Andretta, Daniel I. Piaia, André F. Moreira, Gregori Rovadoscki, Helena K. da Silva e Gizele B. Barankevicz.

À Guarda Universitária pelos serviços e alertas de quedas de energia durante os experimentos.

À Profa. Dra. Marília Oetterer, a Dra. Juliana Galvão e ao Eddie E. S. Garcia por ensinar a metodologia de TBARS, e disponibilizar os reagentes necessários para a análise em nosso laboratório.

À Profa. Dra. Elizabeth Criscuolo Urbinati e ao Dr. Rodrigo Yukihiro Gimbo do Laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus de Jaboticabal, SP, pela disponibilização da estrutura, equipamentos e auxílio na análise imunológica do sistema complemento alternativo.

Ao Prof. Dr. D.M. Gatlin III e sua equipe por me receber em seu laboratório e financiar meu experimento nos Estados Unidos. E aos colegas que conheci durante o intercâmbio: Dr. Camillo Pohlenz, Waldemar Rossi Jr., Alejandro Velasquez e Maria Mendoza, que muito me ajudaram durante o desenvolvimento dos meus estudos.

Aos técnicos do Setor de Piscicultura Sérgio Vanderlei Pena e Ismael Baldessin Júnior pelo auxílio durante os experimentos.

Muito obrigado!

“七 転び 八 起き”
Caia sete vezes. Levante-se oito.
Antigo provérbio japonês

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Dourado	21
2.2 Vitamina E na dieta de peixes	23
2.3 Nutrição e sistema imune de peixes	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Formulação e composição da dieta experimental e quantificação de vitamina E	40
3.2 Respostas do sistema imune inato	42
3.2.1 Concentração das imunoglobulinas séricas	43
3.2.2 Concentração de lisozima.....	43
3.2.3 Atividade respiratória dos leucócitos	44
3.2.4 Análise da atividade hemolítica do sistema complemento – via alternativa	44
3.2.5 Desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i>	45
3.3 Oxidação lipídica da fração mitocondrial hepática estimulada pelo Ácido ascórbico e FeCl ₃	45
3.4 Análise estatística	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Parâmetros de desempenho e potencial antioxidante	49
4.2 Sistema imunológico	54
4.2.1 Lisozima sérica	54
4.2.2 Atividade respiratória dos leucócitos	56
4.2.3 Atividade hemolítica do sistema complemento via alternativa	56
4.2.4 Imunoglobulinas totais	57
4.2.5 Infecção bacteriana	58
5 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	63

RESUMO

Determinação da exigência de vitamina E para o dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) e a avaliação do seu efeito imunomodulador

Agentes estressores em piscicultura intensiva afetam a condição fisiológica e o sistema imune dos peixes aumentando a susceptibilidade a infecções e causando prejuízos econômicos. Para contornar este problema, o uso de nutrientes moduladores do sistema imunológico na dieta, como o tocoferol, se tornam estratégia profilática para as pisciculturas assegurarem uma maior sobrevivência e consequente produtividade. O presente estudo visou avaliar a exigência nutricional do dourado, *Salminus brasiliensis*, por meio de um ensaio dose-resposta e aferir seu efeito imunomodulador. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com sete tratamentos/dietas semi purificadas elaboradas com doses crescentes de vitamina E (0; 50; 100; 150; 200, 250 e 3500 mg kg⁻¹ α -tocoferol acetato) (n=4). Quinze juvenis de dourado foram alojados em caixas de polipropileno, em sistema de recirculação fechado com filtragem mecânica e biológica, trocador de calor com termostato e aeração forçada através de sopradores e pedras difusoras. Após serem alimentados por 30 dias com a dieta basal para depleção de vitamina E nas reservas corporais de vitamina, os animais foram pesados (20,04 $\pm$ 0,09 g), redistribuídos em 28 tanques (500 L; 15 peixes por tanque) e alimentados durante 78 dias até saciedade aparente (duas refeições diárias: 08h00m e 17h00m). Os peixes apresentaram diferença no ganho de peso, porém não de maneira dependente do tratamento de vitamina E. Após o período de alimentação os peixes foram desafiados com a bactéria *Aeromonas hydrophila*. Os parâmetros imunológicos foram aferidos antes e após o desafio e não houveram diferenças significativas para: atividade respiratória dos leucócitos, atividade da lisozima sérica, proteína e albumina total no soro e sobrevivência. Houve aumento da concentração das globulinas totais no soro após infecção em função do nível de vitamina E na dieta, e a dose ótima foi definida por meio da regressão segmentada: 151,07 mg kg⁻¹ de vitamina E na ração. A exigência de vitamina E para o dourado foi determinada em 58,90 mg kg⁻¹ pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico da fração mitocondrial do fígado por análise de regressão segmentada.

Palavras-chave: Antioxidante; Imunonutriente; Tocoferol; Imunomodulador

ABSTRACT

Determination of vitamin E requirement for dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) and evaluation of its immunomodulatory effect

Stressors in intensive fish farming affect fish physiological conditions and immune system, promoting susceptibility to infections and causing economic losses. To overcome this issue, using immunomodulatory nutrients such as tocopherol on fish feeds may become a prophylactic strategy to fish farms to ensure a higher survival and productivity. The present study aimed at determining vitamin E requirement of dourado, *Salminus brasiliensis*, through a dose dependent trial and how the immune system responded to vitamin E crescent doses. The experiment design was randomly distributed in seven treatments (n=4) of semi purified diets (0; 50; 100; 150; 200; 250 and 3,500 mg kg⁻¹). After exposing the fish during 30 days for tocopherol depletion, fifteen dourado juveniles (20.04 ± 0.09 g) were stocked in 500 L tanks in a closed loop system and fed twice a day until apparent satiation. Differences in weight gain were observed however not in a vitamin E dose dependent way. After feeding for 78 days fish were challenged with intraperitoneal bacterial infection (*Aeromonas hydrophila*). Immunological parameters were measured before and after infection and no significant differences were observed in: blood leukocyte burst respiratory activity, serum lysozyme activity, serum protein and albumin, and survival. However a higher total serum globulin was detected after infection and the best response determined through a broken-line regression was 151.07 mg kg⁻¹ of vitamin E on fish feed. Dietary requirement of vitamin E was determined by broken-line regression from thiobarbituric reactive substances of liver mitochondrial fraction to be 58.90 mg/kg of α -tocopherol acetate.

Keywords: Antioxidant; Immunonutrient; Tocopherol; Immunomodulator

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas análogas de vitamina E (Adaptado de Zingg, 2007).....	24
Figura 2 - Equação padrão da atividade da lisozima de clara de ovo.....	44
Figura 3 - Equação padrão da proteína utilizando albumina de soro bovino	46
Figura 4 - Equação padrão de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico	47
Figura 5 - Tubos de ensaio contendo teores crescentes de 1,1,3,3 tetramethoxypropane	47
Figura 6- Amostras de fração mitocondrial de dourado após desafio oxidativo e aquecimento com ácido tiobarbitúrico	50
Figura 7- Concentração de malondialdeído formado na fração mitocondrial após o desafio de oxidativo ($\pm$ EP).....	50
Figura 8- Concentração de vitamina E determinada no fígado dos dourados alimentados com dietas com níveis de vitamina E ($\pm$ EP).....	53
Figura 9- Concentração de globulinas totais no soro de dourados após a infecção bacteriana por <i>Aeromonas hydrophila</i> ($\pm$ EP).....	58
Figura 10 - Dourado com ulcerações na região abdominal, e nadadeiras hemorrágicas. Sinais clínicos de septicemia hemorrágica	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Potencial biológico dos compostos com atividade de vitamina E comparado ao α -tocoferol.....	25
Tabela 2 - Exigências em vitamina E já determinadas para várias espécies de peixes e os parâmetros utilizados.....	27
Tabela 3 - Sinais clínicos de deficiência em vitamina E apresentados por diversas espécies..	28
Tabela 4 - Níveis de vitaminas que melhoraram as respostas imunológicas para diversas espécies.....	31
Tabela 5 - Composição centesimal e composição em nutrientes em nutrientes ($\pm$ EP)	41
Tabela 6 - Composição da farinha de resíduo de salmão íntegra e desengordurada	41
Tabela 7 - Níveis esperados e detectados da vitamina E nas dietas experimentais	42
Tabela 8 - Efeito da vitamina E nos parâmetros de desempenho, sobrevivência e desafio de peroxidação lipídica <i>in vitro</i> do fígado (média $\pm$ erro padrão).....	51
Tabela 9 - Efeito da vitamina E nos parâmetros imunológicos e retenção do nutriente no fígado e músculo (média $\pm$ erro padrão).....	55
Tabela 10 - Efeito da vitamina E na sobrevivência e parâmetros imunológicos após infecção com <i>Aeromonas hydrophila</i> (média $\pm$ erro padrão).....	55

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é a agroindústria produtora de proteína que mais cresce mundialmente e em 2012 a produção global alcançou $90,4 \times 10^9$ t, sendo o Brasil o décimo segundo maior produtor, porém representando apenas 1,1% da produção total mundial (FAO, 2014). Na última década a aquicultura contribuiu com mais de 50% de todo o pescado consumido no mundo e com a estagnação dos estoques pesqueiros, a atividade ganha força e expressão no setor alimentício com um crescimento de 7% ao ano (FAO, 2014). Considerando o âmbito global da produção de organismos aquáticos há a necessidade de que a produção esteja aliada à sustentabilidade, uma vez que os diversos sistemas de produção podem impactar o ambiente de inúmeras maneiras. É considerado desenvolvimento sustentável na aquicultura aquele que satisfaz as necessidades do presente sem comprometer a habilidade das gerações futuras de satisfazer as dela, levando em conta os aspectos socioeconômicos, biológicos, tecnológicos e étnicos (OLESEN; MYHR; ROSENDAL, 2011).

Obedecendo a estes preceitos e com o cenário da expansão da aquicultura mundial então, podemos concluir que é possível e sustentável intensificar a produção piscícola brasileira, produzindo maior quantidade de animais em menor volume de água, obedecendo à capacidade de sustentação do ambiente. Entretanto, à medida que se intensifica a forma de produção de uma espécie qualquer, ocorre o aumento de estresse nos animais, acarretando mau desempenho e comprometendo o seu sistema imunológico (URBINATI; ZANUZZO; BILLER-TAKAHASHI, 2014), situação que pode resultar em surtos epizooticos, uma vez que nas águas de qualquer sistema de produção existe a presença de organismos patogênicos oportunistas e a sua predisposição de proliferação gerando perdas econômicas para o setor produtivo (KIRON, 2012; RINGO et al., 2012).

Existem restrições para a utilização de produtos químicos em piscicultura, pois é possível que ocorra permanência residual no tecido dos animais ou a eliminação como efluente para o ambiente. Algumas substâncias são carcinogênicas e possuem degradação lenta, como o verde de malaquita, que junto a pesticidas, desinfetantes e antibióticos fazem parte de um conjunto de produtos comumente utilizados para remediar enfermidades nas pisciculturas e possuem alto risco para o ambiente, pois a toxidez não é específica a organismos, ou seja, podem impactar toda a fauna adjacente e gerar efeito cumulativo na cadeia trófica (DE SILVA, 2012; RICO et al., 2012). Por outro lado, a alta exigência de mercado e a necessidade de certificação, principalmente produtos destinados à exportação

gerou uma diminuição do uso deste tipo de medicamento pela cadeia agroindustrial da aquicultura. Dessa maneira estratégias profiláticas, como a utilização de imunonutrientes na dieta, podem conferir aos animais maior resistência a infecções melhorando as respostas do sistema imunológico e eliminando a liberação de metabolitos e quimioterápicos nos efluentes, tornando mais sustentável a indústria da piscicultura brasileira.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dourado

Os peixes do gênero *Salminus* são caracterizados pelo porte de médio a grande (de 15 a 75 centímetros de comprimento padrão), com machos podendo alcançar até 5 kg e fêmeas até 26 kg de peso vivo (LIMA; BRITSKI, 2007; FLORA et al., 2010). As espécies deste gênero são dulcícolas e vernaculamente chamadas de dourado ou tabarana no Brasil, ocorrendo naturalmente nas bacias Amazônica, do Prata e do São Francisco (LIMA; BRITSKI, 2007). São duas as espécies de dourado endêmicas: o *Salminus brasiliensis* e seus sinônimos, *Salminus maxillosus* e *S. brevidens*, que habitam as bacias dos rios Paraná, Paraguai, Uruguai e nas bacias ligadas ao sistema lagunar da lagoa dos Patos, e a espécie *Salminus franciscanus*, recentemente descrita, que ocorre na bacia do Rio São Francisco (LIMA; BRITSKI, 2007; CYRINO; FRACALOSSO; ROUBACH, 2012).

O desenvolvimento de tecnologia para a produção das espécies do gênero *Salminus* em confinamento é motivado pelo: seu desempenho zootécnico (exemplares podendo alcançar de 1,2 a 2,0 kg em um ano), carne de excelente qualidade, elevado preço, alta demanda do mercado, e por ser uma espécie de interesse para a pesca esportiva e pesque-pague (SCHUTZ; NUÑER, 2007; FLORA et al., 2010; WEINGARTNER; ZANIBONI FILHO, 2010; MORO et al., 2013; VEECK et al., 2013). Outro fator que também justifica o domínio da tecnologia de produção do dourado é a conservação da espécie. Seu desaparecimento em ambiente natural é causado pela intensa degradação do seu habitat, lançamento indiscriminado de poluentes nos corpos hídricos, sobrepesca e a constante obstrução de suas rotas migratórias de reprodução pelas construções de barragens hidroelétricas (LOPES et al., 2007; SCHUTZ; NUÑER, 2007; FLORA et al., 2010; WEINGARTNER; ZANIBONI FILHO, 2010).

A técnica de reprodução induzida do dourado já é bem definida e estabelecida. O maior entrave é a fase larval, pois após a abertura da cavidade bucal e absorção do vitelo, as larvas se tornam predadores vorazes e praticam intenso canibalismo, sendo necessária a utilização de larvas forrageiras (e.g. curimatá *Prochilodus lineatus*) como alimento natural nos primeiros dias para assegurar maior sobrevivência. Esta, porém, é uma estratégia que aumenta significativamente o custo de produção de pós-larvas e juvenis de dourado (SCHUTZ; NUÑER, 2007). O preço de comercialização do juvenil do dourado é elevado quando comparado com as outras espécies, variando de R\$ 1.800,00 a R\$ 2.600,00 o milheiro (MORO et al., 2013). Entretanto, como após o quinto dia de eclosão as larvas já apresentam

atividade de enzimas digestivas proteolíticas e, consequente, capacidade de digerir dietas secas, o alimento vivo pode ser substituído gradativamente pela ração. Contrastando com as larvas de surubins, por exemplo, as larvas de dourado dispensam o condicionamento alimentar aceitando prontamente a dieta seca (VEGA-ORELLANA; FRACALOSSI; SUGAI, 2006; WEINGARTNER; ZANIBONI FILHO, 2010; CYRINO; FRACALOSSI; ROUBACH, 2012).

O dourado é uma espécie de hábito diurno, um predador visual cujas larvas e juvenis se alimentam de protozoários, microcrustáceos (e.g. cladóceros e copépodos), larvas de insetos e de peixes de outras espécies (FLORA et al., 2010; CYRINO; FRACALOSSI; ROUBACH, 2012). Na fase adulta é um peixe ictiófago por excelência, ou seja, alimenta-se exclusivamente de peixes predando principalmente espécies do gênero *Leporinus*, *Pimelodus* e *Astyanax* (ESTEVES; PINTO LÔBO, 2001; FLORA et al., 2010). A exemplo dos demais Characiformes ictiófagos, o aparelho digestório do dourado é adaptado anatomicamente e constituído por uma cavidade bucofaringeana projetada para predação, com dentição singular presente nas maxilas distribuídas em duas séries, estômago com paredes espessas, elásticas e resistentes, permitindo a ingestão de peixes com um terço ou até metade do seu comprimento total, cecos pilóricos e intestino relativamente curto (RODRIGUES; MENIN, 2006; FLORA et al., 2010).

As pesquisas realizadas sobre a nutrição do dourado são recentes e pouco numerosas, sendo que o primeiro trabalho realizado visou determinar o melhor nível de proteína na dieta do dourado (BORGHETI; CANZI; FERNANDEZ, 1990). Porém, devido à imprecisão dos métodos e o desconhecimento da digestibilidade dos ingredientes e rações utilizados nos ensaios, o referenciamento destes resultados é questionável (CYRINO; FRACALOSSI; ROUBACH, 2012). Estudos subsequentes objetivaram então preencher estas lacunas, compilando resultados de digestibilidade de diferentes ingredientes práticos (BRAGA; BORGHESI; CYRINO, 2008; BORGHESI; DAIRIKI; CYRINO, 2009).

Empregando metodologias e análise de dados científicos foi determinada a exigência proteica para juvenis de dourado para duas faixas de peso até 3,04 g – 57,6% PB e 5,68 g – 45,4%PB (TEIXEIRA; MACHADO; FRACALOSSI, 2010), e Dairiki et al. (2013) estabeleceram pelo método dose-resposta os níveis dos aminoácidos lisina (5,8%) e arginina (3,25%) exigidos na dieta. A suplementação de vitamina C e E nas dietas do dourado foi estudada por Okamura et al. (2008) com o intuito de investigar o sinergismo das duas vitaminas como antioxidantes para larvas. Foi registrada diferença significativa somente para o comprimento das larvas e em outros aspectos morfométricos para as três doses de vitamina

C, e nenhuma influência na adição e interação da vitamina E na dieta. Dentre as espécies do gênero, o *Salminus brasiliensis* é a que tem maior número de trabalhos relacionados, sendo considerada a espécie com maior potencial para piscicultura brasileira (WEINGARTNER; ZANIBONI FILHO, 2010) e, até o presente, não foram documentadas pesquisas sobre exigências em vitaminas para espécies do gênero *Salminus*.

2.2 Vitamina E na dieta de peixes

Vitaminas são compostos orgânicos distintos dos aminoácidos, carboidratos e lipídios, pois são exigidos em menores quantidades, geralmente provindas de fonte exógena. Vitaminas não são sintetizadas pelo metabolismo natural dos peixes, ou pelo menos não em quantidades suficientes para suprir suas exigências, e devem ser suplementadas nas dietas. Com papel vital no metabolismo, as vitaminas estão envolvidas em diversas reações e vias bioquímicas como catalisadores ou reguladores metabólicos, portanto são necessárias para o crescimento normal, reprodução e manutenção da higidez destes animais (GATLIN III, 2002; WEBSTER; LIM, 2002; PEZZATO et al., 2004; KOSHIO, 2007; PENG; GATLIN, 2009). As vitaminas podem ser classificadas em dois grupos: hidrossolúveis e lipossolúveis. As hidrossolúveis são: biotina, colina, ácido fólico, niacina, ácido pantotênico (B₃), riboflavina (B₂), tiamina (B₁), pirodoxina (B₆), cianocobalamina (B₁₂), e ácido ascórbico (vitamina C). As lipossolúveis são as vitaminas A, D, E e K. Quando ingeridas, as vitaminas hidrossolúveis geralmente não são armazenadas e seu excesso é excretado; em contrapartida, as lipossolúveis são absorvidas no intestino junto aos lipídios e podem ser armazenadas no tecido adiposo do animal; desta forma a absorção de gordura resulta em maior assimilação destas vitaminas que serão armazenadas nas reservas lipídicas corpóreas, e em níveis excedentes, podem causar transtornos na saúde e sintomas de toxidez (WEBSTER; LIM, 2002; NRC, 2011).

As exigências dietéticas vitamínicas podem variar em função da espécie de peixe, gênero, tamanho, ritmo de crescimento, sinergismo entre outros nutrientes, condições ambientais, funções metabólicas, bem como hábito alimentar e condições de confinamento (PEZZATO et al., 2004; NRC, 2011). A suplementação de vitaminas na dieta é particularmente importante na formulação e processamento de alimentos para peixes, já que as exigências destes animais são de maneira em geral, superiores àquelas dos animais terrestres (JIMENEZ e JIMENEZ, 2009).

Vitamina E é a denominação genérica para todos os compostos que tem a mesma atividade biológica do α -tocoferol, i.e., são solúveis em lipídios e consistem em tocoferóis e

tocotrienóis (HALVER, 2002; ZINGG, 2007; NRC, 2011). A vitamina E ocorre naturalmente em oito formas distintas: α , β , γ e δ tocoferóis e tocotrienóis. Os tocotrienóis apresentam uma insaturação isoprenóide na cadeia lateral, visto que tocoferóis têm um radical trimetil tridecil com três centros quirais, onde ocorre naturalmente a configuração RRR (Figura 1).

Figura 1 - Formas análogas de vitamina E (Adaptado de Zingg, 2007)

Recentemente foram descobertos alguns compostos análogos ao tocoferol, como o α -tocomonoenol e o tocoferol marinho, este último apresentando uma insaturação simples no final da sua cadeia lateral, que supostamente é uma adaptação de organismos marinhos aos ambientes com águas de baixa temperatura (ZINGG, 2007). A atividade de 1,0 mg de dl- α -tocoferil define uma unidade internacional (UI) para a vitamina E, e o potencial biológico dos seus isômeros são fixados em função do α -tocoferol (Tabela 1) (NRC, 2011). Os óleos de gérmen de trigo, de soja e de milho são fontes ricas em tocoferol (JIMENEZ; JIMENEZ, 2009; NRC, 2011). O análogo predominante de vitamina E em óleo de sementes de girassol é o α -tocoferol, o óleo de milho contém principalmente γ -tocoferol e o óleo de soja contém quantidades relativamente altas de δ -tocoferol (ZINGG, 2007).

Tabela 1 - Potencial biológico dos compostos com atividade de vitamina E comparado ao α -tocoferol

Composto	Atividade
α -tocoferol	1,0
β -tocoferol	0,5
γ -tocoferol	0,1
δ -tocoferol	0,03
α -tocotrienol	0,3
β -tocotrienol	0,05

Adaptado de (NG et al., 2004).

As vitaminas contidas nas rações estão propensas a perder sua atividade biológica quando expostas a condições adversas como umidade, temperatura, luz e lixiviação no ambiente aquático (KIRON, 2012; OLIVA-TELES, 2012). Os tocoferóis são estáveis em altas temperaturas e em meios ácidos apenas quando o ambiente está anóxico; em contrapartida, oxidam-se rapidamente na presença de oxigênio, de peróxidos, luz ultravioleta e outros agentes oxidantes (ZINGG, 2007; JIMENEZ; JIMENEZ; HAMRE, 2011). Devido à alta capacidade de oxidação, a suplementação de tocoferol nas rações comerciais é feita a partir das suas formas esterificadas, os ésteres de acetato e succinato, que quando encontrados nesta composição não possuem atividade antioxidante, mas sim maior estabilidade, reduzindo as perdas durante o processamento e armazenamento das rações (HALVER, 2002; HAMRE, 2011; NRC, 2011). O α -tocoferol acetato é a fonte mais comumente utilizada nos aditivos vitamínicos e quando ingerido, o éster sofre hidrólise no trato intestinal liberando a molécula de tocoferol para sua posterior absorção (HALVER, 2002; RIGOTTI, 2007; NRC, 2011).

Para ensaios de determinação de exigência em vitaminas são utilizados dietas formuladas a partir de ingredientes quimicamente caracterizados e deficientes ou isentos na vitamina específica em estudo, com consequente a adição de doses crescentes da mesma, i.e., ensaios dose-resposta (NRC, 2011). Ao avaliar os resultados do experimento, o desempenho zootécnico pode não ser o único parâmetro para estabelecer a exigência de vitaminas em peixes. Outras variáveis como acúmulo de lipídios corporal, deformidades esqueléticas, atividade de enzimas específicas, armazenamento de vitaminas nos tecidos, ausência de sinais de deficiência, quantidade de lipídios no fígado, índice hepatossomático, grau de oxidação lipídica e atividade das respostas imunes, também são usadas para a determinação da exigência em animais aquáticos (NRC, 2011).

Os resultados das pesquisas que procuraram determinar a exigência de vitamina E em peixes são bastante divergentes. Por ser uma vitamina lipossolúvel, a retenção corpórea e o tempo de depleção da vitamina varia entre as espécies, podendo causar variações nos resultados para uma mesma espécie (Tabela 2). Outro aspecto que deve ser ressaltado é a necessidade de se formular dietas experimentais considerando o suprimento mínimo de todos os outros nutrientes que possuem interação com o tocoferol, como o selênio, zinco, cobre e manganês, que atuam direta ou indiretamente na atividade de enzimas antioxidantes (e.g. superóxido dismutase e glutathione redutase) e a vitamina C, que participa na recuperação da forma oxidada do tocoferol, doando um átomo de hidrogênio, a retornando para o seu estado funcional (WAAGBO; HAMRE; MAAGE, 2001; HAMRE, 2011; NRC, 2011; OLIVA-TELES, 2012). As condições experimentais, como qualidade de água e os níveis de determinados ingredientes na dieta, também podem comprometer os resultados de exigência nutricional do animal. Dietas que apresentam fontes de lipídio de origem marinha e alguns tipos óleos vegetais, com altos teores de ácidos graxos altamente poli-insaturados, são mais susceptíveis à auto-oxidação e, dessa maneira, a exigência da suplementação com vitamina E como fator antioxidante também aumenta (LIN; SHIAU, 2005; OLIVA-TELES, 2012).

Tabela 2 - Exigências em vitamina E já determinadas para várias espécies de peixes e os parâmetros utilizados

Espécie	Vitamina E mg kg ⁻¹	Parâmetro utilizado	Referência
Salmão do Atlântico (<i>Salmo salar</i>)	60	GP	Hamre e Lie (1995)
Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	50	PLEAA	Cowey et al. (1983)
	20-30	PLEAA	Cowey et al. (1981)
Bagre do canal (<i>Ictalurus punctatus</i>)	50	PLEAA	Wilson et al. (1984)
Carpa capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	100,36	GP	Li et al. (2014)
Tilápia azul (<i>Oreochromis aureus</i>)	25	GP	Roem et al. (1990)
Tilápia híbrida (<i>Oreochromis niloticus</i> x <i>Oreochromis aureus</i>)	60-67	GP, PLEAA	Shiau e Shiau (2001)
“Hybrid striped bass” (<i>Morone chrysops</i> x <i>Morone saxatilis</i>)	28	GP	Kocabas e Gatlin (2009)
“Korean rock fish” (<i>Sebastes schlegeli</i>)	45	GP	Bai e Lee (1998)
Mrigal (<i>Cirrhinus mrigala</i>)	99	GP	Paul et al. (2004)
Rohu (<i>Labeo rohita</i>)	131,91	GP	Sau et al. (2004)
Garoupa (<i>Epinephelus</i> sp.)	104-115	GP, PLEAA	Lin e Shiau (2005)
“Red drum” (<i>Sciaenops ocellatus</i>)	31	PLEAA	Peng e Gatlin (2009)
“Spotted murrel” (<i>Channa punctatus</i>)	169	GP	Abdel Hammeid (2012)
Enguia japonesa (<i>Anguilla japonica</i>)	21,6	GP, EA	Bae et al. (2013)
“Parrot fish” (<i>Oplegnathus fasciatus</i>)	38	GP	Galaz et al. (2010)

PLEAA: Peroxidação lipídica estimulada pelo ácido ascórbico; ASD: Ausência de sinais de deficiência; GP: Ganho em peso; EA: Eficiência alimentar.

Sinais clínicos de deficiência em vitamina E foram descritos para diversas espécies de peixes durante ensaios laboratoriais: anemia e debilidade eritropoética, despigmentação, pigmentos ceróides no fígado, distrofia muscular envolvendo atrofia e necrose das fibras dos músculos brancos; edema no coração, músculo e outros tecidos pelo aumento da permeabilidade dos tubos capilares permitindo o escape de exsudatos e o seu acúmulo, que normalmente se tornam verde, resultado da lise da hemoglobina (HALVER, 2002; KIRON, 2012; NRC, 2011) (Tabela 3). No entanto, apesar de ser considerado um nutriente essencial, vários trabalhos não registram influência na suplementação da vitamina E nos parâmetros de desempenho ou mesmo sinais clínicos de deficiência, a exemplo dos trabalhos com o “red drum”, truta arco-íris, bagre do canal e salmão Coho, respectivamente de Huang et al. (2004), Lewis-McCrea e Lall (2007), e Peng e Gatlin (2009).

Tabela 3 - Sinais clínicos de deficiência em vitamina E apresentados por diversas espécies

Sinais de deficiência	Espécies
Ascite	Salmonídeos
Coloração escura na pele	Olhete, ‘hybrid striped bass’
Edema	Salmonídeos, “red drum”
Diátese exudativa	Bagre do canal
Alterações do perfil hematológico	Salmonídeos, carpa Indiana, ‘hybrid Striped Bass’
Hemorragia	Bagre do canal
Aumento no conteúdo de lipídio no fígado	Bagre do canal
Lordose	Carpa comum, carpa capim
Distrofia muscular	Salmonídeos, bagre do canal, carpa comum, ‘Korean rock fish’, carpa capim
Alterações patológicas dos órgãos	Bagre do canal, carpa comum
Despigmentação da pele	Salmonídeos, bagre do canal
Tetania	Salmonídeos, bagre da Índia, bagre africano, olhete

Adaptado de NRC (2011).

A vitamina E está presente na membrana celular e tem papel importante para fluidez e no funcionamento dos receptores para a resposta imune (TRICHET, 2010). A atividade antioxidante da vitamina E é vital para manter a homeostase inter e intracelular e promover a integridade da membrana e macromoléculas (DNA, proteínas, lipídeos e outras vitaminas), protegendo contra a oxidação por radicais livres e peroxidação durante o metabolismo normal, ou em condições adversas como enfermidades, estresse e poluição (HALVER, 2002; WEBSTER; LIM, 2002; CHEN et al., 2004). A defesa contra oxidação *in vivo* inclui enzimas (e.g. superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase), enzimas sintetizadas de forma

endógena (glutathiona, ubiquinona) e nutrientes antioxidantes (HALVER, 2002; HAMRE, 2011).

É aceito que o α -tocoferol se posiciona com cadeia fitil sob a parte hidrofóbica da membrana, enquanto o anel cromanol carrega o grupo OH^- polar e reativo, que reside na superfície da membrana (HAMRE, 2011). Os tocoferóis atuam como captadores dos radicais livres, competindo na doação de hidrogênio com os ácidos graxos poli-insaturados para os radicais lipídicos peroxil, neutralizando a reação oxidativa em cadeia durante a formação de peróxidos e protegendo as duplas ligações dos ácidos graxos e outros compostos de cadeias compridas e instáveis (JIMENEZ; JIMENEZ, 2009; HAMRE, 2011; KIRON, 2012).

Radicais livres são derivados do oxigênio e nitrogênio, caracterizados por conter elétrons não emparelhados, tornando-se assim extremamente reativos a biomoléculas. Pequenas quantidades de radicais livres são geradas no do metabolismo basal, por transporte de elétrons, pela atividade fagocitária e por algumas enzimas (oxigenases, citocromo P450) (HAMRE, 2011). Durante a reatividade na eliminação de radicais livres os tocoferóis possuem ordem de atividade $\alpha > \gamma > \beta > \delta$ e apenas uma molécula de α -tocoferol pode proteger aproximadamente 1.000 moléculas de ácidos graxos poli-insaturados contra oxidação (ZINGG, 2007; HAMRE, 2011). A oxidação lipídica *in vivo* normalmente é baixa, mas aumenta quando o animal é exposto ao estresse oxidativo. Quando a auto-oxidação lipídica é iniciada, um ciclo de reação autossustentável é estabelecido, onde o radical lipídico peroxil é formado para cada volta do ciclo reagindo com um ácido graxo poli-insaturado (PUFAS). Na ausência de antioxidantes, a oxidação lipídica pode progredir à medida que os PUFAS estão disponíveis para oxidação. Os principais produtos da auto-oxidação lipídica são os conjugados dienos e os hidroperóxidos lipídicos, que podem sofrer quebras para diferentes formas de produtos secundários de baixo peso molecular (i.e. aldeídos, alcanos, alcenos, alcoóis e ácidos) (HAMRE, 2011). Os resíduos secundários também podem residir nas moléculas de glicerol ou fosfolipídios dando origem a aldeídos que podem interferir nas funções e estrutura da membrana.

Durante o metabolismo normal as vitaminas possuem interação sinérgica entre nutrientes como outras vitaminas e minerais. Por exemplo, o ácido ascórbico e o tocoferol estão relacionados, pois a vitamina C possui capacidade de recuperar a forma oxidada vitamina E para a sua forma funcional, como também pode ter efeito inverso: a vitamina E pode reduzir a quantidade de vitamina C exigida durante o metabolismo normal (HILTON, 1989; OLIVA-TELES, 2012). Se houver alta inclusão de vitamina E na dieta e baixa quantidade de vitamina C, para restaurar a forma oxidada da vitamina E, o tocoferol oxidado

pode estar presente como radical tocoferoxil, agindo assim como um pró-oxidante (HAMRE, 2011).

A saúde dos animais varia de acordo com o tipo de dieta (KIRON, 2012). Uma dieta e um manejo alimentar adequados garantem a integridade do estado de saúde dos peixes. Já foi demonstrado que o efeito da suplementação da vitamina E na dieta de peixes resulta em melhor desempenho do sistema imunológico (HARDIE; FLETCHER; SECOMBES, 1990; WISE et al., 1993; PUANGKAEW et al., 2004; LIN; SHIAU, 2009), melhorando o índice de fagocitose, a produção de leucócitos (HARDIE; FLETCHER; SECOMBES, 1990; PULSFORD et al., 1995) e a atividade citotóxica dos leucócitos (CUESTA et al., 2001). Em mamíferos o efeito terapêutico da vitamina E está relacionado ao aumento na contagem de linfócitos, ao estímulo da atividade citotóxica das células, à fagocitose e à resposta mitogênica (KIRON, 2012). A suplementação de vitamina E na ração também mitiga o estresse de peixes submetidos a altas densidades e melhora os mecanismos de defesa quando os peixes são alimentados com dietas contendo lipídios oxidados (OLIVA-TELES, 2012).

Trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com rações contendo altos níveis de vitamina E apresentaram aumento da atividade de lisozima, na produção de formas reativas de oxigênio por leucócitos isolados do rim cefálico (KIRON et al., 2004) e aumento da capacidade de fagocitose de leucócitos presentes na mucosa gastrointestinal (CLERTON et al., 2001). O linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*) também apresentou melhor resposta imunológica de acordo com o aumento do nível de vitamina E na dieta, resultando em maior atividade do sistema complemento alternativo do soro, atividade da lisozima, atividade respiratória dos leucócitos e resistência ao desafio bacteriano (WANG et al., 2006). A suplementação da ração com níveis de 10 a 100 vezes acima do exigido também apresentou melhora nos parâmetros do sistema imunológico inato para variadas espécies (Tabela 4). Rações suplementadas com vitamina E também melhoraram o desenvolvimento das gônadas e fecundidade dos reprodutores e taxa de eclosão das larvas do linguado japonês (TOKUDA et al., 2010).

Tabela 4 - Níveis de vitaminas que melhoraram as respostas imunológicas para diversas espécies

Espécie (<i>Nome científico</i>)	Vitamina E na dieta	Duração do experimento	Melhora nos parâmetros	Referência
	mg kg ⁻¹	dias		
Salmão do Atlântico (<i>Salmo salar</i>)	800	140	Fagocitose	Hardie et al., (1990)
Dourada (<i>Sparus aurata</i>)	1200	30 a 45	Atividade hemolítica, Fagocitose	Ortuno et al., (2000)
	600	28	Atividade citotóxica dos leucócitos	Cuesta et al., (2001)
	1800	14	Atividade citotóxica dos leucócitos	Cuesta et al., (2001)
	1200 e 3000 (vit. C)	30	Atividade respiratória dos leucócitos	Ortuno et al., (2001)
	1200 e 3000 (vit. C)	14	Níveis de glicose depois de desafios de estresse	Ortuno et al., (2003)
Bagre do canal (<i>Ictalurus punctatus</i>)	240	120	Produção intracelular de ânions superóxidos pelos macrófagos	Wise et al., (1993)
	2500	180	Índice fagocítico	Wise et al., (1993)
Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	295	80	Fagocitose por leucócitos	Clerton et al., (2001)

Adaptado de Koshio (2007).

A adição de vitamina E na ração também se reflete no processamento do pescado, pois o teor de vitamina na dieta é diretamente relacionado à quantidade retida no filé, protegendo o pescado da oxidação lipídica. A utilização do α -tocoferol em dietas se mostrou mais eficaz na preservação dos filés de bagre do canal do que antioxidantes sintéticos, devido a sua maior retenção (GATLIN; BAI; ERICKSON, 1992). Filés de ‘turbot’ (*Scophthalmus maximus*) alimentado com dietas contendo 100, 500 e 1000 mg kg⁻¹ de tocoferol por 15 semanas apresentaram menores níveis de oxidação lipídica e perda de coloração (RUFF et al., 2003).

A grande diversidade de espécies e as inúmeras variáveis que influenciam na determinação de exigência dificultam o estudo das exigências e metabolismo da vitamina E em peixes. No entanto, é comprovada a sua importância para os peixes como um nutriente que tem propriedades antioxidantes, que promove melhora em diversos parâmetros imunológicos, garante maior viabilidade de gametas e até mesmo a conservação do produto final da piscicultura, o filé de pescado. Tendo em vista que apesar da suplementação vitamínica não figurar uma inclusão representativa durante a formulação de ração para peixes, em comparação aos demais nutrientes, seu efeito na higidez dos estoques afeta toda a cadeia produtiva da piscicultura, sendo necessários mais estudos relacionados com a suplementação de tocoferol na alimentação dos peixes.

2.3 Nutrição e sistema imune de peixes

Imunidade é um conjunto de mecanismos de defesa de alta complexidade, composto por uma vasta gama de componentes celulares e humorais, que objetiva preservar a homeostase e conferir aos animais proteção contra organismos patogênicos (POHLENZ; GATLIN III, 2014; URBINATI; ZANUZZO; BILLER-TAKAHASHI, 2014). Os peixes teleósteos possuem o sistema imune semelhante aos demais vertebrados, contando com as respostas inata e adquirida. No entanto, os mecanismos de defesa adquirido dos peixes não são tão efetivos quanto aquele dos vertebrados mais evoluídos: peixes têm resposta e memória imunológica mais curta e um repertório de imunoglobulinas limitado (SAKAI, 1999; TRICHET, 2010; KIRON, 2012; POHLENZ; GATLIN, 2014).

As primeiras linhas de defesa dos peixes são as barreiras físicas composta pelos tecidos epiteliais e muco (e.g. escamas, pele e trato gastrointestinal), e as barreiras fisiológicas, como o pH ácido do estômago, a flora bacteriana intestinal, e componentes humorais do muco (e.g. lectinas, lisozima, peptídeos bactericidas, sistema complemento) (WATANABE; KIRON; SATOH, 1997; TRICHET, 2010; URBINATI; ZANUZZO; BILLER-TAKAHASHI, 2014). Caso o patógeno consiga transpor estes obstáculos e invadir os tecidos internos, ocorre uma resposta inflamatória gerando vaso dilatação, permitindo que haja maior permeabilidade e capilaridade dos vasos sanguíneos, facilitando a mobilização de células citotóxicas não específicas (NCCs), granulócitos e macrófagos para o foco da infecção, sendo estes os componentes da segunda linha de defesa (SECOMBES, 1990). A última linha de defesa é a resposta imune adquirida, que ocorre quando o animal entra em contato com um antígeno ao qual já havia sido exposto anteriormente, desencadeando a cascata de reações para aumento de anticorpos circulantes específicos para o patógeno, ou a resposta por meio das células citotóxicas T em caso de infecções virais (TRICHET, 2010).

Uma grande variedade de células está envolvida na resposta imune celular de peixes: monócitos/macrófagos, granulócitos, trombócitos, NCCs, e linfócitos T e B (SECOMBES, 1996; URBINATI; ZANUZZO; BILLER-TAKAHASHI, 2014). Os granulócitos podem ser subdivididos em neutrófilos, eosinófilos e basófilos, sendo este último ausente na maioria das espécies de peixes (SECOMBES, 1996). Os componentes celulares do sistema imunológico têm a capacidade de detecção e eliminação de organismos patogênicos, reconhecendo as regiões específicas de moléculas (*Pathogen associated molecular patterns*/padrões moleculares associados aos patógenos - PAMPS) na superfície de agentes infecciosos (e.g. lipopolissacarídeos, peptideoglicanos, DNA bacteriano e ou RNA viral) (BELOSEVIC et al.,

2009; URBINATI; ZANUZZO; BILLER-TAKAHASHI, 2014). Os neutrófilos e macrófagos atacam os patógenos intra e extracelularmente, produzindo espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (ERN e ERO), fenômeno conhecido como explosão respiratória dos leucócitos (SIWICKI; STUDNICKA, 1987; SECOMBES, 1996). A produção da espécie reativa de oxigênio ocorre pela redução de um elétron da molécula de oxigênio pela enzima NADPH oxidase localizada na membrana plasmática dos fagócitos, formando o ânion superóxido O_2^- que, pela ação da enzima superóxido dismutase, se transforma em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um bactericida (SECOMBES, 1996; URBINATI; ZANUZZO; BILLER-TAKAHASHI, 2014).

Os principais componentes humorais são inibidores de crescimento de bactéria como os fatores de aglutinação, interferon, a transferrina, antiproteases, lisozima, proteína C reativa, peptídeos antibacterianos, as proteínas do sistema complemento na via clássica ou alternativa, e as lectinas (MAGNADOTTIR, 2006; KIRON, 2012; URBINATI; ZANUZZO; BILLER-TAKAHASHI, 2014). A transferrina é uma proteína que tem alta afinidade com íons metálicos tornando indisponível, por exemplo, o ferro que é essencial para proliferação de algumas bactérias. Além disso, a transferrina também tem capacidade quimiotática, recrutando macrófagos para o local da infecção (URBINATI; ZANUZZO; BILLER-TAKAHASHI, 2014).

Devido às suas propriedades antivirais, antibacterianas e anti-inflamatórias, a atividade enzimática da lisozima é um parâmetro imunológico importante tanto para vertebrados quanto para invertebrados (MAGNADOTTIR, 2006; SAURABH; SAHOO, 2008). Ela está presente nos ovos e em tecidos onde há elevada quantidade de leucócitos, como o rim cefálico, e em qualquer parte do corpo onde haja alto risco de infecção bacteriana, como o muco, a epiderme, as brânquias e trato gastrointestinal (YANO, 1996). A enzima atua em ligação específica β_{1-4} da parede celular de bactérias gram-positivas (ácido *N*-acetilmurâmico e *N*-acetilglucosamina), e de bactérias gram-negativas, apenas quando a camada peptidoglicana é exposta após lise da parede celular externa provocada pelo sistema complemento ou por outras enzimas líticas (SAURABH; SAHOO, 2008).

O sistema complemento dos peixes é constituído por mais de 35 proteínas solúveis no plasma que atuam em uma cascata de reações, promovendo quimiotaxia e induzindo a proliferação de linfócitos, opsonização e destruição do patógeno (HOLLAND; LAMBRIS, 2002; BOSHRA; LI; SUNYER, 2006; WHYTE, 2007). Esta resposta imune pode ser ativada por meio de três vias: (i) via clássica, ativada por complexo antígeno-anticorpo; (ii) via alternativa, ativada diretamente por vírus, bactérias, fungos ou tumores, e independem da ação

dos anticorpo; e (iii) via lectina, que exige a interação das lectinas com os açúcares encontrados na membrana celular dos micro-organismos (BOSHRA; LI; SUNYER, 2006). O conjunto de ação das três vias do sistema complemento promove a lise de membrana dos patógenos (NAKAO et al., 2011).

O sistema imunológico dos peixes é impactado quando os mesmos são confinados em incubadoras, tanques escavados, tanques-rede ou qualquer outro sistema de produção piscícola, em função do estresse referente à densidade de estocagem, manejo, variações na qualidade da água e tratamento com quimioterápicos, antibióticos e antifúngicos (SIWICKI et al., 1998; SAKAI, 1999). Desta forma, animais sensibilizados e imunodeprimidos tornam-se suscetíveis a doenças infecciosas, uma vez que no ambiente aquático já há a predisposição de organismos patogênicos oportunistas como vírus, bactérias, fungos, ectoparasitas e endoparasitas, especialmente quando lesionados nas práticas de manejo do estoque e da produção (SIWICKI et al., 1998; MORAES; MARTINS, 2004; KIRON, 2012; URBINATI; ZANUZZO; BILLER-TAKAHASHI, 2014). Além disso, a crescente utilização de ingredientes vegetais como sucedâneos à farinha e ao óleo de peixe nas rações também compromete indiretamente a atividade do sistema imunológico dos peixes como resultado da presença de fatores antinutricionais, principalmente aquelas espécies que possuem maiores exigências em proteína e energia (LIN; SHIAU, 2007; MONTERO et al., 2008; NRC, 2011; KIRON, 2012).

As enfermidades são responsáveis pela maior parte das perdas econômicas na aquicultura comercial (SEALEY; GATLIN, 1999). Uma vez instalada a infecção, produtores em geral recorrem ao uso indiscriminado de onerosos antibióticos e quimioterápicos na tentativa de contornar os prejuízos. Porém, a prática da medicação é complexa, pois os animais enfermos não se alimentam vigorosamente limitando assim o consumo necessário do antibiótico. A administração de medicamentos na forma adição de quimioterápicos diretamente na água pode ainda exigir elevadas quantidades de produtos dependendo do sistema de produção utilizado, o que, conseqüentemente, gera alto custo e prejudica a flora bacteriana do ambiente (ANDERSON, 1992). Além disso, se os antibióticos não forem administrados de maneira adequada podem gerar linhagens de bactérias mais resistentes ao medicamento (KIRON, 2012; RINGO et al., 2012).

Para garantir a sustentabilidade na produção aquícola surgiu o interesse de investigar a imunomodulação dos animais por meio de suplementos incluídos na dieta como manejo profilático. O uso de imunoestimulantes naturais é uma estratégia singular de piscicultores para controlar perdas por doença (RINGO et al., 2012), uma linha de pesquisa tradicional que

objetiva encontrar a melhor resposta do sistema imunológico por meio de nutrientes e outros compostos não nutritivos presentes na dieta (FLETCHER, 1986; LANDOLT, 1989; BLAZER, 1992; KIRON, 2012; POHLENZ; GATLIN III, 2014).

Vários aditivos alimentares são comprovadamente eficazes na modulação do sistema imune dos peixes: componentes bacterianos, derivados de algas, extratos animal, fitoterápicos, agentes químicos, polissacarídeos, citocinas e fatores nutricionais (SAKAI, 1999). Entretanto, existe controvérsia entre os pesquisadores quanto à classificação destes fatores imunomodulatórios. Enquanto Sakai (1999) considera como imunoestimulante todos os compostos que podem aumentar a resistência a doenças infecciosas pelos mecanismos de defesa do sistema imune não específico, Bricknell e Dalmo (2005) definem *quasi verbatim* que “Um imunoestimulante é um composto natural que modula o sistema imune aumentando a resistência contra doenças que pela maioria das circunstâncias é causada por um patógeno”.

Bricknell e Dalmo (2005) justificam esta constatação em virtude da descoberta dos receptores de reconhecimento padrão (RRP) na membrana dos leucócitos e as variadas respostas imunológicas obtidas pela ligação entre os RRP e os PAMPS. A ativação do sistema imune inato, então, pode ocorrer diretamente por substâncias imunoestimulantes como β -glucano, extratos de bactérias e fitoterápicos, que desencadeiam sinais intracelulares para produção de moléculas antimicrobianas (BRICKNELL; DALMO, 2005; RINGO et al., 2012). Assim, ambos os autores desconsideram como imunoestimulantes os compostos sintéticos (levamisol) e fatores nutricionais como aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas C, A e E, mesmo reconhecendo que estes nutrientes possuem sua importância no sistema imunológico, não estimulando a resposta imune *per se*, mas sim atuando indiretamente como substrato, precursores ou cofatores necessários para que as respostas imunes funcionem adequadamente (GANNAN; SCHROCK, 2001; KIRON, 2012; OLIVA-TELES, 2012; RINGO et al., 2012; POHLENZ; GATLIN III, 2014).

Proteínas e aminoácidos são moléculas de alta importância na estruturação e metabolismo de todos os organismos vivos, e a exemplo dos demais vertebrados, os peixes não sintetizam todos os aminoácidos e precisam obtê-los pela ingestão da dieta (NRC, 2011). A suplementação de alguns aminoácidos na dieta, a exemplo da glutamina, influencia a intensidade da resposta imune dos peixes e pode condicionar aumentos na secreção de citocinas, fagocitose, capacidade bactericida de neutrófilos e macrófagos e proliferação de leucócitos (CALDER; YAQOOB, 1999; POHLENZ et al., 2012). A arginina também possui seu papel no sistema imune como precursor do óxido nítrico (ON) e a sua suplementação na dieta pode aumentar a citotoxicidade de macrófagos e células NK, a síntese de citocinas, a

capacidade fagocitária e a capacidade bactericida de macrófagos e neutrófilos, a produção de ON pelos macrófagos e a explosão respiratória dos leucócitos. De fato, bagres do canal alimentados com dietas suplementadas com arginina e infectados experimentalmente com *Edwardsiella ictaluri* apresentam melhor na taxa de sobrevivência (CHENG; BUENTELLO; GATLIN, 2011; CHENG; GATLIN; BUENTELLO, 2012; POHLEN, et al., 2012).

Lipídios são importantes fontes de energia na dieta dos peixes provendo ácidos graxos essenciais que não são naturalmente sintetizados pelo metabolismo, pelo menos não em quantidade suficiente para crescimento normal e manutenção da saúde dos animais (GATLIN III, 2002). Os ácidos graxos poli-insaturados e monoinsaturados estão indiretamente envolvidos em respostas imunes como fluidez de membrana, síntese de eicosanoides, regulação da expressão gênica, apoptose e modulação da microbiota intestinal (KIRON, 2012). Quando alimentado com maiores níveis de ácidos graxos altamente poli-insaturados, o linguado japonês apresenta maior produção de ânions superóxidos isolados dos macrófagos do rim cefálico e maior atividade hemolítica do sistema complemento alternativo (WANG et al., 2006). Aumentos na atividade fagocitária e produção de ânions superóxidos também foram registrados para o “yellow croaker” (*Larmichthys crocea*) alimentado com dieta suplementada com ácido linoleico (ZUO et al., 2012).

O ácido ascórbico ou vitamina C atua como agente redutor para as células e serve de cofator para incorporação de oxigênio molecular em diferentes substratos. Sua importância para o sistema imunológico é indiretamente comprovada pelo fato que leucócitos e órgãos como o rim cefálico e baço possuem alta concentração de vitamina C (TRICHET, 2010). Uma melhora na atividade respiratória dos leucócitos isolados de “hybrid striped bass”, “yellow croaker” (*Pseudosciaena crocea*) e dourada foram registradas quando os animais foram alimentados com dietas suplementadas com ácido ascórbico (ORTUNO et al., 2001; SEALEY; GATLIN, 2002a; AI et al., 2006).

Por anos a pesquisa em nutrição de peixes aceitou como definição de exigências nutricionais a quantidade mínima dos nutrientes dietéticos para desempenho normal e sem sinais deficiência (NRC, 2011), i.e., se uma ração for formulada adequadamente, os ingredientes ali contidos devem suprir as exigências básicas para o animal e seu metabolismo normal. Contudo, quando os nutrientes são fornecidos em níveis acima da exigência, ou mesmo quando não são nem mesmo exigidos para o metabolismo normal, podem comprovadamente melhorar uma ou mais funções do sistema imunológico. Para obter melhor saúde, tolerância ao estresse e resistência a doenças em condições práticas, é essencial prover os animais de recursos adicionais na forma de dietas enriquecidas com nutrientes ou

moléculas que possam promover maior grau de proteção frente a infecções (GATLIN III, 2002; TRICHET, 2010; KIRON, 2012; OLIVA-TELES, 2012), ou seja, praticar a imunonutrição, i.e., a modulação das funções imunológicas utilizando nutrientes específicos ou outros componentes na dieta, que podem estar além dos níveis exigidos para o crescimento normal (POHLENZ; GATLIN III, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Juvenis de dourado (Piscicultura Águas Claras[®], Mococa, SP, Brasil) foram alojados em caixas de polipropileno (1000 L) em sistema de recirculação fechado com filtragem mecânica e biológica, trocador de calor com termostato e aeração forçada por meio de sopradores e pedras difusoras. Depois de aclimatados às condições laboratoriais, os peixes foram alimentados com uma dieta basal isenta em tocoferol em duas refeições diárias (08h00m e 17h00m) até saciedade aparente por 30 dias antes do início do experimento, visando esgotar o tocoferol armazenado nos lipídios corporais. Após este período de depleção, 420 peixes foram manejados, pesados ($20,04 \pm 0,09$ g) e distribuídos em 28 caixas de polipropileno (500 L) e alimentados por 78 dias com dietas contendo seis doses crescentes de vitamina E (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 3.500 mg kg⁻¹ de α -tocoferol acetato) e um nível sem a suplementação considerado como controle, em um delineamento inteiramente aleatorizado (n=4). Parâmetros de qualidade de água foram medidos diariamente utilizando-se oxímetro (YSI ProODO, Yellow Springs, OH, EUA) para oxigênio dissolvido e temperatura, e semanalmente foram monitorados salinidade, pH (sonda multiparâmetro Horiba U-52, Irvine, CA, EUA) e amônia não-ionizada (teste colorimétrico). A qualidade de água durante o período experimental foi mantida dentro dos seguintes limites de variação: oxigênio dissolvido (mg L⁻¹) $7,76 \pm 0,83$; temperatura (°C) $24,14 \pm 1,06$; pH $7,6 \pm 0,1$; salinidade (%) 0,13; amônia tóxica (mg L⁻¹) $< 0,004$ (média $\pm$ erro padrão).

Ao início do período experimental os peixes foram submetidos a jejum de 24 horas, anestesiados com banho de benzocaína (100 mg L⁻¹) e pesados em grupos para cálculo dos dados de desempenho:

- Ganho de peso
GP = peso final – peso inicial;
- Consumo de ração
- Conversão alimentar
CA = consumo de ração $\div$ ganho de peso;
- Taxa de crescimento específico
$$TCE = 100 \times [(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) \div 78 \text{ dias}]$$
- Sobrevivência
$$S = [(100 \times \text{número de animais final}) \div \text{número de animais inicial}]$$
- Índice hepatossomático
IHS = 100 x (peso do fígado/peso do peixe)

Um dia após o término da alimentação os peixes foram também pesados em conjunto e cinco peixes escolhidos aleatoriamente, anestesiados com benzocaína (100 mg L^{-1}) para coleta de sangue e posteriormente submetidos a eutanásia com uma superdosagem do mesmo anestésico (1 g L^{-1}), pesados individualmente e em seguida foi excisado tecido muscular e hepático dos indivíduos. O sangue foi coletado com seringas plásticas esterilizadas e descartáveis (3 mL) por punção caudal, em dois momentos: um dia após os 78 dias de alimentação e sete dias após a infecção bacteriana com *Aeromonas hydrophila*.

3.1 Formulação e composição da dieta experimental e quantificação de vitamina E

Para estabelecer o nível ótimo de vitamina E na dieta foram utilizados ingredientes isentos do nutriente para confecção da ração (Tabela 5). Estudos prévios do Setor de Piscicultura concluíram que rações confeccionadas apenas com ingredientes como a caseína e albumina como fonte de proteína apresentam baixa aceitação por peixes estenófagos, em especial cacharas (*Pseudoplatystoma reticulatum*) devido à baixa palatabilidade, havendo uma maior rejeição da ração confeccionada com estes ingredientes (ZANON et al., 2011). Desta forma, foi utilizada a farinha de peixe desengordurada como ingrediente proteico.

Tabela 5 - Composição centesimal e composição em nutrientes em nutrientes (± EP)

Ingrediente	Quantidade
	%
Farinha de peixe desengordurada	60,00
Amido	28,50
Óleo de milho ²	8,00
Premix ¹	2,00
Celulose	1,50
Composição em nutrientes	
Umidade	5,45 ± 0,29
Proteína bruta	45,88 ± 0,38
Extrato etéreo	6,82 ± 0,43
Matéria mineral	11,49 ± 0,08
Fibra bruta	1,21 ± 0,09
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	4449 ± 19

¹ Mistura vitamínica e mineral isento em vitamina E (In Vivo®); enriquecimento mínimo (por kg): vitamina A 2.500.000 UI; vitamina D3 500.000 UI, vitamina K3 3.500 mg; vitamina C 25.000 mg; tiamina (B1) 7.000 mg; riboflavina (B2) 7425 mg; piridoxina (B6) 6.525 mg; vitamina B12 10.000 mcg; niacina 37.500 mg; colina 165.000 mg; biotina 50 mg; ácido fólico 1.500 mg; ácido pantotênico 20.000 mg; cobre 3.000 mg; cobalto 250 mg; ferro 25 g; iodo 660 mg; manganês 15,0 g; selênio 110 mg; zinco 30 g.

² Óleo de milho isento de tocoferol.

Para o processo de extração lipídica foi desenvolvido um aparelho Soxhlet em aço inoxidável (Tecnal®; Piracicaba, SP, Brasil) acoplado a chapa aquecedora (Solab®; Piracicaba, SP, Brasil) para aquecimento do solvente (70°C) e lavagem da amostra (3 kg; 12 horas). O solvente selecionado foi o hexano e as amostras eram envoltas com papel filtro para o processamento. A farinha de peixe desengordurada era então seca em estufa (60°C) de ar circulante por 12 horas para volatilização do solvente. A análise centesimal da farinha de peixe antes e após a lavagem com hexano está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição da farinha de resíduo de salmão íntegra e desengordurada

Composição	Farinha original	Farinha desengordurada
	----- % -----	
Umidade	8,43	7,63
Proteína bruta	64,89	76,69
Extrato etéreo	10,07	1,2
Fibra bruta	0,00	1,25
Matéria mineral	16,07	19,65

Os ingredientes foram homogeneizados em misturador giratório e divididos em porções para os tratamentos. A mistura vitamínica e mineral isenta do alfa-tocoferol acetato (In Vivo[®]; Paulínia, SP, Brasil) foi confeccionada exclusivamente para o experimento. A mistura da ração basal foi separada e adicionada em quantidades crescentes de DL-alfa-tocoferil acetato (50% ROVIMIX DSM, Overloon, Holanda) em substituição à celulose. A inclusão de vitamina E nas doses de 0; 50; 100; 150; 200; 250; e uma superdose de 3500 mg kg⁻¹ resultaram em rações contendo: 7,43; 54,68; 95,74; 162,62; 197,78; 247,29; e 3.731,44 mg DL-alfa-tocoferil acetato kg⁻¹ de dieta (Tabela 7). Foi utilizado óleo de milho isento de tocoferol (MP Biomedicals[®]; Santa Ana, CA, EUA) como fonte lipídica. A ração então foi processada em extrusora experimental (Ibamaq PQ-30, Ribeirão Preto, Brasil), seca em estufa de ar circulante (50°C) por 24 horas e armazenada em recipientes plásticos opacos e hermeticamente fechados sob congelamento (-8°C) durante todo o experimento.

A composição centesimal da ração foi determinada pelos procedimentos da AOAC (2000) e a concentração de vitamina E foi mensurada nas rações, no fígado e no músculo pela quantificação de α -tocoferol por HPLC (n=2). Para a análise do armazenamento da vitamina E no conteúdo hepático e muscular, dois peixes de cada unidade experimental foram amostrados aleatoriamente e o fígado e músculo foram homogeneizados para representar a unidade experimental.

Tabela 7 - Níveis esperados e detectados da vitamina E nas dietas experimentais

Tocoferol esperado	Tocoferol detectado
mg kg	mg kg
0	7,43
50	54,68
100	95,74
150	162,62
200	197,78
250	247,29
3500	3731,44

Fonte de vitamina E: DL- α -tocoferil acetato (50%) ROVIMIX.

3.2 Respostas do sistema imune inato

O sangue coletado foi separado em dois microtubos, um contendo 10 μ L de heparina sódica e outro não-heparinizado, destinado para obtenção do soro e que foi mantido em descanso em temperatura ambiente por duas horas para subsequente centrifugação (2.100 g, 5

min.). Os microtubos com sangue heparinizado foram destinados à análise da explosão respiratória dos neutrófilos no mesmo dia do término do experimento, e os microtubos com soro foram congelados em freezer a -80°C para as demais análises.

3.2.1 Concentração das imunoglobulinas séricas

Alíquotas de soro foram separadas por centrifugação das amostras de sangue coletadas. A concentração total de imunoglobulinas no soro foi determinada através do método indireto pela diferença entre a concentração de proteína total (Biureto) e albumina, realizada de acordo com as instruções para uso dos ‘kits’ de determinação de proteína total e albumina total (Bioclin[®]; Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.2.2 Concentração de lisozima

A concentração de lisozima no soro foi medida por meio da redução da densidade óptica, como estabelecido Ellis (1990) com modificações de Abreu et al. (2009). As amostras de soro foram submetidas a tratamento térmico (56°C) durante 30 min. para inativação das proteínas do sistema complemento, garantindo que a lise da suspensão de bactéria acontecesse por ação exclusiva da lisozima. A suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698; Sigma Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA) foi dissolvida em concentração $0,2\text{ mg mL}^{-1}$ em tampão fosfato salino (PBS – “Phosphate buffer saline” $0,01\text{M}$, pH 7,4; Sigma Aldrich[®]) com pH ajustado para 6,4. Em cubeta de quartzo de 1 mL foram adicionados 150 μL de soro, 150 μL de PBS e 300 μL da suspensão de *Micrococcus*. Após incubação a 26°C por 1 min, foi realizada a leitura cinética da redução da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm (Shimadzu[®] UV-1800, Kyoto, Japão) aos 0,5 e 5 minutos. O resultado da diferença entre a leitura final e inicial determinou a atividade da concentração de lisozima no soro a partir do uso da equação obtida durante o estabelecimento da reta padrão usando lisozima de clara de ovo (Sigma Aldrich[®]; 88.015 U mg^{-1}) em diferentes diluições (Figura 2).

Figura 2 - Equação padrão da atividade da lisozima de clara de ovo

3.2.3 Atividade respiratória dos leucócitos

A análise da atividade respiratória dos leucócitos foi realizada de acordo com Siwicki, Anderson e Rumsey (1994). O método consiste em determinar as espécies reativas de oxigênio produzidas pelos neutrófilos no *burst* oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) que forma um precipitado de material insolúvel com coloração azul escuro no interior dos fagócitos, denominados grânulos de *formazan*. Para dosagem do precipitado, 100 μL do sangue heparinizado foi adicionado a 100 μL de PBS com 0,002 g mL^{-1} de *nitroblue tetrazolium* (NBT, Sigma Aldrich®). A solução foi homogeneizada e incubada por 30 min. à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após a incubação, 50 μL da suspensão homogeneizada foram transferidos para tubos de ensaio de vidro com 1,0 mL de N, N-dimetil formamida (DMF, Sigma Aldrich®) e centrifugado a 3.000 g por 5 min. Após a lise da parede celular dos neutrófilos pela DMF e consequente liberação do corante NBT reduzido para a solução, a absorbância da solução foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm (UV-1800 Shimadzu®).

3.2.4 Análise da atividade hemolítica do sistema complemento – via alternativa

A análise da atividade hemolítica das proteínas do sistema complemento (via alternativa) foi realizada por meio de ensaio cinético que permite calcular o tempo necessário para que estas proteínas séricas promovam 50% da lise de uma suspensão de eritrócitos de coelho segundo metodologia descrita em Polhill, Pruitt e Johnston (1978). As amostras foram analisadas no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de

Mesquita Filho” *campus* de Jaboticabal, São Paulo. Foram amostrados 10 µL do soro de todas as amostras para realizar um padrão e estabelecer a quantidade de soro necessária para realizar a análise.

3.2.5 Desafio com *Aeromonas hydrophila*

Para aferir os efeitos dos níveis crescentes de vitamina E dietética na resistência a agentes patogênicos foi realizado um desafio bacteriano com uma cepa virulenta de *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), adquirida da Fundação André Tosello[®] (Campinas, SP, Brasil). As bactérias liofilizadas foram reidratadas em solução salina 0,3% e incubadas em Erlenmeyers de 500 mL em caldo de soja triptona (TBS) previamente autoclavado. Posteriormente à incubação, o meio de cultura TBS foi semeado em meio ágar-ágar por 24 horas para confirmar a não contaminação do meio de cultura por outras bactérias e atividade do patógeno, i.e., capacidade de formação de colônias. As bactérias foram incubadas durante 24 horas em estufa climatizada (26°C) com agitação constante, centrifugadas em tubos de polipropileno de 50 mL com solução salina estéril 0,3% e resuspendidas até a remoção total do meio de cultura e obtenção de uma solução cristalina. Sete peixes de cada parcela experimental foram transferidos para um sistema de aquários de vidro (70 L) com entradas de água independente, renovação constante em sistema aberto e aeração forçada através de sopradores e pedras porosas difusoras. A infecção foi realizada através de injeção intraperitoneal com a bactéria resuspendida em solução salina 0,3% na concentração de $2,4 \times 10^8$ UFC (escala de MacFarland). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia e foi monitorada a sobrevivência dos animais durante sete dias. Após o sétimo dia, três peixes de cada aquário foram aleatoriamente amostrados para avaliar as respostas imunológicas após a infecção.

3.3 Oxidação lipídica da fração mitocondrial hepática estimulada pelo Ácido ascórbico e FeCl₃

Para o desafio *in vitro* oxidativo foi utilizada a metodologia proposta por Noguchi, Cantor e Scott (1973), adaptada por Cowey et al. (1981) com pequenas modificações. Três fígados de cada unidade experimental foram utilizados, pesados individualmente e amostrados 0,2 g de cada tecido e homogeneizados em 2,0 mL de solução tampão Tris-HCl 0,174 M (KCl – 0,025 M pH 7,4) com dispersador Ultra Turrax T10 (IKA[®], North Chase, NC, USA). Foram

aliquotados 1,5 mL do homogenato em microtubos e centrifugado a 600 g por 10 minutos. O sobrenadante (fração mitocondrial) foi transferido para outro microtubo e o precipitado descartado. A fração mitocondrial foi centrifugada novamente a 10.000 g por 10 minutos e o precipitado lavado, ressuspensionado com solução tampão Tris-HCl, e novamente centrifugado a 3.500 g por 10 minutos, sendo esta última etapa repetida duas vezes.

Para mensurar a quantidade de proteína na fração mitocondrial foi utilizada a metodologia de Bradford et al. (1976) modificada. Em poços de microplaca de fundo chato foram pipetados 10 µL da suspensão mitocondrial, em duplicata por amostra, e 190 µL do reagente de Bradford. As amostras foram incubadas por 10 minutos, com leve agitação, e a leitura foi realizada a 610 nm em leitor de microplaca Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, USA). Para estabelecer a curva padrão, foi utilizada a albumina de soro bovino dissolvida em solução tampão Tris-HCl com diferentes diluições e o resultado da concentração de proteína foi expresso em mg/mL (Figura 3).

Figura 3 - Equação padrão da proteína utilizando albumina de soro bovino

Para todas as amostras, foram separados 500 µL da suspensão mitocondrial, pipetados em tubos de ensaio e incubados, com solução tampão ácido ascórbico-FeCl₃ (0,133 M), KCl (0,1M), e fosfato (0,033 M), durante 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação foram adicionados 1 ml de ácido tricloroacético (20%) e 1 ml de solução de ácido tiobarbitúrico (0,67%). As amostras foram levadas a banho Maria em água fervente, retiradas após 20 minutos e resfriadas em água corrente. O sobrenadante foi coletado e lido em espectrofotômetro a 535 nm (UV-1800 Shimadzu®). Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído/mg de proteína.

Para estabelecer a curva padrão de malondialdeído foi utilizada solução de 1,1,3,3 - tetramethoxypropane (Sigma Aldrich®) diluída em tampão tris-HCl para concentração de 5×10^{-7} , e diluída novamente em série, e 500 μL foram amostrados e incubados em ácido ascórbico- FeCl_3 e ácido tiobarbitúrico obtendo concentrações finais de 0,5 a 5×10^{-9} (Figura 4 e 5).

Figura 4 - Equação padrão de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

Figura 5 - Tubos de ensaio contendo teores crescentes de 1,1,3,3 tetramethoxypropane

3.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA; $\alpha=0,05$) (PROC GLM) e quando detectada diferença significativa entre os tratamentos, os dados foram submetidos à análise de comparação múltipla de médias de Tukey (mean HSD) e regressão segmentada (PROC NLIN). Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico SAS 9.2 (SAS Institute; Cary, NC, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros de desempenho e potencial antioxidante

Foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos para os parâmetros de desempenho ($P > 0,001$), no entanto não foi possível estabelecer uma regressão explicando a interação entre o ganho de peso e demais parâmetros de maneira dose-dependente (Tabela 8). Resultados similares foram registrados em ensaio dose-resposta para o “red drum” (*Sciaenops ocellatus*), para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (COWEY et al., 1981; COWEY; ANDRON; YOUNGSON, 1983; WILSON; BOWSER; POE, 1984; PENG; GATLIN, 2009). Nesses ensaios foi realizada a análise de peroxidação lipídica no fígado estimulado pelo ácido ascórbico nos microsossomos hepáticos e estes resultados estabeleceram a exigência de vitamina E para estas espécies.

O ascorbato junto à presença de íons férricos (Fe^{3+}) estimula a formação de peróxidos em homogenatos, principalmente em frações mitocondriais, pois estas organelas possuem em sua composição aproximadamente 25% de ácidos graxos poliinsaturados (TAPPEL; ZALKIN 1959; WILLS, 1969). Quando a peroxidação *in vitro* é estimulada pelo tampão ácido ascórbico- FeCl_3 , homogenatos de fígado e, frações mitocondriais e microsossomais hepáticas de animais alimentados com dietas deficientes em vitamina E produzem espécies reativas ao que por sua vez geram produto de coloração laranja-avermelhado com o ácido tiobarbitúrico e tratamento térmico (BIERI; ANDERSON, 1960; COWEY et al., 1981; DRAPER et al., 1993; NOGUCHI; CANTOR; SCOTT, 1973; TAPPEL; ZALKIN, 1959; WILBUR, 1949).

O intervalo de 0 a 50 mg kg⁻¹ de α -tocoferol acetato foi insuficiente para prevenir a formação de malondialdeído na fração mitocondrial (Figura 6), e a dose mínima de 58,90 mg kg⁻¹ de α -tocoferol acetato foi estabelecida por regressão segmentada ($R^2 = 0,99$) (Figura 7). Foram encontrados valores similares para peixes de água doce como a tilápia híbrida (SHIAU; SHIAU, 2001), truta arco-íris (COWEY; ANDRON; YOUNGSON et al., 1983) e bagre do canal (WILSON; BOWSER; POE, 1984).

Figura 6- Amostras de fração mitocondrial de dourado após desafio oxidativo e aquecimento com ácido tiobarbitúrico

Figura 7- Concentração de malondialdeído formado na fração mitocondrial após o desafio de oxidativo ($\pm$ EP)

Em contrapartida, outros estudos determinaram a exigência da vitamina E para diversas espécies com base em um melhor desempenho: 28 mg kg⁻¹ de ração para o “hybrid striped bass” (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) (KOCABAS; GATLIN, 1999); 45 mg kg⁻¹ para o “Korean rock fish” (*Sebastes schlegeli*) (BAI; LEE, 1998); 60 e 66 mg kg⁻¹ para a tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) (SHIAU; SHIAU, 2001); 100 mg kg⁻¹ para o “mrigal” (*Cirrhinus mrigala*) (PAUL; SARKAR; MOHANTY, 2004); 131,91 mg kg⁻¹ para o “rohu” (*Labeo rohita*) (SAU et al., 2004); 61 e 104 mg kg⁻¹ para garoupa (*Epinephelus malabaricus*) em dietas com 4 e 8% de lipídio, respectivamente (LIN; SHIAU, 2005); 169 mg kg⁻¹ para o “Spotted murrel” (*Chana punctatus*) (ABDEL-HAMEID; ABIDI; KHAN, 2012); 21 mg kg⁻¹ para enguia japonesa (*Anguilla japonica*) (BAE et al., 2013); 38 mg kg⁻¹ para o “parrot fish” (*Oplegnathus fasciatus*) (GALAZ; KIM; LEE, 2010) e 100 mg kg⁻¹ para a carpa capim (*Ctenopharyngodon idellus*) (LI et al., 2014).

Tabela 8 - Efeito da vitamina E nos parâmetros de desempenho, sobrevivência e desafio de peroxidação lipídica *in vitro* do fígado (média $\pm$ erro padrão)

Vitamina E (mg kg ⁻¹ de α - tocoferol acetato)	PI (g)	GPI (g)	TCE (% dia ⁻¹)	CA	IHS	TBARS nmol mg ⁻¹ de proteína	Sobrevivência (%)
0 (7,43)	19,94 $\pm$ 0,18	59,2 $\pm$ 2,4 ^{AB}	1,79 $\pm$ 0,03 ^{AB}	1,17 $\pm$ 0,04 ^{AB}	0,78 $\pm$ 0,06	36,08 $\pm$ 2,62 ^A	96,67
50 (54,68)	20,18 $\pm$ 0,16	49,4 $\pm$ 1,2 ^C	1,60 $\pm$ 0,04 ^D	1,23 $\pm$ 0,03 ^A	0,74 $\pm$ 0,09	12,11 $\pm$ 2,69 ^B	95
100 (95,74)	20,06 $\pm$ 0,19	63,8 $\pm$ 0,9 ^A	1,92 $\pm$ 0,01 ^A	1,06 $\pm$ 0,01 ^C	0,72 $\pm$ 0,08	9,05 $\pm$ 0,91 ^B	100
150 (162,62)	20,10 $\pm$ 0,11	48,2 $\pm$ 3,2 ^D	1,62 $\pm$ 0,07 ^D	1,10 $\pm$ 0,05 ^{BC}	0,79 $\pm$ 0,06	9,63 $\pm$ 1,81 ^B	98,33
200 (197,78)	19,97 $\pm$ 0,14	54,1 $\pm$ 1,6 ^{BC}	1,73 $\pm$ 0,03 ^B	1,14 $\pm$ 0,02 ^{BC}	0,90 $\pm$ 0,13	9,67 $\pm$ 1,75 ^B	98,33
250 (247,29)	20,07 $\pm$ 0,19	55,3 $\pm$ 0,6 ^B	1,76 $\pm$ 0,01 ^{BC}	1,05 $\pm$ 0,04 ^C	0,73 $\pm$ 0,10	11,19 $\pm$ 1,47 ^B	100
3500 (3731,44)	19,99 $\pm$ 0,18	54,6 $\pm$ 0,9 ^B	1,69 $\pm$ 0,04 ^{CD}	1,07 $\pm$ 0,02 ^B	0,65 $\pm$ 0,06	9,88 $\pm$ 2,64 ^B	93,33
ANOVA							
Valor de F	0,26	9,28	9,45	3,78	1,12	22,16	1,66
Valor de P	0,95	< 0,0001	< 0,0001	0,01	0,54	<0,0001	0,18

Legenda: PI - Peso inicial; GPI - Ganho de Peso Individual; TCE - Taxa de crescimento específico; CA - Conversão alimentar; IHS - Índice hepatossomático; TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Todos os trabalhos citados acima incluíram óleo de peixe ou outro tipo de subproduto lipídico marinho na formulação da dieta, mesmo quando eram utilizadas espécies de peixe de água doce como modelo experimental, o que pode justificar a diferença entre os resultados referenciados com os do presente trabalho. Estas fontes lipídicas contêm níveis elevados de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA – “polyunsaturated fatty acids”), e.g. ácido docosaenoico (22:6 n-3) e ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3), que por sua vez possuem alta propensão à oxidação e podem gerar produtos insalubres que, uma vez incorporados a dietas, afetam o crescimento e metabolismo normal dos animais. Assim, haveria interação entre a vitamina E e os PUFA, sendo que o nutriente vitamínico atuaria como um antioxidante. O que reforça esta hipótese são os resultados publicados por Cowey, Andron e Youngson (1983) que registraram aumento na exigência de vitamina E à medida que aumentaram os níveis de PUFA na dieta da truta arco-íris. Em contraste, o presente trabalho utilizou como única fonte lipídica o óleo de milho isento de tocoferol, que possui quantidade limitada de PUFA (e.g. ácido linolênico, 18:3 n-3) (NRC, 2011). Além disso, a quantidade de lipídios na dieta também pode influenciar na exigência de vitamina E, como foi relatado para garoupas (*Epinephelus malabaricus*) e tilápias, que apresentaram exigências mais elevadas e correlacionadas aos níveis mais elevados de lipídios na dieta (ROEM; KOHLER; STICKNEY, 1990; SHIAU; SHIAU, 2001; LIN; SHIAU, 2005).

Outros fatores, como o sinergismo entre o tocoferol e as vitaminas A e C, e os microminerais, importantes componentes da estrutura das enzimas antioxidantes (e.g. Se, Cu, Fe, Zn e Mn), também podem explicar os resultados obtidos. A mistura vitamínica e mineral utilizada era de origem comercial e continha teores de ácido ascórbico, ácido retinóico e microminerais muito além da exigência de qualquer espécie de peixe confinada (NRC, 2011), o que pode ter causado um efeito poupador na vitamina E, dificultando assim o processo de depleção, oxidação lipídica e do nutriente durante o ensaio experimental. De fato este efeito poupador foi relatado para o “hybrid striped bass” em um ensaio fatorial, resultando em diferença no crescimento, eficiência alimentar, sobrevivência e retenção dos nutrientes nos tecidos corporais nos tratamentos isentos de vitamina C e E (SEALEY; GATLIN, 2002a). Respostas semelhantes para estas duas vitaminas também foram registradas para o salmão do Atlântico e a perca amarela (*Perca flavescences*) (HAMRE et al., 1997; LEE; DABROWSKI, 2003).

O selênio compõe a enzima antioxidante glutathione peroxidase que protege os fosfolipídios insaturados da membrana celular contra peróxidos (HILTON, 1989). Além da mistura mineral, a farinha de peixe é um ingrediente com teores elevados em selênio, o que

pode também ter fornecido aos animais níveis elevados compensando a deficiência de vitamina E (PEZZATO et al., 2004). Em estudo pesquisando a interação nutricional do selênio com a vitamina E, Le, Fotadar e Patridge (2014) relataram que níveis elevados de selênio compensaram os baixos níveis de vitamina E para o ganho de peso do olhete (*Seriola lalandi*). A garoupa também não teve seu desempenho comprometido quando alimentada com dietas contendo níveis reduzidos de vitamina E, mas níveis elevados de selênio (LIN; SHIAU, 2009).

Os resultados de concentração de vitamina E obtidos no tecido hepático e muscular no tratamento controle reforçam a hipótese de que a interação entre os outros nutrientes na dieta retardou a depleção do nutriente, mesmo quando os peixes foram submetidos à dieta basal durante o período de 30 dias. Desta maneira, não foi possível observar sinais clínicos de deficiência, mas foi possível detectar diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos e definir relação linear entre as doses de vitamina na dieta e no fígado (Figura 3). Uma tendência linear de retenção de tocoferol no fígado também foi relatada por Kocabas e Gatlin III (1999) e Peng e Gatlin (2009).

Figura 8- Concentração de vitamina E determinada no fígado dos dourados alimentados com dietas com níveis de vitamina E (± EP)

4.2 Sistema imunológico

4.2.1 Lisozima sérica

Não foi detectado efeito dos níveis crescentes de vitamina E para a atividade da lisozima sérica do dourado e também não foi possível mensurar a atividade da enzima nos animais após a infecção bacteriana, pois não havia material biológico suficiente (Tabela 9). Níveis crescentes de vitamina E na dieta também não afetaram a atividade da lisozima para o salmão do Atlântico, truta arco-íris e “hybrid striped bass” (HARDIE; FLETCHER; SECOMBES, 1990; CLERTON et al., 2001; SEALEY; GATLIN; 2002a; KIRON et al., 2004; PUANGKAEW et al., 2004). Entretanto, foi identificada atividade crescente da enzima para as doses crescentes de vitamina E para dois níveis de lipídio na dieta da garoupa e tilápia do Nilo (LIN; SHIAU, 2005; LIM et al., 2009). Diversos fatores podem ter influência nas respostas imunológicas e a atividade da lisozima também pode apresentar redução e variação devido a mudanças ambientais (salinidade, pH, temperatura da água), utilização de anestésicos, estresse, infecções, maturidade sexual, ou até mesmo gênero do animal (FLETCHER; WHITE; BALDO, 1977; SAURABH; SAHOO, 2008). Então, possível explicação para alta variação da atividade da lisozima registrada no presente estudo pode ser a diferença no metabolismo dos dourados fêmeas e machos, e seu dimorfismo.

Tabela 9 - Efeito da vitamina E nos parâmetros imunológicos e retenção do nutriente no fígado e músculo (média ± erro padrão)

Tratamentos (mg kg ⁻¹ de vitamina E)	Burst oxidativo (Abs. 540 nm)	Proteína sérica (mg dL ⁻¹)	Albumina Sérica (mg dL ⁻¹)	Globulinas totais (mg dL ⁻¹)	Atividade lisozima (U mL ⁻¹)	Fígado (µg de tocoferol g de tecido ⁻¹)	Músculo
0 (7,43)	0,491 ± 0,06	3,31 ± 0,17	1,23 ± 0,03	2,08 ± 0,16	214 ± 21	33,35 ± 4,72	18,57 ± 12,27
50 (54,68)	0,439 ± 0,02	3,27 ± 0,09	1,14 ± 0,05	2,13 ± 0,12	179 ± 62	60,22 ± 12,33	25,15 ± 15,90
100 (95,74)	0,456 ± 0,03	3,39 ± 0,23	1,24 ± 0,06	2,15 ± 0,19	262 ± 33	68,73 ± 11,24	19,79 ± 8,88
150 (162,62)	0,431 ± 0,02	3,58 ± 0,03	1,27 ± 0,03	2,31 ± 0,03	316 ± 114	123,67 ± 15,46	14,54 ± 2,39
200 (197,78)	0,395 ± 0,01	3,35 ± 0,12	1,25 ± 0,04	2,10 ± 0,10	208 ± 76	185,03 ± 79,85	14,78 ± 0,66
250 (247,29)	0,428 ± 0,01	3,43 ± 0,07	1,27 ± 0,04	2,16 ± 0,09	160 ± 26	163,75 ± 52,57	27,98 ± 14,62
3500 (3731,44)	0,414 ± 0,02	3,33 ± 0,11	1,25 ± 0,07	2,07 ± 0,11	425 ± 109	946,13 ± 222,88	37,63 ± 1,76
ANOVA							
Valor de F	1,03	0,59	0,84	0,4	1,6	2,89	0,68
Valor de P	0,43	0,73	0,55	0,87	0,19	0,047	0,66

Tabela 10 - Efeito da vitamina E na sobrevivência e parâmetros imunológicos após infecção com *Aeromonas hydrophila* (média ± erro padrão)

Tratamentos (mg kg ⁻¹ de vitamina E)	Burst oxidativo (Abs. 540 nm)	Proteína sérica (mg dL ⁻¹)	Albumina Sérica (mg dL ⁻¹)	Globulinas totais (mg dL ⁻¹)	Sobrevivência após infecção (%)
0 (7,43)	0,439 ± 0,066	2,96 ± 0,08	1,14 ± 0,03	1,81 ± 0,05 ^C	57,14
50 (54,68)	0,420 ± 0,045	3,23 ± 0,09	1,17 ± 0,09	2,05 ± 0,01 ^{BC}	46,43
100 (95,74)	0,582 ± 0,078	3,04 ± 0,16	0,92 ± 0,15	2,11 ± 0,03 ^{ABC}	64,29
150 (162,62)	0,580 ± 0,110	3,41 ± 0,28	1,15 ± 0,10	2,28 ± 0,15 ^{AB}	32,14
200 (197,78)	0,649 ± 0,124	3,63 ± 0,05	1,17 ± 0,09	2,45 ± 0,05 ^A	42,86
250 (247,29)	0,496 ± 0,052	3,63 ± 0,19	1,28 ± 0,08	2,34 ± 0,10 ^{AB}	50
3500 (3731,44)	0,495 ± 0,080	3,03 ± 0,06	1,15 ± 0,04	1,87 ± 0,02 ^C	71,43
ANOVA					
Valor de F	1,01	1,85	1,24	10,6	1,12
Valor de P	0,45	0,21	0,34	0,002	0,39

4.2.2 Atividade respiratória dos leucócitos

Não foram detectadas diferenças para os diferentes níveis de vitamina E dietética na atividade respiratória dos leucócitos antes e depois da infecção bacteriana (Tabela 9 e 10). Diferentemente dos resultados registrados, o “parrot fish” apresentou maior produção de espécies reativas de oxigênio quando alimentado com dietas contendo 500 mg kg^{-1} de vitamina E (GALAZ; KIM; LEE, 2010). Também foram relatadas respostas significativas na produção de ânions superóxidos pelos macrófagos isolados do sangue ou rim cefálico da garoupa, truta arco-íris e “red drum” alimentados com doses suplementares de vitamina E (PUANGKAEW et al., 2004; LIN; SHIAU, 2005; PENG; GATLIN 2009). Leucócitos isolados do rim cefálico do “hybrid striped bass” mantidos em meios de cultura celular com dois níveis de vitamina E apresentaram maior produção intracelular de ânions superóxidos quando comparados ao tratamento controle (SEALEY; GATLIN, 2002b). Em contrapartida, os macrófagos do salmão do Atlântico, truta arco-íris e dourada alimentados com níveis dietéticos de vitamina E elevados não apresentaram melhora na sua atividade respiratória (HARDIE; FLETCHER; SECOMBES, 1990; ORTUNO; ESTEBAN; MESEGUER; 2000; KIRON et al., 2004), porém quando a dieta também foi suplementada com a vitamina C, a dourada apresentou melhora neste parâmetro (ORTUNO et al., 2001). Com exceção do primeiro estudo mencionado, que utilizou o mesmo protocolo do presente trabalho, as metodologias utilizadas para avaliar a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio das células foram de macrófagos isolados dos tecidos, onde normalmente se homogeneiza os tecidos dos animais utilizados de cada unidade experimental (SECOMBES, 1990) e normaliza a contagem do número de células por microscópio e diluição, havendo dessa maneira uma maior padronização do ensaio, o que pode não ocorrer com a incubação direta do NBT no sangue heparinizado amostrado de cada animal.

4.2.3 Atividade hemolítica do sistema complemento via alternativa

Não foi detectada atividade hemolítica quando a suspensão de eritrócitos de coelho foi exposta ao “pool” de soro dos dourados. O sistema complemento é sensível ao tratamento térmico (SECOMBES, 1996) e para a obtenção do soro, as amostras permaneceram expostas por mais de uma hora em temperatura ambiente em microtubos fechados. E mesmo não sendo uma temperatura elevada, a coleta foi realizada durante o verão e pressupõe-se que nestas condições tenha ocorrido inativação das proteínas do sistema complemento.

4.2.4 Imunoglobulinas totais

Não houve efeito dos níveis crescentes de vitamina E na dieta para os parâmetros de proteína total e albumina sérica antes e pós-infecção bacteriana, e para globulinas totais antes da infecção (Tabela 9 e 10). No entanto foi registrada diferença ($P < 0,05$) para globulinas totais após infecção (Tabela 10), e os dados foram submetidos à análise de regressão segmentada (Figura 4) (PORTZ; DIAS; CYRINO, 2000), resultando no ponto de quebra com melhor concentração de globulinas no soro quando os peixes foram alimentados com dietas contendo $157,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de tocoferol. Para a truta arco-íris também foram registrados resultados semelhantes, não sendo detectada diferença para a quantidade de proteínas totais, mas havendo diferença na quantidade de globulinas séricas para os animais alimentados com dietas suplementadas com vitamina E (400 mg kg^{-1}) após a inoculação intraperitoneal com bactérias inativadas *Yersinia ruckeri*, quando comparadas ao tratamento controle (BLAZER; WOLKE, 1984). Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a desafios de estresse tiveram um melhor recrutamento de macrófagos quando alimentados com doses de 450 mg kg^{-1} de vitamina E (BELO et al., 2005). O tratamento com uma superdose de vitamina E não diferiu estatisticamente do tratamento controle. Talvez a fortificação com nível elevado possa ter apresentado resposta pró-oxidante, prejudicando a resposta deste parâmetro.

Poucos estudos avaliaram como as respostas do sistema imunológico de peixes alimentados com dietas contendo níveis crescentes de vitamina E se comporta após o desafio bacteriano. Talvez a não detecção de respostas significativas neste ensaio antes do desafio bacteriano relacione-se ao fato de os animais estarem em homeostase e faltar-lhes um estímulo infeccioso, semelhante ao que foi relatado para truta arco-íris (BLAZER; WOLKE, 1984) e também como foi registrado para os parâmetros imunológicos e hematológicos do surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*) que ao ser desafiado com concentrações crescentes de unidades formadoras de colônia da bactéria *Aeromonas hydrophila*, apresentaram resposta imunológica mais acentuada com maior contagem de monócitos e neutrófilos sanguíneo circulantes de maneira dose-dependente (DA SILVA et al., 2012).

Figura 9- Concentração de globulinas totais no soro de dourados após a infecção bacteriana por *Aeromonas hydrophila* ($\pm$ EP)

4.2.5 Infecção bacteriana

Após a infecção os peixes apresentaram sinais clínicos típicos da doença como erosão e hemorragia das nadadeiras e úlceras na região abdominal (MORAES; MARTINS, 2004) (Figura 5). O salmão Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) e o salmão do Atlântico apresentaram melhor sobrevivência após desafio bacteriano (*Renibacterium salmoninarum* e *Aeromonas salmonicida*, respectivamente) quando alimentados com rações suplementadas com 300 mg kg⁻¹ de tocoferol (HARDIE; FLETCHER; SECOMBES, 1990; THRARINSSON et al., 1994) constatação também registrada para o linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*) alimentado com 200 mg kg⁻¹ de vitamina E (WANG et al., 2006). A sobrevivência dos animais no presente estudo foi maior para a “superdose” de 3.500 mg kg⁻¹ (3.731 mg kg⁻¹), porém os resultados deste parâmetro também não foram correlacionados com as doses dos tratamentos.

Figura 10 - Dourado com ulcerações na região abdominal, e nadadeiras hemorrágicas. Sinais clínicos de septicemia hemorrágica

5 CONCLUSÃO

A vitamina E é um nutriente essencial para peixes, porém sua interação com outros nutrientes, principalmente com o ácido ascórbico e o selênio, pode dificultar a determinação da exigência por parâmetros zootécnicos ou presenciar sinais de deficiência. Neste estudo os parâmetros de desempenho foram afetados pelos tratamentos, porém não de maneira dose-dependente, impedindo o estabelecimento de uma dose-resposta ótima para a espécie. A exigência de vitamina E para o dourado foi determinada em $58,90 \text{ mg kg}^{-1}$ pela peroxidação induzida *in vitro* da fração mitocondrial hepática. O sistema imunológico do dourado também não foi alterado pelos tratamentos, porém foi possível identificar melhora na concentração de globulinas séricas após a infecção bacteriana, sendo a melhor resposta obtida com o nível de $153,7 \text{ mg kg}^{-1}$ de tocoferol na dieta, comprovando a eficácia da vitamina E como um imunonutriente. Existe uma quantidade limitada de trabalhos de exigência e suplementação vitamínica para Characiformes neotropicais, o que torna necessário um melhor entendimento do papel do tocoferol na dieta de peixes antes que se possa aquilatar a sua contribuição efetiva na cadeia produtiva da piscicultura.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMEID, N.A.H.; ABIDI, S.F.; KHAN, M.A. Dietary vitamin E requirement for maximizing the growth, conversion efficiency, biochemical composition and haematological status of fingerling *Channa punctatus*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 43, n. 2, p. 226-238, 2012.

ABREU, J.S.; MARZOCHI-MACHADO, C.M.; URBACZEK, A.C.; FONSECA, L.M.; URBINATI, E.C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n. 4, p. 1133-1139, 2009.

AI, Q.H.; MAI, K.; TAN, B.; XU, W.; ZHANG, W.; MA, H.; LIUFU, Z. Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 261, n. 1, p. 327-336, 2006.

ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, Exeter, v. 2, p. 281-307, 1992.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, W. Horwitz, (Ed) 17th ed. Gaithersburg, MD, USA, 2000. 1141p.

BAE, J.Y.; PARK, G.H.; YOO, K.-Y.; LEE, J.-Y.; KIM, D.J.; BAI, S.C. Evaluation of optimum dietary vitamin E requirements using DL-alpha-tocopheryl acetate in the juvenile eel, *Anguilla japonica*. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 29, n. 1, p. 213-217, 2013.

BAI, S.C.; LEE, K.J. Different levels of dietary DL-alpha-tocopheryl acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 161, n. 1/4, p. 405-414, 1998.

BELO, M.A.A.; SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R.; SOARES, V.E.; OTOBONI, A.M.M.B.; MORAES, J.E.R. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 133, n. 2/3, p. 146-154, 2005.

BELOSEVIC, M.; HADDAD, G.; WALSH, J.G.; GRAYFER, L.; JATZENBACK, B.A.; HANINGTON, P.C.; NEUMANN, N.F.; STAFFORD, J.L. Innate immunity of fish: antimicrobial responses of fish macrophage. In: ZACCONE, G.; MESEGUER, J.; GARCÍA-AYALA, A.; KAPOOR, B.G. (Ed.). **Fish defenses**. Enfield, N.H.: Science Publishers, v.1, 2009. p.145-184.

BIERI, J.G.; ANDERSON, A.A. Peroxidation of lipids in tissue homogenates as related to vitamin E. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v. 90, p. 105-110, 1960.

BLAZER, V.S. Nutrition and disease resistance in fish. **Annual Review of Fish Diseases**, Exeter, p. 309-323, 1992.

- BLAZER, V.S.; WOLKE, R.E. The effects of alpha-tocopherol on the immune-response and non-specific resistance factors of rainbow-trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 37, n. 1, p. 1-9, 1984.
- BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K.; CYRINO, J.E.P. Apparent digestibility coefficients of selected feed ingredients for dourado *Salminus brasiliensis*. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 453-458, 2009.
- BORGHETI, J.R.; CANZI, C.; FERNANDEZ, D.R. Influência de diferentes níveis de proteína no crescimento do dourado *Salminus maxillosus*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 3, n. 33, p. 683-689, 1990.
- BOSHRA, H.; LI, J.; SUNYER, J.O. Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 20, n. 2, p. 239-262, 2006.
- BRAGA, L.G.T.; BORGHESI, R.; CYRINO, J.E.P. Apparent digestibility of ingredients in diets for *Salminus brasiliensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 2, p. 271-274, 2008.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Waltham, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRICKNELL, I.; DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 19, n. 5, p. 457-472, 2005.
- CALDER, P.C.; YAQOOB, P. Glutamine and the immune system. **Amino Acids**, New York, v. 17, n. 3, p. 227-241, 1999.
- CHEN, R. G; LOCHMAN, R.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DABROWSKI, K.; LEE, K. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 242, n. 1/4, p. 553-569, 2004.
- CHENG, Z.Y.; BUENTELLO, A.; GATLIN, D. M. Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, immune responses and intestinal structure of red drum, *Sciaenops ocellatus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 319, n. 1/2, p. 247-252, 2011.
- CHENG, Z.Y.; GATLIN, D. M.; BUENTELLO, A. Dietary supplementation of arginine and/or glutamine influences growth performance, immune responses and intestinal morphology of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 362, p. 39-43, 2012.
- CLERTON, P.; TROUTAUD, D.; VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; DESCHAUX, P. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2001.

COWEY, C.B.; ANDRON, J.W.; WALTON, M.J.; MURRAY, J.; YOUNGSON, A.; KNOX, D. Tissue distribution, uptake, and requirements for alpha-tocopherol of rainbow-trout (*Salmo gairdneri*) fed diets with minimal content of unsaturated fatty-acids. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 111, n. 9, p. 1556-1567, 1981.

COWEY, C.B.; ANDRON, J.W.; YOUNGSON, A. The vitamin-E requirement of rainbow-trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing poly-unsaturated fatty-acids derived from fish oil. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 30, n. 1/4, p. 85-93, 1983.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; ORTUÑO, J.; MESEGUER, J. Vitamin E increases natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 11, n. 4, p. 293-302, 2001.

CYRINO, J.E.P.; FRACALOSSO, D.M.; ROUBACH, R. Avanços na alimentação e nutrição de peixes carnívoros de água doce. In: FRACALOSSO, D.M.; CYRINO, J.E.P. (Ed.). **Nutriaqua Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis, SC: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2012. cap. 15, p.283 - 294.

DA SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; VIEIRA, F.N.; JATOBÁ, A.; SEIFFERT, W.Q.; MARTINS, M.L. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 908-916, 2012.

DAIRIKI, J.K.; BORGHESI, R.; DIAS, C.T.S.; CYRINO, J.E.P. Lysine and arginine requirements of *Salminus brasiliensis*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 8, p. 1012-1020, Aug 2013.

DE SILVA, S.S. Aquaculture: a newly emergent food production sector-and perspectives of its impacts on biodiversity and conservation. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 21, n. 12, p. 3187-3220, 2012.

DRAPER, H.H.; SQUIRES, E.J.; MAHMOODI, H.; WU, J.; AGARWAL, S.; HADLEY, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology & Medicine**, Oxford, v. 15, p. 353-363, 1993.

ELLIS, A.E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J.S.; FLETCHER, T.C., ANDERSON, D.P.; ROBERTSON, B.S.; MUISWINKEL, W.B. (Ed.). **Techniques in fish immunology**. Fair Haven, NJ, USA: SOS Publications, 1990. p.101-104.

ESTEVEZ, K.E.; PINTO LÔBO, A.V. Feeding pattern of *Salminus maxillosus* (PISCES, Characidae) at Cachoeira das Emas, Mogi-Guaçu River (São Paulo State, Southeast Brazil). **Revista Brasileira Biologia**, São Carlos, v. 61, n. 2, p. 267-276, 2001.

FAO – Food and Agriculture Organization. **The state of world fisheries and aquaculture**. Opportunities and challenges. Fisheries Department, Rome, Italy: 2014. 243p.

FLETCHER, T.C. Modulation of nonspecific host defenses in fish. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 12, n. 1/4, p. 59-67, 1986.

- FLETCHER, T.C.; WHITE, A.; BALDO, B.A. C-reactive protein-like precipitin and lysozyme in Lump sucker *Cyclopterus lumpus* L during breeding season. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 353-357, 1977.
- FLORA, M.A.D.; MASCHKE, F.; FERREIRA, C.C.; PEDRON, F.D. Biologia e cultivo do dourado (*Salminus brasiliensis*). **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 4, n. 1, p. 7-14, 2010.
- GALAZ, G.B.; KIM, S.S.; LEE, K.J. Effects of Different Dietary Vitamin E Levels on Growth Performance, Non-specific Immune Responses, and Disease Resistance against *Vibrio anguillarum* in Parrot Fish (*Oplegnathus fasciatus*). **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 23, n. 7, p. 916-923, 2010.
- GANNAN, A.L.; SCHROCK, R.M. Immunostimulants in fish diets. In: LIM, C.; WEBSTER, C.D. (Ed.). **Nutrition fish health**. New York: The Haworth Press, 2001. p.235-266.
- GATLIN, D.M.; BAI, S.C.; ERICKSON, M.C. Effects of dietary vitamin-E and synthetic antioxidant on composition and storage quality on Channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 106, n. 3/4, p. 323-332, 1992.
- GATLIN III, D.M. Nutrition and fish health. In: HALVER, J.E.; HARDY, W.H. (Ed.). **Fish nutrition**. San Diego, California, USA: Academic Press, v.2, 2002. p.672-703.
- _____. Red Drum, *Sciaenops ocellatus*. In: WEBSTER, C.D.; LIM, C. (Ed.). **Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture**. New York, New York, USA: CABI Publishing, 2002. p.147-158.
- HALVER, J.E. The Vitamins. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Ed.). **Fish Nutrition**. Third Edition. San Diego, California, USA: Academic Press, v.2, 2002. p. 61-81.
- HAMRE, K. Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 98-115, 2011.
- HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R.K.; LIE, O. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L). **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 22, n. 1-2, p. 137-149, 1997.
- HARDIE, L.J.; FLETCHER, T.C.; SECOMBES, C.J. The effect of vitamin E on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L). **Aquaculture**, Amsterdam v. 87, n. 1, p. 1-13, 1990.
- HILTON, J.W. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 79, n. 1/4, p. 223-244, 1989.
- HOLLAND, M.C.H.; LAMBRIS, J.D. The complement system in teleosts. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 399-420, 2002.
- HUANG, C. H.; HIGGS, D.A.; BALFRY, S.K.; DEVLIN, R.H. Effect of dietary vitamin E level on growth, tissue lipid peroxidation, and erythrocyte fragility of transgenic coho salmon,

Oncorhynchus kisutch. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 139, n. 2, p. 199-204, 2004.

JIMENEZ, M.C.H.; JIMENEZ, A.E.M.H. Vitaminas y minerales. In: SANS, F. (Ed.). **La nutrición y alimentación en piscicultura**. Madrid, Spain: Fundación Observatorio Español de Acuicultura, 2009. p.332-378.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 173, n. 1/2, p. 111-133, 2012.

KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; ISHIZAKA, K.; SATOH, S.; WATANABE, T. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, n. 1/4, p. 361-379, 2004.

KOCABAS, A.M.; GATLIN, D.M. Dietary vitamin E requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops* female x *M. saxatilis* male). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 3-7, 1999.

KOSHIO, S. Vitamins. In: NAKAGAWA R.; SATO, .M.; GATLIN III D.M. (Ed.). **Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish**. Trowbridge, United Kingdom: Cromwell Press, 2007. p. 35-46.

LANDOLT, M.L. The relationship between diet and the immune response of fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 79, n. 1/4, p. 193-206, 1989.

LE, K.T.; FOTEDAR, R.; PARTRIDGE, G. Selenium and vitamin E interaction in the nutrition of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*): physiological and immune responses. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 303-313, 2014.

LEE, K.J.; DABROWSKI, K. Interaction between vitamins C and E affects their tissue concentrations, growth, lipid oxidation, and deficiency symptoms in yellow perch (*Perca flavescens*). **British Journal of Nutrition**, New York, v. 89, n. 5, p. 589-596, 2003.

LEWIS-MCCREA, L.M.; LALL, S.P. Effects of moderately oxidized dietary lipid and the role of vitamin E on the development of skeletal abnormalities in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 262, n. 1, p. 142-155, 2007.

LI, J.; LIANG, X.; TAN, Q.; YUAN, X.; LIU, L.; ZHOU, Y.; LI, B. Effects of vitamin E on growth performance and antioxidant status in juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 430, p. 21-27, 2014.

LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; LI, M.H.; WELKER, T.L.; KLESIUS, P.H. Influence of dietary levels of lipid and vitamin E on growth and resistance of Nile tilapia to *Streptococcus iniae* challenge. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 298, n. 1/2, p. 76-82, 2009.

LIMA, F.C.T.; BRITSKI, H.A. *Salminus franciscanus*, a new species from the rio Sao Francisco basin, Brazil (Ostariophysi : Characiformes : Characidae). **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 5, n. 3, p. 237-244, 2007.

- LIN, Y.H.; SHIAU, S.Y. Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, at two lipid levels, and their effects on immune responses. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 248, n. 1/4, p. 235-244, 2005.
- _____. Effects of dietary blend of fish oil with corn oil on growth and non-specific immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 137-144, 2007.
- _____. Mutual sparing of dietary requirements for alpha-tocopherol and selenium in grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 294, n. 3/4, p. 242-245, 2009.
- LOPES, C.M. et al. Fish passage ladders from Canoa Complex - Paranapanema River: evaluation of genetics structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 5, p. 131-138, 2007.
- MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 20, n. 2, p. 137-151, 2006.
- MONTERO, D.; GRASSO, V.; IZQUIERDO, M.S.; GANGA, R.; REAL, F.; TORT, L.; CABALLERO, M.J.; ACOSTA, F. Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Effects on hepatic Mx expression and some immune parameters. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 24, n. 2, p. 147-155, 2008.
- MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRALOSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p.342-386.
- MORO, G.V.; REZENDE, F.P.; ALVES, A.L.; HASHIMOTO, D.T.; VARELA, E.S.; TORATI, L.S. Espécies de peixe para piscicultura. In: RODRIGUES, A.P.O.; LIMA, A.F.; ALVES, A.F.; ROSA, D.K.; TORATI, L.S.; SANTOS, V.R.V. (Ed.). **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos**. Brasília, DF: Embrapa Pesca e Aquicultura, v.1, 2013. p.29-70.
- NAKAO, M.; TSUJIKURA, M.; ICHIKI, S.; VO, T.K.; SOMAMOTO, T. The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 35, n. 12, p. 1296-1308, 2011.
- NG, W.K.; WANG, Y.; KETCHIMENIN, P.; YUEN, K.-H. Replacement of dietary fish oil with palm fatty acid distillate elevates tocopherol and tocotrienol concentrations and increases oxidative stability in the muscle of African catfish, *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 233, n. 1/4, p. 423-437, 2004.
- NOGUCHI, T.; CANTOR, A.H.; SCOTT, M.L. Mode of action of selenium and vitamin E in prevention of exudative diathesis in chicks. *The Journal of Nutrition*, Rockville Pike, v. 103, n. 10, p. 1502-1511, 1973.
- NRC. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011. 376p.

OKAMURA, D. ARAÚJO, F.G.; LOGATO, P.V.R.; SILVEIRA, U.S.; MURGAS, L.D.S.; FREITAS, R.T.F. Palmitato de ascorbil e acetato de tocoferol como antioxidantes metabólicos em larvas de dourado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 8, p. 1061-1068, 2008.

OLESEN, I.; MYHR, A.I.; ROSENDAL, G.K. Sustainable Aquaculture: Are We Getting There? Ethical Perspectives on Salmon Farming. **Journal of Agricultural & Environmental Ethics**, Guelph, v. 24, n. 4, p. 381-408, 2011.

OLIVA-TELES, A. Nutrition and health of aquaculture fish. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 83-108, 2012.

ORTUNO, J. CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 79, n. 3/4, p. 167-180, 2001.

ORTUNO, J.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. High dietary intake of alpha-tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 10, n. 4, p. 293-307, 2000.

PAUL, B.N.; SARKAR, S.; MOHANTY, S.N. Dietary vitamin E requirement of mrigal, *Cirrhinus mrigala* fry. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 242, n. 1/4, p. 529-536, 2004.

PENG, L.I.; GATLIN, D.M. Dietary vitamin E requirement of the red drum *Sciaenops ocellatus*. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 313-319, 2009.

PEZZATO, L.E. BARROS, M.M.; FRACALOSS, D.M.; CYRINO, J.E.P. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. FRACALOSS, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p.75-169.

POHLENZ, C. BUENTELLO, A.; CRISCITIELLO, M.F.; MWANGI, W.; SMITH, R.; GATLIN, D.M. Synergies between vaccination and dietary arginine and glutamine supplementation improve the immune response of channel catfish against *Edwardsiella ictaluri*. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 33, n. 3, p. 543-551, 2012.

_____. Arginine and glutamine supplementation to culture media improves the performance of various channel catfish immune cells. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 32, n. 5, p. 762-768, 2012.

POHLENZ, C.; GATLIN III, D.M. Interrelationships between fish nutrition and health. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 431, n. 15, p. 111-117, 2014.

POLHILL, R.B.; PRUITT, K.M.; JOHNSTON, R.B. Kinetic assessment of alternative complement pathway activity in a hemolytic system. 1. Experimental and mathematical analyses. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 121, n. 1, p. 363-370, 1978.

PORTZ, L.; DIAS, C.T.S.; CYRINO, J.E.P. Regressão segmentada como modelo na determinação de exigências nutricionais de peixes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 4, p. 601-607, 2000.

PUANGKAEW, J.; KIRON, V.; SOMAMOTO, T.; OKAMOTO, N.; SATOH, S.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 16, n. 1, p. 25-39, 2004.

PULSFORD, A.L.; CRAMPE, M.; LANGSTON, A.; GLYNN, P.J. Modulatory effect of disease, stress, copper, TBT and vitamin E on the immune system of flatfish. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 5, n. 8, p. 631-643, 1995.

RICO, A.; SATAPORNVANIT, K.; HAQUE, M.M.; MIN, J.; NGUYEN, P.T.; TELFER, T.C.; BRINK, P.J.V. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review. **Reviews in Aquaculture**, Richmond, v. 4, n. 2, p. 75-93, 2012.

RIGOTTI, A. Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 28, n. 5/6, p. 423-436, 2007.

RINGO, E.; OLSEN, R.E.; VECINO, J.L.G.; WADSWORTH, S.; SONG, S.K. Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. **Journal Marine Science Research Development**, Los Angeles, v. 2, n. 1, p. 1-22, 2012.

RODRIGUES, S.S.; MENIN, E. Anatomia da cavidade bucofaringeana de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Biotemas**, Florianópolis, v. 1, n. 19, p. 41-50, 2006.

_____. Anatomia do tubo digestivo do *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Biotemas**, Florianópolis, v. 2, n. 21, p. 65-75, 2008.

ROEM, A.J.; KOHLER, C.C.; STICKNEY, R.R. Vitamin E requirement of the blue tilapia, *Oreochromis aureus* (Steidachner), in relation to dietary lipid level. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 155-164, 1990.

RUFF, N.; FITZGERALD, R.D.; CROSS, F.T.; HAMRE, K.; KERRY, J.P. The effect of dietary vitamin E and C level on market-size turbot (*Scophthalmus maximus*) fillet quality. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 91-103, 2003.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 172, n. 1/2, p. 63-92, 1999.

SAU, S. K.; PAUL, B.N.; MOHANTA, K.N.; MOHANTY, S.N. Dietary vitamin E requirement, fish performance and carcass composition of rohu (*Labeo rohita*) fry. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 240, n. 1/4, p. 359-368, 2004.

SAURABH, S.; SAHOO, P.K. Lysozyme: an important defense molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.

SCHUTZ, J.H.; NUÑER, A.P.O. Growth and survival of dorado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) post-larvae cultivated with different types of food and photoperiods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.50, p.435-444, 2007.

SEALEY, W.M.; GATLIN, D.M. Dietary vitamin C and vitamin E interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* female x *M. saxatilis* male) but have limited effects on immune responses. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 132, n. 4, p. 748-755, 2002a.

_____. In vitro manipulations of vitamin C and vitamin E concentrations alter intracellular O-2(-) production of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) head-kidney cells. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 12, n. 2, p. 131-140, 2002b.

SEALEY, W.M.; GATLIN III, D.M. Overview of nutritional strategies affecting health of marine fish. **Journal of Applied Aquaculture**, London, v. 9, n. 2, p. 11-26, 1999.

SECOMBES, C.J. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: STOLEN, J. S.; FLETCHER, T. C., ANDERSON, D.P., ROBERTSON, B.S.; MUISWINKEL, W.B. (Ed.). **Techniques in Fish Immunology**. Fair Haven, NJ, USA: SOS Publications, 1990. p.137-154.

_____. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system**. London: Academic Press, 1996. p.95-103.

SHIAU, S.Y.; SHIAU, L.F. Re-evaluation of the vitamin E requirements of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* X *O. aureus*). **Animal Science**, Penicuik, v. 72, p. 529-534, 2001.

SIWICKI, A.; STUDNICKA, M. The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, London, v. 31, p. 57-60, 1987.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; RUMSEY, G.L. Dietary intake of immunostimulants affects nonspecific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 41, n. 1/2, p. 125-139, 1994.

SIWICKI, A.K.; MORAND, M.; KLEIN, P.; STUDNICKA, M.; TERECH-MAJEWSKA, E. Modulation of nonspecific defence mechanisms and protection against diseases in fish. **Acta Veterinaria Brno**, Brno, v. 67, n. 4, p. 323-328, 1998.

TAPPEL, A.L.; ZALKIN, H. Inhibition of lipide peroxidation in mitochondria by vitamin E. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, v. 80, p. 333-336, 1959.

TEIXEIRA, B.; MACHADO, C.C.; FRACALOSSO, D.M. Exigência proteica em dietas para alevinos do dourado (*Salminus brasiliensis*). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 33-38, 2010.

THORARINSSON, R.; LANDOLT, M.L.; ELLIOT, D.G.; PASCHO, R.J.; HARDY, R.W. Effect of dietary vitamin E and selenium on growth, survival, and the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* infection in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 121, n. 4, p. 343-358, 1994.

TOKUDA, M.; YAMAGUICHI, T.; WAKUI, K.; SATO, T.; ITO, M.; TAKEUCHI, M. Tocopherol affinity for serum lipoproteins of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* during the reproduction period. **Fisheries Science**, Tokyo, v. 66, n. 4, p. 619-624, 2000.

TRICHET, V.V. Nutrition and immunity: an update. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 356-372, 2010.

URBINATI, E.C.; ZANUZZO, F.S.; BILLER-TAKAHASHI, J.D. Estresse e Sistema Imune em Peixes. In: BALDISSEROTTO, B.; CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C. (Ed.). **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicals de Água Doce**. Jaboticabal, SP: FUNEP, 2014. p.87-106.

VEECK, A.P.L.; GARCIA, L.O.; BALDISSEROTTO, B.; ZANIBONI FILHO, E.; EMANUELLI, T. Proximate composition and lipid stability of dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier, 1817) fillets exposed to different levels of ammonia and oxygen in vivo. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 93, n. 10, p. 2590-2595, 2013.

VEGA-ORELLANA, O.M.; FRACALLOSSI, D.M.; SUGAI, J.K. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 252, n. 2/4, p. 484-493, 2006.

WAAGBO, R.; HAMRE, K.; MAAGE, A. The impact of micronutrients on the requirement of ascorbic acid in crustaceans and fish. In: DABROWSKI, K. (Ed.). **Ascorbic acid in aquatic organisms**. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, v.1, 2001. p.105-132.

WANG, Z.L.; MAI, K.; LIUFU, Z.; MA, H.; XU, W.; AI, Q.; ZHANG, W.; TAN, B.; WANG, X. Effect of high dietary intakes of vitamin E and n-3 HUFA on immune responses and resistance to *Edwardsiella tarda* challenge in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck and Schlegel). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 37, n. 7, p. 681-692, 2006.

WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 151, n. 1/4, p. 185-207, 1997.

WEBSTER, C.D.; LIM, C. **Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture**. New York, USA: CABI Pub., 2002a. 418p.

WEINGARTNER, M.; ZANIBONI FILHO, E. Biologia e cultivo do dourado. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria, RS: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, v.2, 2010. cap. 9, p.245 - 282.

WHYTE, S.K. The innate immune response of finfish - A review of current knowledge. **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 23, n. 6, p. 1127-1151, 2007.

WILBUR, K.M.; BERNHEIM, F.; SHAPIRO, O.W. The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. **Archives of Biochemistry**, Amsterdam, v. 24, p. 305-313, 1949.

WILLS, D. Lipid peroxidation formation microsomes. **Journal of Biochemistry**, Oxford, v.113, p. 315-324, 1969.

WILSON, R.P.; BOWSER, P.R.; POE, W.E. Dietary vitamin E requirement of fingerling channel catfish. **Journal of Nutrition**, Springfield, v. 114, n. 11, p. 2053-2058, 1984.

WISE, D.J.; TOMASSO, J.R.; SCHWEDLER, T.E.; BLAZER, V.S.; GATLIN III, D.M. Effect of vitamin E on the immune responses of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of Aquatic Animal Health**, London, n. 5, p. 183-188, 1993.

YANO, T. The nonspecific fish immune system: humoral defense. In: IWAMA, G.K.; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system: organism, pathogen, and environment**. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1996. p.105-157.

ZANON, R.B.; CEROZI, B.S.; SILVA, T.B.A.; MORO, G.V.; PENA, S.V.; BALDESSIN, I.J.; CYRINO, J.E.P. In: WORLD AQUACULTURE SOCIETY, 2011, Natal, RN. **Meeting Abstract...** Natal, 2011.p 135.

ZINGG, J.M. Vitamin E: An overview of major research directions. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 28, n. 5/6, p. 400-422, 2007.

ZUO, R.T.; AI, Q.; MAI, K.; XU, W.; WANG, J.; XU, H.; LIUFU, Z.; ZHANG, Y. Effects of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) following natural infestation of parasites (*Cryptocaryon irritans*). **Fish & Shellfish Immunology**, London, v. 32, n. 2, p. 249-258, 2012.