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

**Fontes de lipídios dietéticos e desempenho imunológico do pacu
*Piaractus mesopotamicus***

Thyssia Bomfim Araújo da Silva

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

**Piracicaba
2011**

Thyssia Bomfim Araújo da Silva
Engenheiro de Pesca

Fontes de lipídios dietéticos e desempenho imunológico do pacu
Piaractus mesopotamicus

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

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
2011

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

Silva, Thyssia Bomfim Araújo da
Fontes de lipídios dietéticos e desempenho imunológico do pacu *Piaractus mesopotamicus* / Thyssia Bomfim Araújo da Silva. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010. - - Piracicaba, 2011.
83 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Ácidos graxos 2. Bacterioses em animais 3. Imunologia veterinária 4. Pacu I. Título

CDD 639.375
S586f

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Oswaldo Jr. e Auxiliadora, que são exemplo de dedicação, amor e educação.

Aos meus irmãos, Dannel e Thayná, que são parte de mim e estão presentes em todos os momentos.

NPEDV, OPT!!! TAPS

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ter sucesso no que se faz, alcançar os objetivos dos trabalhos e ser reconhecido por isso é o maior sonho de quem busca a realização profissional. Muitos de nós quando entramos na pós-graduação lutamos por estes objetivos, mas não se constrói um nome da noite para o dia, para isso contamos com o apoio e a ajuda de muitas pessoas que nos motivam a perseverar e nunca desistir.

Por isso agradeço a Deus imensamente pela proteção e condução por bons caminhos.

Aos meus pais Oswaldo Jr. e Auxiliadora por serem meu porto seguro, me prestarem apoio incondicional e serem responsáveis por minha educação.

Às minhas avós Aparecida e Tarcila por seus exemplos de vida, amor e dedicação.

Aos meus queridos irmãos Dannel e Thayná por serem, além de irmãos, amigos e companheiros para uma vida toda, com os quais construí uma história de respeito e amor.

Ao Prof. José Eurico Possebon Cyrino pelas orientações, pelo incentivo e pela contribuição em meu progresso pessoal e profissional.

À amiga Profa. Andréa Belém Costa, eterna incentivadora, pelas palavras de apoio e estímulo constantes.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo.

Às amigas-irmãs, Amanda Fogaça, Camila Mandato, Daniella Freitas, Karinne Souza, Laiana Said, Priscilla Cristóvam e Rita Mariê, que deixei em Manaus e que foram essenciais para força e apoio em momentos difíceis.

A três amigos especiais, que foram exemplos de amizade, dedicação e companheirismo, doando horas de seus dias e contribuindo com exemplos de amor, verdade e fé: Jony “Kuest” Koji Dairiki, pela significativa contribuição na execução dos experimentos e na elaboração desta obra, pelo apoio desde sempre, pelas horas de conversa e pela presença constante durante a estada em Piracicaba; Ricardo “Tchê” Basso Zanon, pela amizade sempre prestativa, horas de risadas, apoio e companheirismo desde nossa chegada; e Tarcila “Narcisa” Souza de Castro Silva,

pelas 24h diárias convivas, que se tornaram fáceis pela grande pessoa que é, pela amizade, pelos conselhos e por toda contribuição pessoal e profissional durante estes anos.

Aos técnicos e aos colegas do laboratório Ismael Baldessin Júnior, Sérgio Vanderlei Pena, Bruno “K-rrero” da Silva Cerozzi e Giovani “Μαπ” Vitti Moro pelas ideias trocadas, pela viabilização dos trabalhos e pelo apoio sempre que solicitado.

À mais nova companheira de laboratório Ligia Uribe Gonçalves, que com carinho e amor pelo que faz, contribuiu com esta obra.

Às grandes amigas que farão parte de boas lembranças, de horas de conversa, de risadas e felicidade na vida Piracicabana “Jana” Rosolem, “Lice” Cassetari, “Wiola” Nordi e Anali Linhares.

Ao Dr. Ricardo Borghesi, pela ajuda na elaboração de material para os experimentos, troca de ideias e incentivo constantes.

Enfim, a todos que puderam contribuir de alguma forma com esta obra.

Muito Obrigada.

"É melhor arriscar coisas grandiosas,
mesmo expondo-se à derrota,
do que formar fila
com os pobres de espírito,
que vivem nesta penúria cinzenta,
que nem gozam muito
e nem sofrem muito,
porque não conhecem o que é vitória,
nem derrota".

Franklin Delano Roosevelt

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 A espécie.....	25
2.2 O sistema imunológico dos peixes	25
2.3 Nutrição, lipídios dietéticos e sanidade de peixes	28
Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs).....	33
Fontes dietéticas de ácidos graxos	35
Óleo de linhaça	36
Óleo de girassol	37
Sebo bovino	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Delineamento experimental	41
3.2 Elaboração das dietas	41
3.3 Avaliação do desempenho zootécnico	43
3.4 Análise hematológica	44
Contagem de eritrócitos	45
Contagem diferencial de leucócitos.....	45
Proteína total plasmática	45
3.5 Desafio bacteriano	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E INFERÊNCIAS	65
REFERÊNCIAS.....	67

RESUMO

Fontes de lipídios dietéticos e desempenho imunológico do pacu *Piaractus mesopotamicus*

A ingestão de lipídios e seus componentes, os ácidos graxos, são essenciais na manutenção do crescimento, na eficiência alimentar, na higidez do organismo, no funcionamento adequado dos rins e das brânquias e na reprodução. Este estudo visa identificar a influência exercida pelos lipídios dietéticos sobre as variáveis hematológicas e imunologia de pacus *Piaractus mesopotamicus* expostos à ação bacteriana. O desempenho de juvenis de pacu ($14,4 \pm 0,4$ g) alimentados com dietas contendo níveis crescentes (20, 40, 60, 80, 100 %) de óleo de linhaça (OL), óleo de girassol (OG) e sebo bovino (SB), ricas em ômega-3, ômega-6 e gordura saturada, respectivamente, foi comparado ao desempenho de peixes alimentados com uma dieta cuja fonte de lipídios era o óleo de soja e a uma ração comercial. Os resultados obtidos foram submetidos a uma análise das variâncias, rearranjados em grupos e analisados pelo teste de Dunnett. Os níveis dietéticos de 20% de OL, 80% de OG ou 80% de SB condicionaram as melhores taxas de desempenho zootécnico; o uso de 80% de OG foi o mais adequado para ganho de peso ($67,51 \pm 4,95$ g), taxa de conversão alimentar ($1,05 \pm 0,10$) e taxa de crescimento específico ($2,19 \pm 0,10$ %), assim como para o aumento no número de linfócitos ($1.964,13 \pm 413,55$), concomitante ao aumento dos leucócitos ($1.986,00 \pm 256,70$), o que conferiu maior resistência aos animais, quando expostos à bactéria *Aeromonas hydrophila*.

Palavras-chave: Ácidos graxos; Leucócitos; Linfócitos; Bacteriose; Pacu

ABSTRACT

Sources of dietary lipids and immune performance of pacu *Piaractus mesopotamicus*

The intake of lipids and its components, the fatty acids, are essential for proper growth, feed efficiency, health, appropriate kidney and gills function and reproduction performance. This study aims at identifying effects of dietary lipids on hematological variables and immunological performance of pacu *Piaractus mesopotamicus* exposed to bacterial challenges. Performance of juvenile pacu (14.4 ± 0.4 g) fed a diet with increasing levels (20, 40, 60, 80, 100 %) of linseed oil (LO); sunflower oil (SO) and beef tallow (BT), rich in omega-3, omega-6 fatty acids, and saturated fat, respectively, was contrasted to the performance of fish fed diets containing soybean oil as lipid source, and a commercial aquafeed. Recorded results were subjected to ANOVA, grouped and submitted to Dunnett's test. Dietary levels of 20 % LO, 80% SO or 80% beef tallow yielded the best growth performance; fish fed 80% SO had the best weight gain (67.51 ± 4.95 g), best feed conversion ratio (1.05 ± 0.10), specific growth rate (2.10 ± 0.10 %), and also increased number of lymphocytes ($1,964.13 \pm 413.55$) concomitantly to increased number of leukocytes ($1,986.00 \pm 256.70$), which also elicited the best immunological performance to fish challenged with *Aeromonas hydrophila*.

Keywords: Fatty acids; Bacterial diseases; Immunologic system; Pacu; *Piaractus mesopotamicus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de defesa específicos e não-específicos de acordo com suas linhas de defesa [modificado de Bower (1990) <i>apud</i> Fracalossi (1998)].	26
Figura 2 - Metabolismo dos ácidos graxos e seus precursores [modificado de Leonard et al. (2004) <i>apud</i> Vaz et al. (2006)].	34
Figura 3 - Taxas de sobrevivência nos tratamentos de acordo com a fonte dietética e nível de substituição na ração.	62
Figura 4 - Hemorragia nas nadadeiras e olhos de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> desafiados com a bactéria <i>Aeromonas hydrophila</i>	63
Figura 5 - Escurecimento da derme de pacus <i>Piaractus mesopotamicus</i> desafiados com a bactéria <i>Aeromonas hydrophila</i>	64
Figura 6 - Degeneração das nadadeiras de pacus <i>Piaractus mesopotamicus</i> desafiados com a bactéria <i>Aeromonas hydrophila</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis relativos de n-3 e n-6 em fontes lipídicas selecionadas.....	35
Tabela 2 - Composição em ácidos graxos do óleo de linhaça.....	36
Tabela 3 - Composição de Ácidos Graxos presentes em diferentes fontes de óleos vegetais e destaque para o óleo de girassol (adaptado de OLIVEIRA; VIEIRA, 2004)..	37
Tabela 4 - Composição em ingredientes e bromatológica da dieta basal e composição bromatológica da ração comercial.....	42
Tabela 5 - Conteúdo de lipídios e ácidos graxos n-3 e n-6 dos tratamentos contendo óleo de linhaça, óleo de girassol e sebo bovino, tratamento controle e ração comercial.	43
Tabela 6 - Desempenho zootécnico de pacus <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentados com diferentes níveis de substituição do óleo de soja das dietas pelos óleos de linhaça e girassol e sebo bovino (PUi = peso unitário inicial; PUf = peso unitário final; GPUf = ganho de peso unitário final; CAI = conversão alimentar individual; TCEi = taxa de crescimento específico).....	58
Tabela 7 - Valores iniciais das variáveis leucocitárias de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentados com diferentes níveis de substituição do óleo de soja por óleo de linhaça, óleo de girassol ou sebo bovino (LEUC = número total de leucócitos LINF = linfócitos	59
Tabela 8 - Valores finais das variáveis leucocitárias de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentados com diferentes níveis de substituição do óleo de soja por óleo de linhaça, óleo de girassol ou sebo bovino (LEUC = número total de leucócitos; LINF = linfócitos; MON = monócitos; NEU = neutrófilos; EOS = eosinófilos; ERIT = eritrócitos; PT = proteína).....	60
Tabela 9 - Diferenças observadas nos valores das variáveis leucocitárias de juvenis de pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentados com diferentes níveis de substituição do óleo de soja por óleo de linhaça, óleo de girassol ou sebo bovino (LEUC = número total de leucócitos; LINF = linfócitos; MON = monócitos; NEU = neutrófilos; EOS = eosinófilos; ERIT = eritrócitos; PT = proteína).....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
AA	Ácido Araquidônico
ADGL	Ácido di-homo-gamalinoleico
AEP	Ácido eicosapentaenóico
AGE	Ácidos Graxos Essenciais
AGIs	Ácidos Graxos Insaturados
AGPI	Ácido Graxo Poliinsaturado
AGs	Ácidos Graxos
ATP	Adenosina Trifosfato
BPMs	Boas Práticas de Manejo
CA	Conversão Alimentar
DHA	Docosaexanóico
dL	Decilitros
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EOS	Eosinófilos
EPA	Eicosapentanóico
ERIT	Eritrócitos
g	Grama (unidade de medida)
GP	Ganho de Peso
LA	Ácido linoleico
LEUC	Leucócitos
LINF	Linfócitos
LNA	Ácido alfa-linolênico
LT	Leucotrienos
MAR	Resistência Múltipla aos Antibióticos
MG	Monoglicerídios
mL	Mililitro
MON	Monócitos
mV	Milivolt
NEU	Neutrófilos

OD	Oxigênio Dissolvido
PF	Peso Final
PG	Prostaglandina
pH	Potencial hidrogeniônico
PKC	Proteína Quinase C
PRT	Proteína plasmática
RC	Ração Comercial
RPM	Rotações por minuto
TC	Tratamento Controle
TCE	Taxa de crescimento Especifico
TRAT	Tratamento
TXA	Tromboxanos
UFC	Unidade Formadora de Colônia

1 INTRODUÇÃO

O interesse na criação e comercialização de peixes nativos brasileiros, com destaque para o tambaqui *Colossoma macropomum* e o pacu *Piaractus mesopotamicus*, tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas. A produção dessas espécies que era de 14.821 t em 2001 (BORGUETTI et al., 2003) alcançou 64.625 t em 2009 (BRASIL, 2010), ou seja, experimentou evolução de 336% em pouco mais de cinco anos, devido à adoção de práticas de manejo mais intensivas. O pacu é muito apreciado comercialmente e amplamente utilizado nas pisciculturas, pois apresenta bom ganho de peso, rusticidade e bom valor de mercado (OLIVEIRA et al., 2008).

Em sistemas de produção aquícola os animais estão expostos a condições intensivas de manejo, com adensamento populacional que chega a até 60 kg/m³ (OZÓRIO et al., 2004). Práticas de produção intensiva e de manejo, como a manipulação, a reprodução artificial, por exemplo, podem causar consequências deletérias ao sistema imunológico dos animais (PAVANELLI et al., 2000; VAL et al., 2004), o que os torna suscetíveis a ação de micro-organismos patogênicos, em especial as bactérias, que são causadoras de surtos epizooticos e comumente tratados com quimioterápicos (CYRINO et al., 2010).

Várias espécies de bactérias fazem parte da biota de ambientes aquáticos e agem como patógenos oportunistas, ou seja, manifestam sua patogenicidade a partir de uma pré-disposição do organismo ao agente. Os métodos de produção intensiva induzem fortemente o estresse nos animais e a ação patogênica oportunista de bacilos gram-negativos é o que provoca maior mortandade nos sistemas de piscicultura (RICHARDS; ROBERTS, 1978). A *Aeromonas hydrophila* faz parte da microbiota da água, pele, brânquias e intestino dos peixes. Quando há desequilíbrio dos sistemas bactéria-hospedeiro-ambiente, desencadeiam epizootias associadas à septicemia hemorrágica em peixes de água doce (AUSTIN, 1980; BARJA; ESTEVES, 1988; COSTA, 2001).

O uso indiscriminado de substâncias antimicrobianas pela indústria aquícola em doses profiláticas e terapêuticas ou ainda em dosagens subterapêuticas com a função de promotores de crescimento já foi muito disseminado e, ainda hoje, esta prática pode

ser observada em muitos sistemas de produção. A adoção desta técnica já ocasionou o desenvolvimento de resistência patogênica a vários antimicrobianos, mesmo na nova indústria aquícola nacional (BELÉM-COSTA; CYRINO, 2006). Uma vez que a resistência bacteriana é adquirida pelas cepas e não por indivíduos, esta característica é transmitida a outras bactérias levando à redução da eficácia dos tratamentos com quimioterápicos (McPHEARSON et al., 1991).

Como forma de minimizar este impacto, medidas alternativas são adotadas a fim de atender a técnicas de Boas Práticas de Manejo (BPMs) que, além de alternativas seguras ao uso de quimioterápicos garantem alimentos adequados ao consumo humano (GATESOUBE, 1999; RAA, 2000; ANDERSON, 2004; BOYD; QUEIROZ, 2004; KUMARI; SAHOO, 2006). Um exemplo das medidas adotadas é o uso de substâncias associadas à alimentação, com capacidade de modular o sistema imunológico, dentre as quais os lipídios que, presentes em praticamente todos os processos fisiológicos de um organismo, merecem atenção especial.

A ingestão de lipídios e seus constituintes, os ácidos graxos, são essenciais na manutenção do crescimento, na eficiência alimentar, na higidez do organismo, no funcionamento adequado dos rins e das brânquias e na reprodução, entre outros aspectos, que conferem um melhor desempenho aos peixes confinados. Entretanto, não somente o uso de lipídios como promotores da atividade imunológica em peixes é ainda cercado de muitas dúvidas em função da sua complexidade, como também a sua eficiência ainda não está completamente elucidada, apesar do relato de casos nos quais já se obteve sucesso.

Guimarães et al. (1995) afirmam que a quantidade e a natureza dos ácidos graxos fornecidos nas dietas de peixes são importantes moduladores da composição lipídica de linfócitos, fato explicado pela capacidade dos animais monogástricos absorverem os ácidos graxos da série n-3 e n-6 praticamente intactos e incorporarem os mesmos às membranas celulares, possibilitando com isso, uma adequada fluidez de membrana, fator essencial para animais heterotérmicos.

Porém, diferente de aves e mamíferos, os estudos referentes ao funcionamento do sistema imunológico de peixes ainda são limitados, necessitando, assim, de maiores

investimentos com o objetivo de gerar um pacote de informações suficientes que atendam ao que se pretende em relação à saúde animal.

Sabe-se que a presença, a quantidade e a proporção das diferentes células no sangue periférico dos peixes refletem o estado fisiológico específico do animal em um dado momento ou período da vida (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). Logo, a análise de parâmetros hematológicos dos peixes permite entender os possíveis processos fisiológicos sendo desencadeados neste grupo animal.

Sendo assim, a busca por informações a respeito de fontes lipídicas em termos de respostas imunológicas e níveis dietéticos que atendam as exigências espécie-específicas torna-se necessário para que se possa fazer uso efetivo dos ácidos graxos na nutrição e higidez de estoques confinados de peixes.

Com base no exposto, este estudo visa determinar e comparar os efeitos que fontes de ômega-3 – óleo de linhaça –, ômega-6 – óleo de girassol – e uma fonte lipídica de ácidos graxos altamente saturados – sebo bovino – exercem sobre o desempenho zootécnico, sobre as variáveis leucocitárias e sobre a resistência do pacu a microrganismos patogênicos, integrando com isso o sistema de nutrição-sanidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A espécie

O pacu *Piaractus mesopotamicus* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), oriundo das Bacias do Prata e Pantanal (BORGHETTI; CANZI, 1993; PAI et al., 2000) é a segunda espécie de peixe mais criada no Brasil (URBINATI; GONÇALVES, 2005). O pacu é uma espécie migratória, de hábito alimentar onívoro com tendência a herbívoro, com boa taxa de crescimento e aceitação pelo consumidor (CASTAGNOLLI, 1995; JOMORI et al., 2005), bem como precocidade e a adaptação à alimentação artificial, fatores estes que propiciam o sucesso da criação em sistemas de criação intensivo (JOMORI et al., 2003; SAMPAIO-OLIVEIRA et al., 2004; OSTRENSKY et al., 2008). Em função deste potencial, a espécie vem sendo utilizada em sistemas de produção cada vez mais intensivos, o que expõe os animais a condições estressantes, característica intrínseca à atividade de piscicultura. Estas condições representam fatores predisponentes de suscetibilidade dos animais a micro-organismos patogênicos, em função dos distúrbios na sua homeostase fisiológica (COSTA, 2001; URBINATI; CARNEIRO, 2004; URBINATI; GONÇALVES, 2005)

2.2 O sistema imunológico dos peixes

Além de serem animais heterotérmicos, os peixes possuem um contato direto com o ambiente em que estão inseridos, o qual está em constante modificação e alteração em relação a seus parâmetros físico-químicos como concentração de oxigênio dissolvido, pH, salinidade, amônia, nitrito e nitrato entre outros, que contribuem para alterações bruscas na sua homeostase (OBA et al., 2009). Aliados a estes fatos, a competição por espaço e alimentos intrínseca aos sistemas intensivos de produção, afetam diretamente o seu sistema imunológico, através do aumento da concentração de cortisol plasmático, um hormônio capaz de induzir a imunossupressão (MOMMSEN et al., 1999; URBINATI; CARNEIRO, 2004; VAL et al., 2004) e reduzir a resistência dos animais à ação de micro-organismos patogênicos como bactérias, fungos e parasitas.

O estresse é descrito como estímulos externos que detectados pelo sistema nervoso autônomo são capazes de promover alterações na homeostase animal (CANNON, 1935). Estas alterações condicionam as respostas primárias – ativação dos centros cerebrais, com liberação de catecolaminas e corticosteroides –; secundárias – os resultados destas atividades fisiológicas aparecem na forma de alterações sanguíneas, teciduais e comportamentais, incluindo alteração nos batimentos cardíacos, na absorção de oxigênio e equilíbrio osmótico –; e terciárias – “tradução” das ações anteriores sobre a população, como inibição do crescimento, da reprodução e da resposta imune (BARTON, 2002; LIMA et al., 2007). A resposta imunológica é dada através de duas frentes de ação do sistema imunológico: os mecanismos de defesa específicos ou inatos e os não-específicos ou adaptativos (Figura 1).

Figura 1 - Mecanismos de defesa específicos e não-específicos de acordo com suas linhas de defesa [modificado de Bower (1990)¹ apud Fracalossi (1998)]

¹ BOWER, R.H. Nutrition and immune function. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 5, p. 189-195, 1990.

O mecanismo de defesa não-específico é o conjunto de respostas ou processos de defesa do organismo inerentes ao indivíduo e a primeira linha de defesa contra micro-organismos e agentes invasores, com resposta independente ao antígeno. Os componentes do sistema de defesa não-específico incluem barreiras anatômicas, moléculas de secreção e componentes celulares, de resposta imediata e máxima, não-específicas a determinado antígeno e sem resultado em memória imunológica (MAYER, 2006).

As barreiras anatômicas funcionam como uma proteção física impermeável à maioria dos agentes patogênicos, e são classificadas como a primeira linha de defesa do organismo, associada à produção de substâncias orgânicas como o muco e enzimas que impedem a fixação do micro-organismo (MAYER, 2006). Entretanto, se não houver a efetiva ação destas barreiras, a ocorrência de ação dos agentes patogênicos pode desencadear o processo de ativação do sistema complemento e de resposta inflamatória, os quais levam ao aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de células fagocitárias e produção de enzimas para degradação destes agentes.

Os mecanismos de defesa específicos ou adaptativos, por sua vez, são desenvolvidos de acordo com a exposição do organismo aos agentes patogênicos e seus antígenos, desencadeando com isso o processo de memória imunológica a partir da estimulação da atividade dos linfócitos (células reconhecedoras). Quando ocorre a segunda exposição do organismo ao agente patogênico, a resposta dos linfócitos é enérgica, rápida e específica, neutralizando a ação no micro-organismo antes mesmo que ele tenha oportunidade de se multiplicar ou invadir de forma mais intensa o organismo. Uma vez que a imunidade específica e a imunidade não-específica são dependentes e influenciam direta ou indiretamente uma à outra, raramente um estímulo patogênico desencadeia um único tipo de resposta imunológica. Porém, se comparados aos demais grupos de vertebrados, é correto afirmar que os peixes dependem mais dos mecanismos de defesa não-específicos e das respostas mediadas por células de defesa, do que da produção de anticorpos (LANDOLT, 1989; BLAZER, 1992; FRACALOSS, 1998).

A resposta imune é dependente de replicação celular e da síntese de compostos protéicos ativos. Desta forma, é profundamente afetada pelo *status* nutricional do

animal, que determina a habilidade metabólica celular e a eficiência com que a célula reage aos estímulos, iniciando e perpetuando o sistema de proteção e autoreparação orgânicas (BRUNETTO et al., 2007). Diante disso, adoção de técnicas e métodos que visem o aumento da resistência dos peixes através da modulação do seu sistema imunológico é indispensável ao sistema de produção (GATESOUBE, 1999; FRACALLOSSI, 1998).

2.3 Nutrição, lipídios dietéticos e sanidade de peixes

Um dos objetivos principais da atividade aquícola é alcançar o rápido crescimento aliado a alta taxa de sobrevivência dos peixes confinados a partir de condições adequadas de nutrição e sanidade. Alterações no estado de homeostasia do animal podem ser induzidas por diversos fatores, manifestadas de diferentes formas e apresentar duração e severidade variando de acordo com a origem da patogenia.

As patogenias podem ser causadas por agentes vivos, o que inclui fungos, vírus, bactérias e parasitas, assim como por agentes inertes, que são as condições ambientais que afetam os processos fisiológicos normais e causam patogenias (GATLIN, 2002). As várias espécies de peixes assim como certas cepas dentro de uma determinada espécie de micro-organismo, podem apresentar tolerâncias diferentes para as variadas condições ambientais e agentes infecciosos (PLUMB, 2011). Por outro lado, a água dos sistemas de criação, a superfície corporal e o trato digestório dos peixes abrigam uma microbiota espécie-específica e comum a cada ambiente, sendo estes micro-organismos muitas vezes responsáveis não só pela higidez do meio – e.g. ciclagem de nutrientes – bem como pela produção de compostos necessários ao ambiente e aos animais, podendo viver em equilíbrio harmônico, desde que as condições do ecossistema estejam balanceadas (ODUM, 1988; BARJA; ESTEVES, 1988; HOVDA et al., 2007).

As constantes alterações dos parâmetros físico-químicos da água dos sistemas de criação, em associação ao estresse causado pelo manejo, afetam diretamente o sistema imunológico dos animais, permitindo a ação patogênica e comprometendo o bom desempenho zootécnico, o que implica diretamente em prejuízos econômicos

(RADU et al., 2003; VIVEKANADHAN et al., 2002). Muito embora não existam dados consolidados para a realidade brasileira, a exemplo de regiões onde a piscicultura esteja em estado mais avançado de desenvolvimento, as doenças de origem bacteriana são a causa dos maiores prejuízos econômicos em pisciculturas comerciais.

Micro-organismos como *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Flavobacterium columnare*, *Vibrio anguillarum* e *Edwardsiella tarda* são considerados oportunistas, e fazem parte da microbiota da água, pele, brânquias e intestino dos peixes. As *Aeromonas* são bactérias de grande interesse em ictiopatologia. Trata-se de uma agente patogênico tipicamente oportunista, naturalmente encontrado no material em decomposição no substrato das estruturas de criação e na microbiota intestinal comum e dérmica de peixes sadios (WALTERS; PLUMB, 1980; DUGENCI; CANDAN, 2003; POND et al., 2006). As *Aeromonas* são bactérias gram-negativas, anaeróbicas facultativas, não-esporulantes, móveis, com um flagelo polar e um dos principais agentes de perdas consideráveis em pisciculturas; têm ampla distribuição geográfica e adaptam-se facilmente a mudanças ambientais em função da ampla variedade de enzimas secretadas por suas cepas (PEMBERTON et al., 1997).

Estudos demonstraram que várias cepas de *Aeromonas* são capazes de provocar hemólise em peixes, coelhos, ovelhas, vacas, cavalos e até do homem. Cinco dias após inoculação intraperitoneal, peixes experimentalmente infectados apresentavam lesões musculares e dérmicas sob o local da injeção, e ainda no fígado e rins, sendo considerados impróprios para comercialização e caracterizando, portanto, um grave problema econômico para os sistemas de criação de peixes (VIEIRA, 2003).

Como forma de minimizar as perdas decorrentes da ação de bactérias, produtores recorrem ao uso de substâncias antibióticas para o tratamento destes patógenos, incorporando os fármacos ao sistema de criação em doses subterapêuticas administradas diretamente na água ou adicionados em rações. Esta prática pode ocasionar o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes, fenômeno conhecido como MAR (resistência múltipla aos antibióticos), já registrado no Brasil por Belém-Costa e Cyrino (2006); esta resistência adquirida pelas cepas bacterianas aos quimioterápicos é característica transmitida para outras bactérias, reduzindo a eficácia do tratamento com quimioterápicos (McPHEARSON et al., 1991).

Os princípios de Boas Práticas de Manejo (BPM), incluindo o manejo sanitário, preconizam o uso de substâncias alternativas ao uso de antibióticos no tratamento de enfermidades dos peixes. Em vista disso, o uso de substâncias imunoestimulantes como mediadores da resposta à ação patogênica e a manipulação das dietas animal a fim de conferir propriedades funcionais aos alimentos, aspecto em que as fontes de lipídios dietéticos destacam-se como importantes reguladores do sistema imune em animais heterotérmicos, ganham importância imediata no desenvolvimento da piscicultura.

Os nutrientes existentes em uma ração balanceada e formulada para atender adequadamente as necessidades de um animal, exercem influência direta sobre a imunidade do organismo. Os nutrientes de uma dieta estão diretamente relacionados ao metabolismo e funcionam como substratos e cofatores enzimáticos para a síntese celular, assim como para a produção de moléculas de proteção como as lisozimas, os anticorpos e o óxido nítrico, que funcionam como efetores do sistema imunológico (KLASING et al., 1980).

Especialistas em nutrição humana e animal vêm investigando a relação existente entre os ingredientes selecionados para a elaboração de dietas e sua interação com o sistema imunológico. As informações sobre a relação dos lipídios dietéticos e sua influência sobre a resposta imunológica, no entanto, ainda são limitadas e apresentam contradições, especialmente em função da sua complexidade e do fato de a efetividade da sua ação ainda não estar completamente elucidada.

Os lipídios são nutrientes essenciais ao metabolismo energético dos organismos aquáticos e fazem parte de um grupo amplo de compostos biológicos facilmente solubilizados por solventes orgânicos, mas insolúveis ou pouco solúveis em água (KOOLMAN; ROEHM, 2005). Apresentam-se como importante fonte de energia e ácidos graxos essenciais para o desenvolvimento adequado dos animais, atendendo a demanda energética na forma de Adenosina Trifosfato (ATP) e contribuem para o transporte de vitaminas lipossolúveis.

Os lipídios estão envolvidos em praticamente todos os processos fisiológicos de um organismo sendo absorvidos na forma de ácidos graxos (AGs) e monoglicerídeos (MG). Desta forma, quando presentes nas dietas e eventualmente metabolizados, os

lipídios promovem alterações na composição dos AGs que constituem os fosfolipídios de membrana, contribuindo com o processo de fluidez, assim como de resposta imunológica. Além de atenderem as necessidades energéticas de crescimento e manutenção, os lipídios são capazes de auxiliar as funções dos rins e das brânquias, o desenvolvimento neural e visual, bem como a reprodução e a sanidade (HENDERSON; TOCHER, 1987; SARGENT et al., 2002; TOCHER, 2003)

A exemplo de outros vertebrados, os peixes não são capazes de sintetizar os ácidos graxos (AGs) linoléico (18:2 n-6) e linolênico (18:3 n-3), necessitando, portanto, que estes sejam supridos na dieta (NEW, 1987), atendendo exigências espécie-específicas para os ácidos graxos essenciais (AGE). Entretanto, os peixes possuem grande habilidade em converter ácidos graxos insaturados (AGIs) de 18 átomos de carbono em AGs altamente insaturados da mesma série.

Os AGs são as unidades fundamentais da maioria dos lipídios, classificados como ácidos orgânicos constituídos de átomos de carbono e diferenciados pelo número e posição de duplas ligações. Podem apresentar-se em moléculas de quatro a seis átomos de carbono (AGs de cadeia curta), oito a 12 átomos de carbono (AGs de cadeia média) e mais de 12 átomos de carbono (AGs de cadeia longa), caracterizando-se como AG saturado, AG monoinsaturado ou AG poli-insaturado (AGPI), de acordo com o número de duplas ligações em sua cadeia de carbono. São compostos essenciais para o crescimento e manutenção das membranas das células do sistema imune (CUNNANE et al., 1993). As alterações na transdução de sinais causadas possivelmente pelo efeito dos AGs sobre a proteína quinase C (PKC), por exemplo, são uma segunda opção de mecanismos imunológicos que podem ser afetados, seguidas das modificações na produção de moléculas imunologicamente ativas, como os ácidos araquidônico (AA), eicosapentanóico (EPA) e docosaexanóico (DHA).

Muitas respostas imunes estão baseadas nas interações celulares das membranas de leucócitos (BALFRY; HIGG, 2001) e à semelhança do que acontece com mamíferos, a composição dos AGs da dieta pode afetar diretamente a resistência dos peixes às doenças (CALDER, 1998; MAKI, 1992). Desta forma, a própria composição em lipídios das membranas e suas propriedades podem ter efeito sobre a resistência às doenças, uma vez que algumas respostas de defesa são baseadas na

interação das membranas dos leucócitos, para ativação da produção de citocinas (BALFRY; HIGG, 2001).

Os peixes de água doce parecem ter maior capacidade de alongar e dessaturar os AGs em EPA e DHA, por possuírem as enzimas $\Delta 6$ - e $\Delta 5$ - dessaturase (SARGENT, 1995; MOREIRA et al.; 2001; SOUZA et al., 2007). Porém, a deficiência de AGEs ou de seus precursores na dieta, pode causar diminuição do crescimento, deficiência na conversão alimentar, despigmentação do epitélio, ulceração nas nadadeiras, degeneração gordurosa do fígado, aumento da taxa respiratória, comprometimento da eritropoiese e aumento na taxa de mortandade (CHAGAS et al., 2009).

O efeito modulador de AGs na dieta sobre as respostas imunes tem sido atribuído, em parte, à sua influência na produção de prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs) pelos macrófagos (OLIVEIRA, 2004), bem como seus efeitos sobre o estresse oxidativo, os perfis de lipoproteínas e fluidez da membrana das células, que por sua vez afeta os receptores de membrana, a afinidade de ligação ao receptor, e atividades enzimáticas, que são capazes de exercer influência positiva sobre a saúde humana (NARAYAN et al., 2006), porém, existem evidências que EPA e DHA, quando administrados em excesso, aumentam o estresse oxidativo e causam imunossupressão (POMPEIA et al., 2000; NARAYAN et al., 2006). Em estudos realizados com bagre do canal *Ictalurus punctatus* foi relatado que os animais alimentados com ração contendo altos índices de AGPI da série n-3 apresentaram maior taxa de mortandade após a exposição à bactéria *Edwardsiella ictaluri* (FRACALOSSO; LOVELL, 1994). Igual resposta foi obtida para Salmão do Atlântico *Salmo salar*, quando houve o aumento da concentração de AGPI da dieta de 12,7% para 24,2% dos lipídios totais e os animais foram desafiados com a bactéria *Yersinia ruckeri* (ERDAL et al., 1991).

Pesquisas realizadas por Li et al. (2004), com a inclusão de n-3 em dietas para bagre do canal demonstraram efeitos negativos daqueles AGs sobre o sistema imunológico, contradizendo o proposto por Sheldon e Blazer (1991), que relataram atividade bactericida positiva correlacionada com os lipídios dietéticos para a mesma espécie. A inclusão de AGs da série n-6 para a truta de riacho *Salvelinus alpinis* promoveu maior sobrevivência dos animais (LODEMEL et al., 2001), enquanto que para a dourada *Sparus aurata* diminuiu a atividade fagocitária (MONTERO et al., 2005).

Estes resultados estão relacionados com a exigência de cada espécie por um determinado tipo de AG e sua atuação sobre o sistema imunológico e ressaltam a importância de um equilíbrio da inclusão destas substâncias na dieta como mediadores do sistema imunológico em teleósteos

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs)

Os ácidos graxos poli-insaturados abrangem as famílias de ácidos graxos n-3 e n-6. Os ácidos graxos de cadeia muito longa, como o ácido araquidônico e o docosaexaenóico, desempenham importantes funções no desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina, bem como do sistema imunológico. Esse grupo de ácidos graxos não pode ser obtido por síntese, mas pode ser sintetizado a partir dos ácidos linoléico (LA) e alfa-linolênico (LNA) presentes na dieta (MARTIN et al., 2006). Os AGs n-3 são uma classe de AGPIs essenciais, nos quais a primeira dupla ligação se encontra no carbono três (SANTOS; BORTOLOZO, 2008). Os ácidos graxos n-3 clinicamente importantes incluem: ácido α -linolênico (ALA), ácido eicosapentanoico (EPA) e ácido docosa-hexaenoico (DHA) (Figura 2) (SHILS et al., 2003). Segundo Salmeron (2000), é possível sintetizar em pequenas quantidades os ácidos graxos n-3 e n-6, a partir de alimentos que possuam ácido linolênico, sendo a delta-6-desaturase a enzima chave no organismo responsável por esta conversão.

Os ácidos araquidônico, di-homo-gamalinoleico (20:3 n-6, ADGL), e eicosapentaenoico (20:5 n-3, AEP) são precursores dos prostanóides das séries 1, 2 e 3 e dos leucotrienos das séries 4, 5 e 6, respectivamente (Figura 3). Os prostanóides são obtidos pela enzima cicloxigenase, que converte esses ácidos graxos livres em endoperóxidos cíclicos, originando as prostaglandinas e tromboxanos (TXA). Os leucotrienos são obtidos pela ação da enzima lipoxigenase, que também está relacionada com a produção das lipoxinas (YOU DIM et al., 2000; ALBERTAZZI; COUPLAND, 2002).

Figura 2 - Metabolismo dos ácidos graxos e seus precursores [modificado de Leonard et al. (2004)² apud Vaz et al. (2006)].

Tanto os prostanóides como os leucotrienos agem tanto de forma autócrina como parácrina, influenciando inúmeras funções celulares que controlam mecanismos fisiológicos e patológicos no organismo (MARTIN et al., 2006; SIMOPOULOS, 2004). A grande afinidade do prostanóide AA pela ciclo-oxigenase resulta em uma alta probabilidade de obtenção das prostaglandinas e leucotrienos da série 2, que participam de inúmeros processos inflamatórios do organismo, porém os seus correspondentes na série n-3 possuem propriedades anti-inflamatórias. Com base nisso, estudos tem proposto que a produção excessiva de prostanoides da série 2 está relacionada com a ocorrência de desordens imunológicas, doenças cardiovasculares e inflamatórias, sendo recomendado aumentar a ingestão de ácidos graxos n-3 para

²LEONARD, A.E.; PEREIRA, S.L., SPRECHER, H., HUANG, Y.S. Elongation of long-chain fatty acids. Progress in Lipid Research v.43, n.1, p.36-54, 2004.

elevar a produção de prostanóides da série n-3 (PUSHKAREVA; TURUTIN; SUD'INA, 2002).

Fontes dietéticas de ácidos graxos

Os ácidos graxos LA e LNA são considerados ácidos graxos essenciais e precursores dos demais ácidos da família n-3 e n-6, respectivamente. O ácido LA pode ser encontrado em abundância nos óleos de milho, girassol e soja, dentre outros. O ácido LNA é encontrado em concentrações elevadas na semente de linho (Tabela 1). (BALFRY; HIGGS, 2001).

Tabela 1 - Níveis relativos de n-3 e n-6 em fontes lipídicas selecionadas

Fonte lipídica	Ácidos graxos n-6	Ácidos graxos n-3
Óleo de peixe	1	3
Sebo bovino	1	1
Gordura de frango	2 ou 3	1
Óleo de canola	3	2
Óleo de soja	3	2
Óleo de linhaça	2 ou 3	3
Óleo de girassol	3	1

Modificado de Balfry e Higgs (2001).

Nota: Os números 1, 2 e 3 significam: baixo (<5), médio (5 – 15) ou alto (> 15) nível de n-3 e n-6 nas fontes.

Os resultados de estudos realizados com o objetivo de avaliar a influência que fontes lipídicas exercem para diversos processos metabólicos de peixes tropicais e/ou nativos apresentam inconsistências ou são contraditórios (PEZZATO, 1990; MACEDO-VIEGAS; CONTRERAS-GUZMAN, 1998; PORTELLA et al., 2000; MELO et al., 2002; MARTINO et al., 2002, 2005). Em relação a espécies de clima temperado, destacam-se os estudos de Thompson et al. (1996), que relataram que o salmão do Atlântico *Salmo salar* alimentado com dietas ricas em ácidos graxos n-3 e n-6 apresentaram aumento na resposta do linfócito B e na taxa de sobrevivência após o desafio com *Aeromonas salmonicida* e *Vibrio anguillarum*, e de Brandsen et al. (2003), que registraram aumento

na mortandade acumulada para o salmão do Atlântico alimentado com óleo de girassol e desafiado com a bactéria *V. anguillarum*.

Óleo de linhaça

A linhaça *Linum usitatissimum* (L.) é originária da Índia, tem sido cultivada desde a antigüidade, sobretudo como uma planta para fibras têxteis, o linho. Atualmente o cultivo predomina em países de clima temperado como Índia, Estados Unidos, Canadá, Rússia, Ucrânia e Argentina. A linhaça é um alimento muito rico em proteínas, lignanas, fibra alimentar, compostos fenólicos, flavonóides, vitaminas e minerais, todas estas substâncias consideradas importantes para promover efeitos benéficos ao sistema imunológico, conferindo à fonte propriedades funcionais quando utilizadas na alimentação (CHEN et al., 2006). Em 100g de grão de linhaça, podem ser encontrados aproximadamente 35 g de lipídios, 26 g de proteínas, 14 g de fibra alimentar e 0,2 g de cálcio. O grão de linhaça é composto em aproximadamente 40% do seu peso absoluto por óleo, uma fonte rica em AGs do tipo n-3 (CHOO et al., 2007) (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição em ácidos graxos do óleo de linhaça

Ácidos Graxos	Estrutura	Valores de Referência
		%
Ácido Palmítico	C16:0	5,7 - 7,0
Ácido Esteárico	C18:0	3,0 - 4,0
Ácido Oleico (Ômega 9)	C18:1	20,0 - 20,3
Ácido Linoleico (Ômega 6)	C18:2	17,0 - 17,3
Ácido Linolênico (Ômega 3)	C18:3	52,0 - 54,0

Valores de referência: AOCS (1998)

O óleo de linhaça já foi testado como fonte de lipídios na dieta de peixes com resultados contraditórios. Por exemplo, Francis et al. (2007) relataram que o aumento no nível de inclusão de óleo de linhaça na dieta de juvenis de bacalhau Murray *Maccullochella peelii peelii* afeta negativamente o crescimento da espécie, mas Menoyo et al. (2005) relataram que o óleo de linhaça pode substituir completamente o óleo de peixe em dietas do salmão do Atlântico sem afetar o crescimento da espécie.

Óleo de girassol

O girassol (*Helianthus annuus*) é originário da América do Norte e foi introduzido na Europa no século XVI, inicialmente na Espanha e depois na Inglaterra e França. Até o século XVIII era cultivado como planta ornamental e medicinal e atualmente é utilizado como fonte de óleo comestível. Destaca-se como a quarta oleaginosa em produção de grãos e a quinta em área cultivada no mundo todo (EMBRAPA, 2008). As sementes de girassol possuem cerca de 47% de matérias graxas, com uma grande abundância de ácidos graxos insaturados, especialmente o ácido linoléico (WENDT, 2005).

O óleo de girassol se destaca por excelentes características físico-químicas e nutricionais, pois possui alta relação de ácidos graxos poli-insaturados/saturados, com uma composição média de 65% (Tabela 3) de ácido linoléico (EMBRAPA, 2008). A exemplo de outras fontes de lipídios dietéticos, resultados de estudos realizados com o objetivo de identificar a influência da inclusão do óleo de girassol em dietas para peixes (BELL et al., 1993, 1996; TORSTENSEN et al., 2000; BUREAU et al., 2008, MANRAL et al., 2008; SENADHEERA et al., 2010; ZAKERI et al., 2011) também não apontam uma tendência de efeitos homogêneos no desempenho, composição corporal e regulação das funções imunológicas das espécies estudadas.

Tabela 3 - Composição de Ácidos Graxos presentes em diferentes fontes de óleos vegetais e destaque para o óleo de girassol (adaptado de OLIVEIRA; VIEIRA, 2004)

Oleaginosas	Principais ácidos graxos (componentes)					Ácidos graxos		
	C12:0 ¹	C18:0 ²	C18:2 ³	C18:3 ⁴	C22:1 ⁵	Saturados	Mono-insaturados	Poli-insaturados
	----- % -----					----- % -----		
Algodão		13,7	56,5	0,1		26,8	14,4	56,6
Amendoim		40,7	33,9	0,1		21,3	17,1	34,0
Canola		60,3	20,1	9,5	0,7	6,3	63,8	29,6
Girassol		23,1	65,1	0,2		11,6	23,1	65,3
Oliva		64,0	15,9	0,1		18,0	66,0	16,0
Palma	44,7	17,1	2,9	0,1		76,5	17,1	3,0
Soja		24,8	52,4	7,7		15,2	24,8	60,0

¹Ácido láurico

²Ácido esteárico

³Ácido linoléico

⁴Ácido Alfa-linolenico

⁵Ácido erucico

Sebo bovino

No ano de 2009, foram abatidos no Brasil 6,20 milhões de toneladas de bovinos (IBGE, 2010), gerando um volume de co e subprodutos consideráveis, que podem ser utilizados na fabricação de rações animais monogástricos, representando importantes fontes de aminoácidos, ácidos graxos e minerais, a um custo relativamente baixo (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

O sebo bovino consiste em uma fonte de energia de baixo custo quando comparado com as gorduras de origem vegetal dada a fácil deposição corporal da gordura contida na fonte (FERREIRA et al., 2005), pois é constituído por triglicerídeos que tem na sua composição essencialmente os ácidos oléico (45%), palmítico (25%) e esteárico (20%) (FENNEMA, 2000); é utilizado essencialmente como fonte energética e para melhorar a palatabilidade das rações.

Estudos realizados por Lim et al. (2008), com tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus* afirmaram porém, que é importante um equilíbrio de ácidos graxos e gorduras fornecidos na dieta, uma vez que os animais alimentados com a dieta composta apenas de sebo bovino apresentaram valores reduzidos para as variáveis de desempenho zootécnico, quando relacionadas àquelas alimentadas com óleos de fontes vegetais ou a combinação deles com o sebo bovino.

Os ácidos graxos palmítico e mirístico são os mais comuns em células de mamíferos (SMITH et al., 2007) e principais responsáveis por alterações metabólicas, principalmente no que diz respeito ao acúmulo de triglicerídios no organismo, com via contrária para o ácido linoleico, que produz o efeito inverso (LIMA et al., 2002). São os principais constituintes de gorduras saturadas que ocasionam a diminuição da sinalização da insulina no sistema nervoso, causando resistência a insulina pelos receptores de membrana e conduzindo a quadros de aumento de peso e deposição de gorduras (BENOIT et al., 2009)

Uma das prováveis explicações para seu resultado inferior aos óleos de origem vegetal, é não promover uma proporção adequada entre ácidos graxos saturados e insaturados, acarretando menor absorção e conversão das gorduras (GAIOTTO et al., 2000), visto que os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia média e longa são mais solubilizados na fase micelar do que os ácidos graxos saturados, resultando em

maiores coeficientes de absorção e maiores valores energéticos para as fontes lipídicas insaturadas.

Além de prejuízos quanto ao desempenho zootécnico, fontes de gordura saturada podem acarretar suscetibilidade dos animais em exposição a micro-organismos patogênicos, afirmação que é colaborada por estudos de Lim et al. (2008), que mostraram maiores índices de mortandade para tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus* alimentadas com dietas ricas em gorduras saturadas. Porém, uma vez associadas com fontes lipídicas ricas em ácidos graxos n-3 e n-6, podem ser incluídas em dietas sem prejuízos em desempenho e sobrevivência (BUREAU et al., 2008)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* provenientes de piscicultura comercial foram condicionados às instalações do Laboratório de Nutrição de Peixes do setor de Piscicultura, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” por quinze dias. Após anestesia em solução de benzocaína (1:10.000) os peixes foram pesados em balança eletrônica (0,01g) separados em lotes homogêneos de 15 peixes ($14,4 \pm 0,4$ g) e distribuídos em aquários de vidro com volume de (70 L), sob renovação parcial, individual e contínua de água, ainda sob aeração contínua e temperatura controlada sob fotoperíodo 12L:12E.

Os ensaios foram instalados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 17 tratamentos em arranjo fatorial ($n=4$): três fontes lipídicas (óleo de linhaça, óleo de girassol e sebo bovino) em cinco níveis de substituição (20, 40, 60, 80 e 100%) a uma dieta basal com 6 % de extrato etéreo na forma de óleo de soja, mais um tratamento controle (TC = 0% de substituição) e uma ração comercial (RC).

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia por 85 dias (08h00m e 17h00m) até a saciedade aparente. Diariamente foram monitorados o pH, o oxigênio dissolvido e temperatura, e semanalmente a alcalinidade e a amônia total da água.

3.2 Elaboração das dietas

A elaboração das dietas experimentais atendeu às exigências nutricionais para pacu, preconizadas por Bicudo et al. (2008) e Bittencourt et al. (2009). Os ingredientes da dieta basal foram moídos ($\varnothing=0,7 \pm 0,2$ mm), uniformemente homogeneizados, misturados e processados em extrusora experimental. Após o processamento, a ração foi seca e a inclusão de lipídios feita por recobrimento, através da aspersão por compressor de ar. Após a preparação das rações, as embalagens contendo as dietas experimentais para o uso imediato foram pesadas e mantidas em refrigerador ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) e alíquotas de 250g foram armazenadas em sacos individuais, ao abrigo de luz e sob

refrigeração (-20⁰C). A composição em ingredientes, composição bromatológica e perfis de ácidos graxos das dietas estão apresentados nas (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 – Composição em ingredientes e bromatológica da dieta basal e composição bromatológica da ração comercial

Ingrediente	Dieta basal	Ração comercial
	----- % -----	
Farelo Soja	52,07	
Amido	14,97	
Farelo de Trigo	12,24	
Farinha de Visceras	6,60	
Óleo	6,00	
Celulose	3,00	
Fosfato bicálcico	2,60	
Glutenose	1,29	
Premix mineral	0,50	
Premix vitamínico	0,50	
Sal comum	0,02	
BHT	0,02	
Composição determinada em nutrientes		
	Ração basal	Ração comercial
Umidade e Voláteis	10,97	12,74
Proteína Bruta	28,57	28,54
Fibra Bruta	5,60	3,03
Extrato Etéreo	6,66	6,02
Matéria Mineral	8,34	9,14
Cálcio	1,27	ni*
Fósforo Total	1,11	ni*

* ni = não informado

Tabela 5 – Conteúdo de lipídios e ácidos graxos n-3 e n-6 dos tratamentos contendo óleo de linhaça, óleo de girassol e sebo bovino, tratamento controle e ração comercial

Trat	Ácido linolêico (C18:2n6c)	Ácido linolênico (C18:3n3)	Gorduras saturadas	Gorduras monoinsaturada	Gorduras polinsaturadas
----- % -----					
Óleo de linhaça					
20	1,76	5,71	1,85	2,68	7,47
40	3,53	11,42	3,69	5,36	14,94
60	5,29	17,13	5,54	8,05	22,41
80	7,05	22,83	7,38	10,73	29,88
100	8,81	28,54	9,23	13,41	37,36
Óleo de girassol					
20	6,37	0,05	1,39	4,18	6,42
40	12,74	0,11	2,78	8,35	12,84
60	19,11	0,16	4,17	12,53	19,27
80	25,48	0,22	5,55	16,70	25,69
100	31,85	0,27	6,94	20,88	32,11
Sebo bovino					
20	0,10	0,32	6,23	5,25	0,42
40	0,20	0,64	12,45	10,51	0,84
60	0,30	0,96	18,68	15,76	1,26
80	0,39	1,29	24,90	21,01	1,68
100	0,49	1,61	31,13	26,27	2,10
Controle	20,02	3,49	10,09	17,33	32,52
Ração Comercial	12,07	0,32	20,48	12,71	1,24

3.3 Avaliação do desempenho zootécnico

Para avaliação do desempenho zootécnico os animais foram submetidos a três biometrias durante o período experimental (inicial, intermediária e final), que consistiram de 24 horas de jejum, anestesia em solução de benzocaína (1:10.000), pesagem e medição dos exemplares para obtenção de dados com os quais foram analisados cinco índices de desempenho zootécnico:

- Peso inicial (PI; g)
- Peso final (PF; g)

- Ganho de peso médio (GP)

$$GP = PF - PI$$

- Conversão Alimentar (CA)

$$CA = R_c / GP$$

sendo:

R_c = total de alimento consumido;

- Taxa de crescimento específico (TCE)

$$TCE = 100 \times [(\ln PF - \ln PI) / t]$$

sendo:

PF = peso final (g);

PI = peso inicial (g);

t = período experimental (dias)

3.4 Análise hematológica

A análise hematológica visou estabelecer, essencialmente, a variação ocorrida na série leucocitária dos animais, através de coletas sanguíneas realizadas aos 45 e aos 85 dias experimentais.

Amostras de sangue de três animais de cada repetição foram coletadas através de punção do vaso caudal utilizando-se seringas plásticas descartáveis previamente umedecidas com solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (10%) em solução salina (0,6%).

Foram avaliados a contagem dos eritrócitos, contagem diferencial de leucócitos e proteína plasmática, conforme descrito a seguir:

Contagem de eritrócitos

Alíquotas de sangue foram diluídas em um tubo de ensaio na proporção 0,02 mL de sangue para 4,0 mL do diluente de Natt e Herrick (1952), homogeneizadas e as células contadas em câmara de Neubauer.

Foram contados os eritrócitos contidos nos 25 quadrados centrais dos dois lados da câmara e o resultado expresso em $\text{Num}_{\text{eritrócitos}}/\text{mm}^3$.

Contagem diferencial de leucócitos

Foram feitas três extensões sanguíneas de cada animal. As lâminas foram então secas ao ar e submetidas à coloração pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em microscópio óptico (40x) sob imersão. Foram contadas 100 células em cada lâmina e o resultado expresso em % de cada tipo celular (linfócito, neutrófilo, monócito, eosinófilo e célula granulocítica especial); em seguida foram calculados o número absoluto de cada tipo de célula com relação ao número total de leucócitos observados (MARTINS et al., 2004).

Proteína total plasmática

Alíquotas de plasma sanguíneo foram separadas por centrifugação das amostras de sangue coletadas. A concentração total de proteína plasmática foi determinada através de um refratômetro portátil (WZ-301/Protein 0,0-12 g.dL⁻¹).

3.5 Desafio bacteriano

Os animais remanescentes foram submetidos ao desafio bacteriano através da exposição ao patógeno *Aeromonas hydrophila*. Os peixes foram submetidos ao aumento na densidade de estocagem e condição de hipóxia subletal por 20 minutos; imediatamente foram expostos à concentração de $1,3 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ da suspensão bacteriana de *A. hydrophila* por mais 20 minutos. Ao final dos procedimentos as condições de renovação de água e aeração foram restabelecidos e os peixes foram

mantidos sob observação por 15 dias para detecção visual de sinais clínicos característicos da bacteriose por *Aeromonas* e registro de eventual taxa de mortandade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores obtidos para os parâmetros de qualidade de água durante o período experimental mantiveram-se dentro dos limites adequados para espécies tropicais ($\mu \pm$ DP): temperatura $26,3 \pm 1,4$ °C; pH $8,05 \pm 0,05$; oxigênio dissolvido (OD) $5,02 \pm 0,87$ mg L⁻¹; condutividade $60,05 \pm 3,8$ mS cm⁻²; e amônia total 0,5 mg L⁻¹ (BALDISSEROTO, 2009), aproximando-se dos valores propostos por Urbinati e Gonçalves (2005) e é cabível afirmar que não afetaram as variáveis de desempenho zootécnico, pois apresentaram valores para OD próximos ao sugerido por Boyd (1996) para ambientes tropicais e acima do proposto por Colt e Montgomery (1991) e NH₃ e NH₄⁺.

A adequação da alimentação, além de permitir a manutenção da qualidade da água, é fator preponderante à melhoria das condições econômicas e ambientais dos sistemas de produção (BUREAU et al., 2006), possibilitando com isso a obtenção de valores satisfatórios nas variáveis peso unitário final, ganho de peso unitário, taxa de conversão alimentar e da taxa de crescimento específico para os tratamentos realizados.

Os dados de desempenho zootécnico, apresentados na tabela 6, apresentaram variância heterogênea e foram rearranjados em grupos de variância, para que em seguida fossem submetidos ao teste de Dunnet, que avalia os contrastes entre a média de um nível e a média do controle (100% óleo de soja).

O óleo de soja é a fonte de lipídios comumente utilizada em rações animais; a adição de OS em dietas para alevinos de surubins *Pseudoplatystoma coruscans* resultou em um aumento de 12% na taxa de crescimento (MARTINO et al., 2002). Entretanto, diferente do relatado por Martino et al. (2002), o desempenho zootécnico do tratamento controle não foi significativamente superior aos demais tratamentos.

Os resultados mostram que para os tratamentos em que foi utilizado o óleo de linhaça (OL) em substituição ao óleo de soja, os melhores resultados nas variáveis de desempenho zootécnico foram dados quando realizada a substituição de 20%. Sendo para o óleo de girassol (OG) e sebo bovino (SB) o nível de 80% a melhor substituição para garantir bons resultados.

Estes resultados contradizem o sugerido por Menoyo (2005), quando afirmou que animais alimentados com dietas isoprotéicas e sem variações nos teores lipídicos totais normalmente não apresentam diferenças na composição química básica, bem como em variáveis de desempenho zootécnico. Este estudo, no entanto, mostrou que estes parâmetros podem ser influenciados tanto pela fonte lipídica como pelo nível de substituição utilizado na elaboração das rações, ainda que em composição total permaneçam iguais.

Os resultados obtidos para os tratamentos formulados com óleo de linhaça como fonte de ácidos graxos da série n-3, demonstram que o nível de substituição de 20% de OL à fonte comumente utilizada (Óleo de soja) apresenta efeito significativo para as variáveis PUf, GPUf e TCEi. As melhores respostas para o primeiro nível de substituição sugerem que, para a fonte de lipídio escolhida, a espécie tem uma preferência em substituição que atenda a um perfil de ácidos graxos da série ômega-3 e ômega-6 em 5,71 e 1,76% respectivamente. O que permite dizer que o ganho de peso pode ser afetado à medida que esta fonte for substituída em maior quantidade na dieta, comprovado pelas variáveis conversão alimentar e ganho de peso que apresentaram valores inferiores aos obtidos para a substituição acima de 20% do óleo de soja pelo óleo de linhaça.

As variáveis conversão alimentar e ganho de peso unitário final corroboram com resultados anteriores obtidos por De Silva et al. (2004), Abery e Silva (2005) e Francis et al. (2006), que revelaram haver uma correlação negativa à medida que o óleo de soja é substituído pelo óleo de linhaça.

Estudos realizados por Satoh et al. (1989) que, utilizando suplementação com óleo de fígado de bacalhau ou óleo de linhaça, em dietas para o bagre do canal, observaram melhores taxas de crescimento quando alimentados com dietas a base de óleo de linhaça. Francis et al. (2007), estudando os efeitos da inclusão de óleo de linhaça e óleo de canola em rações para Bacalhau Murray cod, encontraram o mesmo efeito quando alimentados com a primeira alternativa. Porém, Izquierdo et al. (2003) afirmaram que seria possível fazer uma substituição de até 60% do óleo de peixe pelo óleo de linhaça em dietas para robalo, sem que houvesse prejuízo no crescimento e com isso atendesse a exigência em ácidos graxos da família n-3 para a espécie. Senadheera et

al. (2010) afirmam não haver diferenças positivas nas variáveis de desempenho zootécnico para juvenis de bacalhau ($16,5 \pm 0,42g$) alimentados com uma ração rica em n-3, tendo o óleo de linhaça como fonte para os ácidos graxos.

Estudos recentes e ainda inconsistentes a respeito da exigência em ácidos graxos da série n-3 para o peixes preconizam que o balanceamento correto na oferta de AGs das séries n-3 e n-6 influencia substancialmente a capacidade do animal em alongar e dessaturar EPA e DHA (SOUZA, 2007; ARTS; KOHLER, 2009), e consequentemente na conformação das membranas celulares.

O EPA e o DHA, ácidos graxos da série n-3, tornam as membranas mais flexíveis e favorecem o aumento dos receptores de insulina na superfície da membrana (SILVA et al., 2003) fazendo com que o organismo utilize mais a insulina circulante e, consequentemente, reduza o armazenamento desnecessário de gorduras.

O aumento no perfil dos ácidos graxos, principalmente da série n-3, pode traduzir sinais de “excesso de gordura” e desencadear o processo de lipólise e/ou proteólise no metabolismo do animal e o controle do funcionamento do trato gastrintestinal é importante, pois o processamento do alimento aumenta o gasto energético em cerca de 70% (BALDISSEROTO, 2009). Isso significa dizer que, quando o animal entende que está havendo uma reserva energética, que na verdade não é nada mais que o excesso de ácido graxo não exigido pelo animal (dado pela alteração na composição dos ácidos graxos), o corpo desencadeia um processo de eliminação do excedente, gastando e produzindo energia através da β -oxidação dos ácidos graxos livres, os quais são ativados através da enzima acetil-coA sintetase, processo este que consome cerca de 1 ATP para cada AG ativado (LIMA et al., 2002).

Estudos realizados por Asdari et al. (2011) para avaliar a influência de diferentes fontes lipídicas sobre o desempenho, a utilização de nutrientes e a composição em ácidos graxos do músculo e do fígado de pangassius *Pangasius hypophthalmus*, confirmam o sugerido neste experimento, onde maiores quantidades de ácidos graxos da série n-3 reduzem os índices de desempenho zootécnico, corroborando com a ideia de que o aumento nos níveis de substituição pode causar uma diminuição na efetividade do ganho de peso e da conversão alimentar dos animais alimentados com

as rações contendo níveis crescentes de óleo de linhaça, em função do gasto metabólico.

A variável conversão alimentar mostra mais uma vez que, conforme o aumento na substituição lipídica as variáveis tendem a apresentar uma queda no desempenho zootécnico, uma vez que níveis crescentes de substituição apresentam conversão alimentar individual aumentada, significando uma necessidade maior de ingestão para a deposição muscular.

Indo de contra ao proposto por estudos anteriores, quando fornecida a ração contendo níveis crescentes de substituição do óleo de soja pelo óleo de girassol, as variáveis ganho de peso, taxa de conversão alimentar e a taxa de crescimento específico só foram alteradas significativamente quando as dietas elaboradas tiveram a substituição do óleo de soja pelo óleo de girassol em 80%, sendo seguida de uma queda destas taxas no nível subsequente, característica esta que favorece o aumento da oferta de ácidos graxos da série n-6 aos animais, em favor do melhor desempenho que gera maior interesse para a produção.

Para a variável TCEI Sener et al. (2005) substituíram o óleo de peixe pelo óleo de girassol, e isso não resultou em diferenças estatisticamente significativas na taxa de crescimento específico (TCE) de esturjões russos *Acipenser gueldenstaedtii*. Bransden et al. (2003), encontraram os mesmos resultados quando testado a substituição gradual do óleo de peixe pelo óleo de girassol, para salmões do atlântico *Salmo salar*.

O aumento crescente nas variáveis de desempenho, até o nível de 80% de substituição, pode ser dado em função das fontes lipídicas apresentarem uma boa relação entre AGs das séries n-3 e n-6 e competirem pelas mesmas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação e alongação das cadeias, com maior afinidade pelos ácidos graxos da família n-3, evidenciando assim que, quanto maiores os níveis de n-6 presentes na dieta, associados a pequenas quantidades de AGs n-3, resultarão em melhores conversões dos ácidos graxos, visto que a conversão do ácido alfa-linolênico em AGPI é fortemente influenciada pelos níveis de ácido linoléico na dieta (EMKEN et al., 1994; MARTIN et al., 2006).

Contudo, o último nível de substituição da dieta apresenta uma alta concentração de ácidos graxos da família n-6 e resulta em uma diminuição no ganho de peso dos

animais, o que pode ser explicado em função do excesso de n-6 na dieta em relação ao n-3, já que o perfil de ácidos graxos não conta com o conteúdo de n-3 presente no óleo de soja (fonte básica de substituição). O excesso de n-6 entretanto, pode inibir a conversão dos AGs da família n-3, embora no geral ocorra o contrário (HORROBIN, 1991; SHILS et.al., 2003), e resultar em uma alteração no processo metabólico dos lipídios, que influencia diretamente na deposição de gordura ou síntese de proteína no músculo (JOHNSTON, 2003; TIRAPEGUI, 2006).

Diversos estudos testaram fontes lipídicas de origem vegetal, ricas em n-6, com respostas para desempenho zootécnico geralmente boas, mas com mudanças importantes na composição dos lipídios de carcaça (BELL et al., 2001, 2002; GRISDALE-HELLAND et al., 2002).

Por último, o sebo bovino apresentou um comportamento semelhante ao que foi observado para o óleo de girassol, com o nível ideal de substituição em 80% à fonte padrão e uma queda nos valores de desempenho zootécnico para o último nível, em que o óleo de soja foi totalmente substituído pelo sebo bovino.

A substituição de 80% do óleo de soja pelo sebo bovino foi capaz de promover o melhor ganho de peso para a fonte em estudo, assim como melhores valores para conversão alimentar e as melhores taxas de crescimento específico, em relação ao tratamento controle.

Foi observado o aumento nas taxas de desempenho zootécnico à medida que a fonte controle é substituída pela fonte em estudo, até um ponto em que a inclusão atinge os melhores desempenhos e em seguida apresenta uma diminuição nas taxas, quando a fonte controle é substituída em 100% pelo sebo bovino.

Os resultados obtidos para esta fonte sugerem que o incremento em ganho de peso, a conversão alimentar e a taxa de crescimento específico estão relacionados à sua característica de gordura saturada, o que explica o aumento de peso do animal em função da deposição de gordura visceral. Isto porque a ingestão frequente de gorduras saturadas tende a diminuir a sinalização de saciedade pelo organismo, o que conduz a ingestão descontrolada de alimentos e deposição de gordura, principalmente nos níveis mais elevados de substituição.

Diversas pesquisas mostraram que alterações na ingestão de alimentos e principalmente a composição da dieta e tempo de alimentação têm relação direta com o metabolismo dos hormônios tireoideanos (tiroxina, T₄, e triiodotironina, T₃), pancreáticos (insulina e glucagon) e do crescimento, que incluem o hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), que controlam a ingestão de alimentos e por consequência a incorporação muscular dos nutrientes (MACKENZIE et al., 1998).

Dados estes que são corroborados pelos experimentos realizados por Takeuchi et al. (1978), que identificaram a possibilidade de substituição do sebo bovino nas dietas para carpa e truta arco-íris em níveis de 4 a 6%, com bons resultados para os parâmetros de desempenho zootécnico, desde que associados a uma fonte de AGEs e Craig e Galtin (1995), que afirmaram que alimentados com dietas elaboradas com sebo bovino como fonte energética, Red Drum *Sciaenops ocellatus* apresentaram ganho de peso significativamente maior quando comparado ao tratamento controle por eles realizados.

O que aconteceu no último nível de substituição pode ser explicado em função da ação destes hormônios e do controle da ingestão pelos animais, pois quando acontece a deficiência de nutrientes essenciais ao metabolismo animal ocorre alterações nas concentrações de glicose plasmática, dos aminoácidos no sangue e os ácidos graxos livres atingem valores inferiores aos normais e o centro de alimentação torna-se ativo, resultando na necessidade de ingestão de alimentos, o que desencadeia maior consumo.

Posteriormente, por Sulieman et al. (2000), estudando a influência de lipídios dietéticos sobre o desempenho de tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus* afirmaram que o sebo bovino apresentou melhores resultados quando comparado a outras fontes e Bureau et al. (2008) afirmam em um estudo com trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss* que as gorduras altamente saturadas, como sebo bovino, podem ser usadas para substituir parcialmente o óleo de peixe, sem efeito negativo sobre a digestibilidade e desempenho dos animais. Em contrapartida ao que foi anunciado, Lim et al. (2008) observaram que tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus* alimentadas com diferentes fontes lipídicas de origem animal e vegetal teriam um crescimento mais lento e o ganho

de peso significativamente menor, quando observado o tratamento em que foi utilizado o sebo bovino e comparado às outras fontes.

A substituição de 100% do óleo de soja pelo sebo bovino resulta em uma dieta com baixos índices de ácidos graxos da série n-3 e n-6, apresentando um perfil rico em gorduras altamente saturadas. Esta característica remete ao que foi preconizado por Takeuchi et al. (1978), sobre a necessidade da associação desta gordura a uma fonte de AGEs, pois a deficiência destes nutrientes na dieta leva a um consumo elevado de alimento com o objetivo de suprir esta demanda pelo organismo e o restante, não aproveitado, é eliminado sem que haja a incorporação dos demais nutrientes em razão da não exigência do animal pelo perfil de nutrientes apresentado pela dieta.

Cabe salientar que para todas as fontes testadas, no nível de substituição 100%, onde houve uma evidência maior de ácidos graxos da série n-3, n-6 e gordura saturada, para óleo de linhaça, óleo de girassol e sebo bovino, respectivamente, com uma relação inadequada dos AGs, as variáveis de desempenho foram afetadas.

Estes índices de desempenho são parâmetros capazes de indicar as condições de um sistema de produção e, por consequência, a saúde dos animais (ANDERSON e NEUMANN, 1996) e é na imunidade que os lipídios dietéticos parecem exercer papéis importantes (ROWLEY et al., 1995; BALFRY; HIGGS, 2001; SARGENT et al., 2002), particularmente do que diz respeito à produção de eicosanóides e formação de leucócitos (BELL et al., 1992, 1993), que foi observada através das variações ocorridas nas séries leucocitárias.

A obtenção dos valores referentes às variações ocorridas nas variáveis hematológicas estudadas foram dados a partir das diferenças ocorridas entre a coleta inicial (Tabela 7) e a coleta final (Tabela 8).

Para as diferenças de valores ocorridas nas variáveis leucocitárias dos animais em estudo obteve-se os resultados apresentados na Tabela 9.

Não havendo diferença estatística entre os valores iniciais foi possível determinar ao final quais os tratamentos apresentariam diferenças significativas após o período experimental.

As variáveis sanguíneas da série vermelha são utilizadas no diagnóstico de processos anemiantes (MAHONEY; MCNULTY, 1992; TAVARES-DIAS; MORAES,

2004) e em resposta sistêmica a estímulos externos variados (MOISEENKO, 1998). Alterações osmorregulatórias (BOON et al., 1990; DAVIS, 1995; YILDIZ, 1998) e do leucograma são úteis no diagnóstico de processos infecciosos e parasitários, assim como em respostas à dieta exercida pelo animal (STOSKOPF, 1993; TAVARES-DIAS et al., 1999; RANZANI-PAIVA et al., 2000; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

As quantidades de linfócitos nas amostras dos tratamentos utilizados neste estudo revelam maiores incrementos para o óleo de linhaça, seguido do óleo de girassol e posteriormente do sebo bovino, com significância ($P < 0,05$) para as duas primeiras fontes, corroborando com o proposto por (YILDIRIM-AKSOY et al., 2007) que afirmaram que apenas dietas ricas em n-3 influenciam em maior quantidade na contagem de células brancas de tilápias, quando comparadas às elaboradas com n-6.

Para os tratamentos em que o óleo de linhaça foi utilizado em substituição ao óleo de soja, oferecendo assim ao animal uma ração enriquecida de ácidos graxos da série n-3, as variáveis LINF e NEU apresentam diferenças significativas em relação ao tratamento controle nos níveis 20 e 40%. Porém, o aumento dos linfócitos nos animais alimentados com a fonte rica em n-3 não proporcionou aumento concomitante dos leucócitos totais, apenas recrutou as células para uma função específica que pode ter sido uma resposta do organismo em defesa do metabolismo de ácidos graxos, dada pelo aumento da concentração de n-3 não exigido. Não houve, portanto, a síntese de leucócitos, fato que pode ser explicado pela concentração de ácidos graxos n-3 livres ser capaz de inibir a síntese de DNA destas células (KARSTEN et al., 1994), o que explica o aumento das substituições apresentar uma tendência negativa às variáveis de desempenho zootécnico.

Para os tratamentos em que o óleo de girassol foi utilizado em substituição ao óleo de soja, oferecendo assim ao animal uma ração enriquecida de ácidos graxos da série n-6, os valores referentes ao número total de eritrócitos, número total de leucócitos, proteína plasmática e contagem diferencial de leucócitos estão apresentados na tabela 7, onde é possível observar a ocorrência de diferenças significativas apenas nos valores de número total de leucócitos e de linfócitos.

Para os tratamentos em que o sebo bovino foi utilizado em substituição ao óleo de soja, oferecendo assim ao animal uma ração composta de uma fonte lipídica rica em

gordura saturada, não foram observadas diferenças significativas em qualquer uma das variáveis.

Não houve diferença significativa na contagem de monócitos para todos os tratamentos, indicando que as condições das unidades experimentais foram mantidas dentro dos níveis adequados, sem que isto fosse capaz de interferir nas respostas imunológicas dos animais, já que estas células são caracterizadas por sua atividade fagocitária (ROBERTS, 1981) e que, com qualquer uma das fontes, a substituição não implicará no aumento da produção de monócitos no sangue.

O mesmo aconteceu para a contagem de eritrócitos e para a proteína plasmática, corroborando com estudos realizados para a espécie que mostram não haver influência nestas variáveis quando respeitadas as condições ideais de manejo (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; FUJIMOTO et al., 2007; BITTENCOURT et al., 2009).

Eosinófilos e neutrófilos apresentaram valores mais elevados e com relativa significância nos animais alimentados com fontes lipídicas ricas em omega-3. Representam os leucócitos com maior importância nos peixes, com capacidade fagocítica elevada e sensibilidade às modificações no organismo (MAHAJAN; DHEER, 1979; MATUSHIMA; MARIANO, 1996; SADO; MATUSHIMA, 2007), daí a explicação para a diminuição dos valores de desempenho zootécnico para os tratamentos em que foi utilizado o óleo de linhaça como fonte de ácidos graxos, pois as interferências causadas nos processos metabólicos do animal ocasionaram diminuição no ganho de peso, na taxa de conversão alimentar e conseqüentemente um reflexo nos parâmetros hematológicos.

Após o teste de desafio bacteriano as condições normais de cada unidade experimental foram restabelecidas e, respeitado o período de 24h, foi retomada a alimentação normal dos animais. Desta forma permitiu-se que a condição de reprodução da infecção fosse adequada e as taxas de sobrevivência apresentadas pelos tratamentos estão representadas graficamente na Figura 4.

Passadas as 24h e reiniciada a alimentação foi observado uma redução na resposta alimentar e da atividade natatória, que estendeu-se por 5 dias até que a sintomatologia característica de bacteriose começasse a ser apresentada.

Os peixes acometidos apresentavam sinais característicos de infecção causada por *Aeromonas hydrophila* como hemorragias em nadadeiras e olhos (Figura 5), escurecimento da derme (Figura 6) e degeneração das nadadeiras (Figura 7), intensificando-se até a morte dos animais, que estabilizou-se após 15 dias contados a partir da exposição dos animais à bactéria.

As alterações das variáveis leucocitárias foram fundamentais para explicar os valores obtidos para as taxas de sobrevivência nos tratamentos. Foi registrada maior resistência ao agente patogênico quando os animais foram alimentados com dietas ricas em AGs da série n-6 ($73,21 \pm 11,07\%$ e $96,18 \pm 6,25\%$), do que para dietas contendo OL ($49,38 \pm 9,21$ e $81,25 \pm 7,22\%$) e para SB ($16,67 \pm 6,09$ e $45,83 \pm 9,87\%$). Estes resultados são semelhantes àqueles relatados por Erdal (1991) e Fracalossi e Lovell (1994) que afirmaram a suscetibilidade do Salmão do Atlântico *Salmo salar* e do catfish *Ictalurus punctatus* alimentado com níveis crescentes de AGs n-3, os quais apresentaram reduzidas taxas de sobrevivência quando desafiados *Yersinia ruckeri* e *Edwardsiella ictaluri*, respectivamente.

O aumento considerável dos linfócitos associados aos leucócitos dos animais alimentados com óleo de girassol e a manifestação de resistência dos animais após o desafio bacteriano permitem inferir que os mesmos foram importantes na neutralização ou redução da atividade bacteriana (INGRAM et al., 1990), permitindo a atividade das células fagocitárias e com isso os menores índices de mortandade. Isto reforça o que foi predito por Wu et al. (2002), que mostraram haver uma correlação direta do conteúdo de ácidos graxos com a proliferação de leucócitos e a atividade fagocitária.

Para os tratamentos que utilizaram o sebo bovino como uma fonte de gordura saturada foi possível observar que não houve influência significativa nos parâmetros hematológicos, mesmo não havendo déficit nos valores.

O uso do sebo bovino como uma fonte dietética de lipídios, i.e., gordura saturada, não influenciou positivamente os parâmetros hematológicos ($P > 0,05$). Segundo New (1987) a exemplo dos mamíferos, os peixes não podem sintetizar ácidos graxos das famílias n-3 ou n-6, que devem ser supridos na dieta para se obter crescimento satisfatório e a manutenção do bom estado de saúde. Como o sebo bovino é uma fonte altamente energética e os peixes utilizam os lipídios eficientemente como fonte de

energia (SARGENT et al., 1989), os valores dos parâmetros de desempenho zootécnico não foram afetados e foram próximos aos obtidos para as demais fontes. As variáveis hematológicas, porém, foram comprometidas, o que ocasionou maior suscetibilidade dos animais à bacteriose com índices de sobrevivência inferiores a 50%, com diferença de mais de 27% quando comparado após tratamentos com óleo de girassol e em mais de 4% quando comparado aos tratamentos com óleo de linhaça.

Tabela 6 – Desempenho zootécnico de pacus *Piaractus mesopotamicus* alimentados com diferentes níveis de substituição do óleo de soja das dietas pelos óleos de linhaça e girassol e sebo bovino (PUI = peso unitário inicial; PUf = peso unitário final; GPUf = ganho de peso unitário final; CAI = conversão alimentar individual; TCEi = taxa de crescimento específico)

Substituição	PUI	PUf	GPUf	CAI	TCEi
%	g	g	g		%
TC	14,03±0,223	55,03±0,748	41,27±0,717	1,58±0,140	1,72±0,022
RC**	13,65±0,152	53,65±2,040	39,00±1,998	1,60±0,088	1,69±0,033
Óleo de Linhaça					
20	14,22±0,223	81,91±6,995*	67,69±7,049*	1,01±0,088	2,18±0,129*
40	14,10±0,339	67,70±4,906	53,60±4,950	1,18±0,052	1,96±0,085
60	14,12±0,223	64,68±3,249	50,57±3,250	1,32±0,039	1,90±0,085
80	13,97±0,152	62,50±3,249	48,53±3,250	1,43±0,088	1,87±0,085
100	13,67±0,152	60,61±3,249	46,94±3,250	1,42±0,088	1,86±0,054
Óleo de Girassol					
20	13,82 ± 0,152	61,63 ± 4,906	47,81 ± 4,950	1,45 ± 0,140	1,86 ± 0,129
40	14,02 ± 0,223	61,83 ± 2,040	47,80 ± 1,998	1,32 ± 0,520	1,85 ± 0,054
60	13,94 ± 0,223	65,06 ± 4,906	51,12 ± 4,950	1,43 ± 0,088	1,92 ± 0,085
80	14,08 ± 0,152	82,59 ± 4,906*	67,51 ± 4,950*	1,05 ± 0,088*	2,19 ± 0,085*
100	13,92 ± 0,223	64,17 ± 4,906	50,25 ± 4,950	1,47 ± 0,140	1,90 ± 0,085
Sebo Bovino					
20	13,92±0,152	62,65±4,906	48,73±4,950	1,18±0,052	1,87±0,129
40	14,02±0,084	69,78±6,995	55,76±7,049	1,49±0,222	1,99±0,129
60	14,03±0,223	71,23±2,040	57,20±1,998	1,27±0,052	2,03±0,033
80	14,15±0,152	82,65±4,906*	68,64±4,950*	1,13±0,140*	2,06±0,085*
100	14,07±0,223	72,51±6,995	58,44±7,049	1,15±0,222	2,04±0,129

* diferem do controle (100% óleo de soja) pelo teste Dunnett (P=0,05)

A ração comercial não apresentou diferença significativa do tratamento controle, servindo como um tratamento testemunha aos demais

Tabela 7 – Valores iniciais das variáveis leucocitárias de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* alimentados com diferentes níveis de substituição do óleo de soja por óleo de linhaça, óleo de girassol ou sebo bovino (LEUC = número total de leucócitos LINF = linfócitos)

Trat.	Variáveis Leucocitárias						
	LEUC	LINF	MON μL	NEU	EOS	ERIT $10^6 \mu\text{L}^{-1}$	PT g dL^{-1}
TC	5190 $\pm$ 2044	3416 $\pm$ 1849	433 $\pm$ 110	1025 $\pm$ 235	264 $\pm$ 123	1,67 $\pm$ 0,15	5,68 $\pm$ 0,16
RC	4815 $\pm$ 2044	3395 $\pm$ 1782	479 $\pm$ 149	1179 $\pm$ 374	252 $\pm$ 110	1,71 $\pm$ 0,15	5,82 $\pm$ 0,27
Óleo de linhaça							
OL 20	4959 $\pm$ 2044	3020 $\pm$ 1712	537 $\pm$ 278	1150 $\pm$ 305	257 $\pm$ 110	1,68 $\pm$ 0,15	5,70 $\pm$ 0,21
OL 40	4871 $\pm$ 2044	3077 $\pm$ 1712	489 $\pm$ 149	1189 $\pm$ 374	250 $\pm$ 110	1,87 $\pm$ 0,22	5,64 $\pm$ 0,16
OL 60	5137 $\pm$ 2044	3273 $\pm$ 1872	514 $\pm$ 192	1147 $\pm$ 305	250 $\pm$ 110	1,85 $\pm$ 0,22	5,79 $\pm$ 0,27
OL 80	5083 $\pm$ 2044	3461 $\pm$ 1849	604 $\pm$ 321	1144 $\pm$ 305	279 $\pm$ 123	1,74 $\pm$ 0,20	5,75 $\pm$ 0,21
OL 100	5180 $\pm$ 2044	3145 $\pm$ 1712	576 $\pm$ 321	1101 $\pm$ 305	279 $\pm$ 23	1,78 $\pm$ 0,20	5,70 $\pm$ 0,21
Óleo de girassol							
OG 20	4098 $\pm$ 1995	3044 $\pm$ 1712	445 $\pm$ 110	1113 $\pm$ 305	267 $\pm$ 123	1,71 $\pm$ 0,15	5,77 $\pm$ 0,27
OG 40	4410 $\pm$ 1995	3090 $\pm$ 1712	426 $\pm$ 110	1505 $\pm$ 446	256 $\pm$ 110	1,59 $\pm$ 0,13	5,69 $\pm$ 0,16
OG 60	4242 $\pm$ 1995	3867 $\pm$ 1997	464 $\pm$ 149	1277 $\pm$ 446	242 $\pm$ 110	1,52 $\pm$ 0,13	5,73 $\pm$ 0,21
OG 80	4053 $\pm$ 1995	3998 $\pm$ 1997	450 $\pm$ 110	1165 $\pm$ 305	218 $\pm$ 99	1,65 $\pm$ 0,15	5,80 $\pm$ 0,27
OG 100	4066 $\pm$ 1995	3661 $\pm$ 1920	422 $\pm$ 110	1087 $\pm$ 305	224 $\pm$ 99	1,80 $\pm$ 0,20	5,75 $\pm$ 0,21
Sebo bovino							
SB 20	5089 $\pm$ 2044	3549 $\pm$ 1849	431 $\pm$ 110	1095 $\pm$ 305	275 $\pm$ 123	1,69 $\pm$ 0,15	5,66 $\pm$ 0,16
SB 40	6024 $\pm$ 2142	3506 $\pm$ 1849	456 $\pm$ 110	1253 $\pm$ 374	323 $\pm$ 144	1,83 $\pm$ 0,22	5,87 $\pm$ 0,33
SB 60	6867 $\pm$ 2191	3792 $\pm$ 1920	443 $\pm$ 110	1169 $\pm$ 305	300 $\pm$ 139	1,72 $\pm$ 0,15	5,74 $\pm$ 0,21
SB 80	6629 $\pm$ 2191	3293 $\pm$ 1782	491 $\pm$ 149	1103 $\pm$ 305	275 $\pm$ 123	1,78 $\pm$ 0,20	5,77 $\pm$ 0,27
SB 100	7136 $\pm$ 2191	3533 $\pm$ 1849	493 $\pm$ 149	1229 $\pm$ 374	260 $\pm$ 110	1,92 $\pm$ 0,22	5,79 $\pm$ 0,27

Tabela 8 – Valores finais das variáveis leucocitárias de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* alimentados com diferentes níveis de substituição do óleo de soja por óleo de linhaça, óleo de girassol ou sebo bovino (LEUC = número total de leucócitos; LINF = linfócitos; MON = monócitos; NEU = neutrófilos; EOS = eosinófilos; ERIT = eritrócitos; PT = proteína)

Trat.	Variáveis Leucocitárias						PT g dL ⁻¹
	LEUC	LINF	MON	NEU	EOS	ERIT	
			μL			10 ⁶ μL ⁻¹	
TC	5539 ± 1839	3743 ± 1587	457 ± 96	1046 ± 197	290 ± 117	2 ± 0,26	6 ± 0,19
RC**	5133 ± 1736	3718 ± 1327	506 ± 89	1203 ± 153	278 ± 109	2 ± 0,22	6 ± 0,15
Óleo de linhaça							
OL 20	4959 ± 2207	3020 ± 1637	537 ± 173	1150 ± 574	257 ± 165	1,68 ± 0,13	5,70 ± 0,22
OL 40	4871 ± 2207	3077 ± 1637	489 ± 139	1189 ± 574	250 ± 165	1,87 ± 0,37	5,64 ± 0,26
OL 60	5137 ± 2001	3273 ± 1504	514 ± 156	1147 ± 445	250 ± 97	1,85 ± 0,28	5,79 ± 0,31
OL 80	5083 ± 2001	3461 ± 1504	604 ± 234	1144 ± 445	279 ± 114	1,74 ± 0,19	5,75 ± 0,26
OL 100	5180 ± 2001	3145 ± 1504	576 ± 221	1101 ± 373	279 ± 114	1,78 ± 0,22	5,70 ± 0,14
Óleo de girassol							
OG 20	4098 ± 2001	3044 ± 1536	445 ± 127	1113 ± 305	267 ± 114	1,71 ± 0,19	5,77 ± 0,31
OG 40	4410 ± 2069	3090 ± 1536	426 ± 116	1505 ± 574	256 ± 114	1,59 ± 0,34	5,69 ± 0,26
OG 60	4242 ± 2001	3867 ± 1570	464 ± 139	1277 ± 373	242 ± 97	1,52 ± 0,34	5,73 ± 0,35
OG 80	4053 ± 2001	3998 ± 1570	450 ± 127	1165 ± 305	218 ± 97	1,65 ± 0,16	5,80 ± 0,22
OG 100	4066 ± 2207	3661 ± 1637	422 ± 127	1087 ± 305	224 ± 97	1,80 ± 0,31	5,75 ± 0,33
Sebo bovino							
SB 20	5850 ± 2001	4310 ± 1504	455 ± 116	1129 ± 305	296 ± 133	1,67 ± 0,34	5,81 ± 0,19
SB 40	6498 ± 2069	3980 ± 1504	482 ± 127	1281 ± 373	353 ± 165	1,89 ± 0,31	5,92 ± 0,31
SB 60	7779 ± 2144	4703 ± 1536	467 ± 116	1182 ± 305	324 ± 148	1,76 ± 0,19	5,84 ± 0,22
SB 80	8091 ± 2144	4756 ± 1536	506 ± 139	1141 ± 305	298 ± 133	1,81 ± 0,22	6,05 ± 0,35
SB 100	7471 ± 2144	3868 ± 1504	515 ± 139	1257 ± 373	287 ± 114	1,94 ± 0,37	5,87 ± 0,22

Tabela 9 – Diferenças observadas nos valores das variáveis leucocitárias de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* alimentados com diferentes níveis de substituição do óleo de soja por óleo de linhaça, óleo de girassol ou sebo bovino (LEUC = número total de leucócitos; LINF = linfócitos; MON = monócitos; NEU = neutrófilos; EOS = eosinófilos; ERIT = eritrócitos; PT = proteína)

Trat.	Variáveis Leucocitárias						
	LEUC	LINF	MON μL	NEU	EOS	ERIT $10^6 \mu\text{L}^{-1}$	PT g dL^{-1}
TC	349,00 $\pm$ 94,481	327,00 $\pm$ 70,127	24,13 $\pm$ 8,067	21,38 $\pm$ 4,981	26,00 $\pm$ 1,753	0,05 $\pm$ 0,006	0,08 $\pm$ 0,035
RC	318,25 $\pm$ 95,180	323,38 $\pm$ 82,307	27,38 $\pm$ 8,067	24,36 $\pm$ 4,981	25,63 $\pm$ 2,759	0,03 $\pm$ 0,013	0,10 $\pm$ 0,035
Óleo de linhaça							
OL 20	4367,13 $\pm$ 256,700	5306,13 $\pm$ 636,200*	13,63 $\pm$ 5,078	464,75 $\pm$ 42,638*	112,75 $\pm$ 4,551*	0,04 $\pm$ 0,046	0,13 $\pm$ 0,227
OL 40	4104,00 $\pm$ 256,700	4608,13 $\pm$ 237,260*	7,38 $\pm$ 0,515	409,25 $\pm$ 42,638*	126,12 $\pm$ 8,280*	0,08 $\pm$ 0,008	0,25 $\pm$ 0,133
OL 60	951,75 $\pm$ 256,700	983,63 $\pm$ 97,225*	11,38 $\pm$ 3,212	179,63 $\pm$ 63,586	7,75 $\pm$ 1,753*	0,02 $\pm$ 0,021	0,13 $\pm$ 0,101
OL 80	980,13 $\pm$ 256,700	434,5 $\pm$ 166,970	30,13 $\pm$ 10,707	186,13 $\pm$ 63,586	12,50 $\pm$ 1,753*	0,02 $\pm$ 0,013	0,15 $\pm$ 0,133
OL 100	557,00 $\pm$ 155,180	357,75 $\pm$ 166,970 *	29,38 $\pm$ 18,561	132,13 $\pm$ 42,638	11,63 $\pm$ 2,759*	0,03 $\pm$ 0,008	- 0,30 $\pm$ 0,101
Óleo de girassol							
OG 20	1921,13 $\pm$ 155,180*	1851,75 $\pm$ 237,260*	37,00 $\pm$ 5,078	19,50 $\pm$ 2,021	19,00 $\pm$ 2,759	0,06 $\pm$ 0,021	0,18 $\pm$ 0,133
OG 40	2339,00 $\pm$ 256,700*	1936,5 $\pm$ 166,970*	33,25 $\pm$ 8,067	24,50 $\pm$ 9,136	23,25 $\pm$ 0,490	0,09 $\pm$ 0,021	0,20 $\pm$ 0,101
OG 60	1735,25 $\pm$ 94,480*	1964,63 $\pm$ 237,260*	38,25 $\pm$ 5,078	15,38 $\pm$ 3,182	12,63 $\pm$ 1,753	0,10 $\pm$ 0,021	0,63 $\pm$ 0,133
OG 80	1986,00 $\pm$ 256,700*	1964,13 $\pm$ 413,550*	37,50 $\pm$ 3,212	10,88 $\pm$ 3,182	20,75 $\pm$ 4,551	0,08 $\pm$ 0,034	0,03 $\pm$ 0,227
OG 100	5024,13 $\pm$ 472,630*	4860,25 $\pm$ 237,260*	71,00 $\pm$ 18,561	0,25 $\pm$ 11,627	16,38 $\pm$ 2,759	0,09 $\pm$ 0,021	0,25 $\pm$ 0,133
Sebo bovino							
SB 20	761,13 $\pm$ 166,970	470 $\pm$ 166,970	23,63 $\pm$ 3,212	34,25 $\pm$ 9,136	21,13 $\pm$ 2,759	- 0,02 $\pm$ 0,034	0,15 $\pm$ 0,133
SB 40	474 $\pm$ 58,768	454 $\pm$ 97,225	26,13 $\pm$ 5,078	27,63 $\pm$ 11,627	30,50 $\pm$ 0,490	0,06 $\pm$ 0,021	0,05 $\pm$ 0,035
SB 60	912 $\pm$ 58,768	286 $\pm$ 97,225	24,00 $\pm$ 5,078	13,38 $\pm$ 3,182	23,63 $\pm$ 2,759	0,04 $\pm$ 0,008	0,10 $\pm$ 0,035
SB 80	1461 $\pm$ 41,603	558 $\pm$ 413,550	14,75 $\pm$ 0,947	37,63 $\pm$ 11,627	22,63 $\pm$ 2,759	0,03 $\pm$ 0,013	0,28 $\pm$ 0,133
SB 100	335 $\pm$ 94,481	349 $\pm$ 70,127	21,63 $\pm$ 5,078	27,88 $\pm$ 9,136	27,25 $\pm$ 2,759	0,02 $\pm$ 0,013	0,08 $\pm$ 0,629

* diferem do controle (100% óleo de soja) pelo teste Dunnett (P=0,05)

A ração comercial não apresentou diferença significativa do tratamento controle, servindo como um tratamento testemunha aos demais

Figura 3 – Taxas de sobrevivência nos tratamentos de acordo com a fonte dietética e nível de substituição na ração

Figura 4 – Hemorragia nas nadadeiras e olhos de pacu *Piaractus mesopotamicus* desafiados com a bactéria *Aeromonas hydrophila*

Figura 5 - Escurecimento da derme de pacus *Piaractus mesopotamicus* desafiados com a bactéria *Aeromonas hydrophila*

Figura 6 - Degeneração das nadadeiras de pacus *Piaractus mesopotamicus* desafiados com a bactéria *Aeromonas hydrophila*

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E INFERÊNCIAS

Foi possível observar que as diferentes fontes lipídicas afetaram significativamente os parâmetros hematológicos dos animais, influenciando diretamente na capacidade do animal de resistir a uma bacteriose.

Como indicações práticas, este trabalho propõe a substituição de 80% do óleo de soja pelo óleo de girassol em rações para juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus*, que propicia melhores taxas de desempenho e alterações positivas nos parâmetros hematológicos o que resulta em elevados índices de sobrevivência após a exposição à bactéria *Aeromonas hydrophila* e recomenda cautela no uso do sebo bovino por se tratar de uma fonte lipídica rica em gorduras saturadas, que interfere no metabolismo animal, ocasionando alta suscetibilidade e as maiores taxas de mortandade quando os animais são expostos à bactéria.

REFERÊNCIAS

ABERY, N.W.; DE SILVA, S.S. Performance of Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell) in response to different feeding schedules. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, p. 472–478, 2005.

ALBERTAZZI, P.; COUPLAND, K. Polyunsaturated fatty acids. Is there a role in postmenopausal osteoporosis prevention? **Maturitas**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 13-22, 2002.

ALCORN, S.W.; PASCHO, R.J.; MURRAY, A.L.; SHEARER, K.D. Effects of ration level on immune function in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Aquaculture**, Oxford, v. 217, p. 529-545, 2003.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society**. Champaign: AOCS Press; 1998. 1345p.

ANDERSON, D.P. Immunostimulants, vaccines, and environmental stressor in aquaculture: NBT assays to show neutrophil activity by these immunomodulators. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 7., 2004, Hermosillo. **Avances em nutrición acuícola**. Hermosillo, 2004. p. 320-328.

ANDERSON, R.O.; NEUMANN, R.M. Length, weight, and associated structures. In: MURPHY, B.R.; WILLIS, D.W. (Ed.). **Fisheries techniques**. 2nd ed. Bethesda: American Fisheries Society, 1996. p. 447-481.

ARTS, M.T.; KOHLER, C.C. Health and condition in fish: the influence of lipids on membrane competency and immune response. In: _____. **Lipids in aquatic ecosystems**. New YorkYork: Springer, 2009. 395p.

ASDARI, R.; ALIYU-PAIKO, M.; HASHIM, R. Effects of different dietary lipid sources in the diet for *Pangasius nasutus* (Bleeker, 1863) juveniles on growth performance, feed efficiency, body indices and muscle and liver fatty acid compositions. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 17, p. 44-53, 2011.

AUSTIN, B. Human disease associated with fish culture. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 58, n. 5, p. 190-195, 1980.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 2. ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2009. 212 p.

BALFRY, S.K.; HIGGS, D.A. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. In: LIM, C.; WEBSTER, C.D. (Ed.). **Nutrition fish health**. New York: Haworth Press, 2001. p. 213-225.

BARJA, J.L.; ESTEVES, A.T. **Patologia en acuicultura**. Espanha: Caicyt, 1988. 550 p.

BARTON, A.B. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 42, p. 517-525, 2002.

BELÉM-COSTA, A.B.; CYRINO, J.E.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 3, p. 281-284, 2006.

BELL, J.G.; SARGENT, J.R.; RAYNARD, R.S. Effects of increasing dietary linoleic acid on phospholipid fatty acid composition and eicosanoid production in leucocytes and gill cells in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Edinburgh, v. 45, p. 197-206, 1992.

BELL, J.G.; DICK, J.R.; McVICAR, A.H.; SARGENT, J.R.; THOMPSON, K.D. Dietary sunflower, linseed, and fish oils affect phospholipid fatty acid composition, development of cardiac lesions, phospholipase activity, and eicosanoid production in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Edinburgh, v. 49, p. 665-673, 1993.

BELL, J.G.; MCEVOY, J.; TOCHER, D.R.; MCGHEE, F.; CAMPBELL, P.J.; SARGENT, J.R. Replacement of fish oil with rape seed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, p. 1535-1543, 2001.

BELL, J.G.; HENDERSON, R.J.; TOCHER, D.R.; MCGHEE, F.; DICK, J.R.; PORTER, A.; SMULLEN, R.; SARGENT, J.R. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue fatty acid compositions and hepatic fatty acid metabolism. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 132, p. 222-230, 2002.

BENOIT, S.C.; KEMP, C.J.; ELIAS, C.F.; ABPLANALP, W.; HERMAN, J.P.; MIGRENNE, S.; LEFEVRE, A.L.; CRUCIANI-GUGLIELMACCI, C.; MAGNAN, C.; YU, F.; NISWENDER, K.; IRANI, B.G.; HOLLAND, W.L.; CLEGG, D.J. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v.119, p.2577-2589, 2009.

BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y.; CYRINO, J.E.P. Growth and haematology of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, fed diets with varying protein to energy ratio. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 40, p. 486-495, 2008.

BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A.; SIGNOR, A.A.; BOSCOLO, W.R.; LORENZ, E.K.; MALUF, M.L.F. Parâmetros eritrocitários e glicose sanguínea do pacu *Piaractus mesopotamicus* cultivado em tanque-rede estocado em diferentes densidades. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** Água de Lindóia: Editora Lawbook, 2009. p. 1-4.

BLAZER, V.S. Piscine macrophage function and nutritional influences: a review. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 3, n. 2, p. 77-86, 1991.

_____. Nutrition and disease resistance in fish. **Annual Review of Fish Diseases**, Amsterdam, v. 2, p. 309-323, 1992.

BOON, J.H.; CANNAERTS, V.M.H.; AUGUSTIJN, H.; MACHIELS, M.A.M.; DECHARLEROY, D.; OLLEVIER, F. The effect of different infection levels with infective larvae of *Anguillicola crassus* on haematological parameters of European eel (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 87, p. 243-253, 1990.

BORGHETTI, J.R.; CANZI, C. The effect of water temperature and feeding rate on the growth rate of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) raised in cages. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 114, p. 93-101, 1993.

BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. **Aquicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo**. Curitiba: GIAEA, 2003. 128 p.

BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Auburn: The Author, 1996. 482 p.

BOYD, C.E.; QUEIROZ, J.F. Manejo das condições do sedimento do fundo e da qualidade da água e dos efluentes de viveiros. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 3, p. 25-44.

BRANDSEN, M.P.; CARTER, C.G.; NICHOLS, P.D. Replacement of fish oil with sunflower oil in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effect on growth performance, tissue fatty acid composition and disease resistance. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 135 B, p. 611-625, 2003.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Produção pesqueira e aquícola: Estatística 2008 e 2009**. Brasília, 2010.

BRUNETTO, M.A.; GOMES, M.O.S.; JEREMIAS, J.T.; OLIVEIRA, L.D.; CARCIOFI, A.C. Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, supl. 2, p. 230-232, 2007.

BUREAU, D.P.; HUA, K.; CHO, C.Y. Effect of feeding level on growth and nutrient deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) growing from 150 to 600 g. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 37, n. 11, p. 1090-1098, 2006.

BUREAU, D.P.; HUA, K.; HARRIS, A.M. The effect of dietary lipid and long-chain n-3 PUFA levels on growth, energy utilization, carcass quality, and immune function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of the World Aquaculture Society**. Baton Rouge, v. 39, p. 1-21, 2008.

CALDER, R.C. Dietary fatty acids and the immune system. **Lipids**, Berlin, v. 34, p. 137-140, 1998.

CANNON, W. Stress and strains of homeostasis. **American Journal of the Medical Sciences**, Philadelphia, v. 189, p. 1-4, 1935.

CARNEIRO, D.J. **Efeito da temperatura na exigência de proteína e energia em dietas para alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887)**. 1990. 55 p. Tese (Doutorado em Ecologia) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1990.

CASTAGNOLLI, N. Status of aquaculture in Brazil. **World Aquaculture**, Amsterdam, v. 26, p. 35-39, 1995.

_____. Estado da arte da aquicultura brasileira. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATTI, E.C.; FRACALLOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 1-6.

CECCARELLI, P.S.; ROCHA, R.C.G.A. **Principais enfermidades de peixes tropicais e respectivos controles**. Lavras: UFLA; FAEPE, 2001. 91 p.

CHAGAS, E.C.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; MASSAGO, H.; FABREGAT, T.E.H.P. Suplementos na dieta para manutenção da saúde de peixes. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes de cultivo**. Macapá: Embrapa Macapá, 2009. p. 132-225.

CHEN, H.H.; XU, S.Y.; WANG, Z. 2006. Gelation properties of flaxseed gum. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 295-303, 2006.

CHOO, W.S.; BIRCH, J.; DUFOUR, J.P. Physiochemical and quality characteristics of cold pressed flaxseed oils. **Journal of Food composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3/4, p. 202-211, 2007.

COLT, J.; MONTGOMERY, J.M. Aquaculture production system. **Journal of Animal Science**, Illinois, v. 69, p. 4183-4192, 1991.

COSTA, A.B. Bacterioses em piscicultura: manejo e prevenção. In: MATTOS, W.R.S. et al. (Ed.). **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia; FEALQ, 2001. p. 551-558.

CRAIG, R.S.; GALTIN, D.M. Coconut oil and beef tallow, but not tricaprylin, can replace menhaden oil in the diet of red drum (*Sciaenops ocellatus*) without adversely affecting growth or fatty acid composition. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 12, p. 3041-304, 1995.

CUNNANE, S.C.; GANGULI, S.; MENARD, C.; LIEDE, A.C.; HAMADEH, M.J.; CHEN, Z. High alfa-linolenic acid flaxseed: some nutritional properties in humans. **British Journal of Nutrition**, London, v. 69, n.2, p. 443-453, 1993.

CYRINO, J.E.P.; BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K. A nutrição de peixes e o ambiente. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 1., 2005, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, 2005. p. 103-120.

DAVIS, S.W. Values for selected serum analytes during experimental *Ichthyophthirius multifiliis* infection of channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 7, p. 262-264, 1995.

DE SILVA, S.S.; GUNASEKERA, R.M.; INGRAM, B.A. Performance of intensively farmed Murray cod *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell) fed newly formulated vs. currently used commercial diets, and a comparison of fillet composition of farmed and wild fish. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 35, p. 1039-1052, 2004.

DUGENCI, S.K.; CANDAN, A. Isolation of Aeromonas strains from the intestinal flora of Atlantic salmon (*Salmo salar* L. 1758). **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, Ankara, v. 27, p. 1071-1075, 2003.

EMKEN, E.A.; ADLOF, R.O.; GULLEY, R.M. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1213, n. 3, p. 277-288, 1994.

ENDREAS, S.; GHORBANI, R.; KELLEY, V.E.; GEORGILIS, K.; LONEMANN, G.; VAN DER MEER, J.M.V.; CANNON, J.G.; ROGERS, T.S.; KLEMPNER, M.S.; WEBER, P.C.; SCHAEFFER, E.J.; WOLFF, M.S.; DINARELLO, C.A. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cell. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 320, p. 265-271, 1989.

ERDAL, J.I.; EVENSEN, O.; KAURSTAD, O.K.; LILLEHAUG, A.; SOLBAKKEN, R.; THORUD, K. Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 98, p. 363-379, 1991.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed. Oxford: Blackwell, 2000. 1347 p.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza, 2000. 1258 p.

FERREIRA, A.F.; ANDREOTTI, M.O.; CARRIJO, A.S.; SOUZA, K.M.R.; FASCINA, V.B.; RODRIGUES, E.A. Valor nutricional do óleo de soja, sebo bovino e de suas combinações em rações para frangos de corte. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 27, n. 2, p. 213-219, 2005.

FRACALOSSI, D.M. Doenças nutricionais em peixes. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2., 1998, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1998. p. 97-124.

FRACALOSSI, D.M.; LOVELL, R.T. Dietary lipid sources influence responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to challenge with the pathogen *Edwardsiella ictaluri*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 119, n. 2/3, p. 287-298, 1994.

FRANCIS, D.S.; TURCHINI, G.M.; JONES, P.L.; DE SILVA, S.S. Effects of dietary oil source on the growth and muscle fatty acid composition of Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 253, p. 547-556, 2006.

_____. Growth performance, feed efficiency and fatty acid composition of juvenile Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*, fed graded levels of canola and linseed oil. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 13, p. 335-350, 2007.

FUJIMOTO, R.Y.; CASTRO, M.P.; MARTINS, M.L.; MOARES, F.R.; MONFORT, K.C.F. Parâmetros sanguíneos de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) alimentados com dietas suplementadas com cromo trivalente em duas densidades de estocagem. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 29, n. 4, p. 465-471, 2007.

GAIOTTO, J.B.; MENTEN, J.F.M.; RACANICCI, A.M.C.; IAFIGLIOLA, M.C. Óleo de soja, óleo ácido de soja e sebo bovino como fontes de gordura em rações de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 2, n. 3, p. 219-228, 2000.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 180, p. 147-165, 1999.

GATLIN, D.M. Nutrition and fish health. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W. (Ed.). **Fish nutrition**. 3rd ed. Washington: University of Washington, 2002. p. 671-702.

GRISDALE-HELLAND, B.; RUYTER, B.; ROSENLUND, G.; OBACH, A.; HELLAND, S.J.; SANDBERG, M.G.; STANDAL, H.; ROJO, C. Influence of high contents of dietary soybean oil on growth, feed utilization, tissue fatty acid composition, heart histology and standard oxygen consumption of Atlantic salmon (*Salmo salar*) raised at two temperatures. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 207, p. 311-329, 2002.

GUIMARÃES, A.R.; KUGA, E.; GLAUZ, E.; RAUCZ, K. Metabolic changes in lymphoid organs as induced by fatty acids-rich diets during ageing. **Physiology & Behavior**, Flushing, v. 55, p.691-697, 1995.

HENDERSON, R.J.; TOCHER, D.R. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. **Progress Lipid Research**, Amsterdam, v. 26, p. 281-347, 1987.

HORROBIN, D.F. Interactions between n-3 and n-6 essential fatty acids (EFAs) in the regulation of cardiovascular disorders and inflammation. Prostaglandins Leukotrienes **Essential Fatty Acids**, Edinburgh, v. 44, p. 127-131, 1991.

HOVDA, M.B.; LUNESTAD, B.T.; ROSNES, R.F.J.T. 2007. A Molecular characterization of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 272, p. 581-588, 2007.

INGRAM, B.A.; BARLOW, C.G.; BURCHMORE, J.J.; GOOLEY, G.J.; ROWLAND, S.J.; SANGER, A.C. Threatened native freshwater fishes in Australia-some case histories. **Journal of Fish Biology**, London, v. 37, suppl. A, p. 175-182, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Abate de animais, produção de leite, couro e ovos**. 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_200902_1.shtm>. Acesso em: 23 jun. 2011.

IZQUIERDO, M.S.; OBACH, A.; ARANTZAMENDI, L.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; ROSENLUND, G. Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 9, p. 397-407, 2003.

JOHNSTON, L.J.; NOLL, S.; RENTERIA, A.; SHURSON, J. Feeding by-products high in concentration of fiber to nonruminants. In: NATIONAL SYMPOSIUM ON ALTERNATIVE FEEDS FOR LIVESTOCK AND POULTRY, 3., 2003, Kansas. **Proceedings...** Kansas, 2003. p. 169-186.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B.; PORTELLA, M.C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 222, p. 277-287, 2003.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; GERALDO-MARTINS, M.I.E.; PORTELLA, M.C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems, **Aquaculture**, Amsterdam, v. 234, p. 175-183, 2005.

KALASHNIKOVA, Z.M. On the classification of morphological elements in the blood fish. **Journal of Ichthyology**, Silver Spring, v. 3, n. 16, p. 459-472, 1976.

KARSTEN, S.; SCHAFFER, G.; SCHAUDER, P. Cytokine production and DNA synthesis by human peripheral lymphocytes in response to palmitic, stearic, oleic, and linoleic acid. **Journal of Cellular Physiology**, New York, v. 161, p. 15-22, 1994.

KLASING, K.C.; KNIGHT, C.D.; FORSYTH, D.M. Effects of iron on the anti-coil capacity of sow's milk and in ligated intestinal segments. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 110, p. 1914-1921, 1980.

KOOLMAN, J.; ROEHM, K-H. **Color atlas of biochemistry**. 2nd ed. New York: Thieme, 2005 467 p.

KUMARI, J.; SAHOO, P.K. Dietary β -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 29, p. 95-101, 2006.

LALL, S.P. Nutrition and health of fish. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2003, Mérida. **Avances em nutrição aquícola: memórias...** Mérida, 2000. p. 13-23.

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

LI, M.H.; MANNING, B.B.; ROBINSON, D.E.H. Effect of daily feed intake on feed efficiency of juvenile channel catfish. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 66, p. 100-104, 2004.

LIM, L.; YILDIRIM-AKSOY, M.; DAVIS, D.A.; KLESNIUS, P. Effects of varied dietary lipid sources tested in tilapia study, **Global Aquaculture Advocate**, Auburn, v. 11, p. 68-70, 2008.

LIMA, F.B.; VESTRI, H.S.; VESTRI, S.; MORAES, S.M.F.D. Lipólise. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, E.J. (Ed.). **Entendendo a gordura. Os ácidos graxos**. Barueri: Manole, 2002. v. 1, p. 35-41.

LIMA, L.C.; RIBEIRO, L.P.; LEITE, R.C.; MELO, D.C. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p. 113-117, 2007.

LODEMEL, J.B.; MAYHEW, T.M.; MYKLEBUST, R.; OLSEN, R.E.; ESPELID, S.; RINGO, E. Effect of three dietary oils on disease susceptibility in arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) during cohabitant challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, p. 935-945, 2001.

MACEDO-VIEGAS, E.M.; CONTRERAS-GUZMAN, E. Effect of source and levels of dietary lipids on growth, body composition, and fatty acids of the tambaqui (*Colossoma macropomum*). **World Aquaculture**, Amsterdam, v. 29, p. 66-70, 1998.

MACKENZIE, K. Presumptive mycobacteriosis in northeast Atlantic mackerel, *Scomber scombrus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 32, p. 263-275, 1988.

MAHAJAN, C.L.; DHEER, J.C. Cell types in the peripheral blood of an air-breathing fish *Channa punctatus*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 14, p. 481-487, 1979.

MAHONEY, J.B.; McNULTY, J.K. Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan estuary. **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 121, p. 261-268, 1992.

MAKI, P.A.; NEWBERNE, P.M. Dietary lipids and immune function. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 122, n. 3, p. 610-614, 1992.

MANRAL, M.; PANDEY, M.C.; JAYATHILAKAN, K.; RADHAKRISHNA, K.; BAWA, A.S. Effect of fish (*Catla catla*) fring on the quality characteristics of sunflower oil. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 106, p. 634-639, 2008.

MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R.; VISENTAINER, J.E.L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MARTINO, R.C.; CYRINO, J.E.P.; PORTZ, L.; TRUGO, L.C. Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) fed diets with animal and plant lipids. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 209, p. 233-246, 2002.

_____. Performance, carcass composition and nutrient utilization of surubim *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz) fed diets with varying carbohydrate and lipid levels. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 11, p. 131-137, 2005.

MARTINS, M.L.; NOMURA, D.T.; MYIAZAKI, D.M.Y.; PILARSKY, F.; RIBEIRO, K.; CASTRO, M.P.; CAMPOS, C.F.M. Physiological and haematological response of *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) exposed to single and consecutive stress of capture. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 4, p. 449-456, 2004.

MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.

MAYER, G. Microbiology and Immunology. In: MALE, M.A.D.; BROSTOFF, M.A.J.; FRCPATH, D.R.; ROITT, I.M.A. (Ed.). **Immunology**. 7th ed. London: University of South Carolina School of Medicine, 2006. chap. 1, p. 19-28.

McPHEARSON, R.M.; DePAOLA, A.; ZYWNO, S.R.; MOTES Jr., M.L.; GUARINO, A.M. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 99, p. 203-211, 1991.

MELO, J.F.B.; RADÜNZ-NETO, J.; SILVA, J.H.S.; TROMBETTA, C.G. Desenvolvimento e composição corporal de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes fontes de lipídios. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 323-327, 2002.

MENOYO, D.; LOPEZ-BOTE, C.J.; OBACH, A.; BAUTISTA, J.M. Effect of dietary fish oil substitution with linseed oil on the performance, tissue fatty acid profile, metabolism, and oxidative stability of Atlantic salmon. **Journal of Animal Science**, Illinois, v. 83, p. 2853-2862, 2005.

MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C.; MEHER, P.K. The immunomodulatory effects of tuftsin on the non-specific immune system of Indian Major carp, *Labeo rohita*. **Fish & Shellfish immunology**, Oxford, v. 20, p. 728-738, 2006.

MOISEENKO, T.I. Hematological indices of fishes in the evaluation of their toxicoses with reference to *Coregonus lavaretus*. **Journal of Ichthyology**, Moscow, v. 38, n. 4, p. 315-324, 1998.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Dordrecht, v. 9, p. 211-268, 1999.

MONTERO, D.; KALINOWSK, T.; OBACH, A.; ROBAINA, L., TORT, L.; CABALLERO, M.J.; IZQUIERDO, M.S. Effect of dietary vegetable lipid sources in gilthead seabream (*Sparus aurata*) immune status and stress resistance. **Cahiers Options Méditerranéennes**, Rue newton, French, v. 225, p. 353-370, 2005.

MOREIRA, A.B.; VISENTAINER, J.B.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M. Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian Brycon freshwater fishes. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 14, n. 6, p. 565-574, 2001.

NARAYAN, B.; MIYASHITA, K.; HOSAKAWA, M. Physiological effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA): a review. **Food Reviews International**, London, v. 22, p. 291-307, 2006.

NATT, M.P.; HERRICK, C.A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, Champaign, v. 31, p. 735-738, 1952.

NEW, M.B. **Feed and feeding of fish and shrimp**. Rome: UNDP; FAO, ADCP/REP/87/26, 1987. 275 p.

OBA, E.T.; MARIANO, W.S.; SANTOS, L.R.B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: TAVARES- DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: EMBRAPA Macapá, 2009. cap. 8, p. 236-246.

ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 434 p.

OLIVEIRA, A.C.B.; MARTINELLI, L.A.; MOREIRA, M.Z.; CYRINO, J.E.P. Determination of apparent digestibility coefficient in fish by stable carbon isotopes. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 14, p. 10-13, 2008.

OLIVEIRA, F.L.C. Ômega 3. **Temas de Nutrição em Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 3, p. 24-27, 2004.

OSTRENSKY, A.; BORGETTI, J.R.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: FAO, 2008. 276 p.

OWEN, J.M.; ADRON, J.W.; MIDDLETON, C.; COWEY, C.B. 1975. Elongation and desaturation of dietary fatty acids in turbot *Scophthalmus maximus* L., and rainbow trout *Salmo gairdnerii* rich. **Lipids**, Berlin, v. 10, n. 9, p. 528-531, 1975.

OZÓRIO, R.O.A.; AVNIMELECH, Y.; CASTAGNOLLI, N. Sistemas intensivos fechados de produção de peixes. In: CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALOSSO, D.M., CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 2, p. 7-24.

PABLO, M.A.; CIENTIFUEGOS, G.V. Biological and clinical significance of lipids and modulators of immune functions. **Clinical Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, p. 945-950, 2002.

PAI, V.D.; PAI-SILVA, M.D.; CARVALHO, E.D.; FUJIHARA, C.Y.; GREGÓRIO, E.A.; CURI, P.R. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of the pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei). **Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series**, Berlin, v. 29, p. 283-289, 2000.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; MAGALHÃES, A.R.M. Sanidade de peixes, rãs, crustáceos e moluscos. In: VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. (Ed.). **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq, 2000. cap. 6, p. 197-245.

PEMBERTON, J.M.; KIDD, S.P.; SCHMIDT, R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 1-10, 1997.

PEZZATO, L.E. **Efeito de diferentes níveis de gordura de origem e vegetal sobre o desempenho e deposição de ácidos graxos em pacu, *Piaractus mesopotamicus***. 1990. 91 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 1990.

PLAUT, M. The role of cyclic AMP in modulating cytotoxic T Lymphocytes: In vivo generated cytotoxic lymphocytes, but not in vitro generated cytotoxic lymphocytes, are inhibited by cyclic AMP-active agents. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 123, p. 692-701, 1979.

PLUMB, J.A.; HANSON, L.A. **Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes**. 3rd ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. 492 p.

POMPÉIA, C.; LOPES, L.R.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J.; SANNOMIYA, P.; CURI, R. Effect of fatty acids on leukocyte function. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 33, n. 11, p. 1255-68, 2000.

POND, M.J.; STONE, D.M.; ALDERMAN, D.J. Comparison of conventional and molecular techniques to investigate the flora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 261, p. 194-203, 2006.

PORTELLA, M.C.; VERANI, J. R; CARNEIRO, D. J.; CESTAROLLI, M. A. Use of live and artificial diets enriched with several fatty acid sources to feed *Prochilodus scrofa* larvae and fingerlings. 1. Effects on survival and growth. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, New York, v. 15, p. 45-58, 2000.

PRICE, J.F.; SCHWEIGERT, B.S. **Ciencia de la carne y de los productos cárnicos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1994. 582p.

PUSHKAREVA, M.A.; TURUTIN, D.V.; SUD'INA, G.F. Regulation of leukotriene synthesis by arachidonic acid in human polymorphonuclear leukocyte adhesive interactions is dependent on the presence of albumin. **Cell Biology International**, London, v. 26, n. 11, p. 993-1002, 2002.

RAA, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Mérida. **Avances em nutrição acuícola...** Mérida, 2000. p. 47-56.

RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F.H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, p. 261-266. 2003.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T.; PAVANELLI, G.C.; TAKEMOTO, R.M. Hematological characteristics and relative condition factor (Kn) associated with parasitism in *Schizodon borellii* (Osteichthyes, Anostomidae) and *Prochilodus lineatus* (Osteichthyes, Prochilodontidae) from Paraná river, Paraná, Brazil. **Acta Scientiarum. Animal Science**, Maringá, v. 22, n. 2, p. 515-521, 2000.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. **Hematologia de peixes brasileiros**. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela, 2004. p. 89-120

RICHARDS, R.H., ROBERTS, R.J. The bacteriology of teleosts. In: ROBERTS, R.J. **Fish pathology**. London: Baillien Tindall, 1978. chap. 8, p. 183-204.

ROBERTS, R.J. **Patologia de los peces**. Madrid: Mundi Prensa, 1981. 366 p.

RODRÍGUEZ-CRUZ M; TOVAR, A.R.; PRADO, M.; TORRES, N. Mecanismos moleculares de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios. **Revista de Investigación Clínica**, México, v. 57, p. 457-472, 2005.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantã**, São Paulo, v. 20, p. 329-334, 1947.

ROWLEY, A.F.; KNIGHT, J.; LLOYD-EVANS, P.; HOLLAND, J.W.; VICKERS, P.J. Eicosanoids and their role in immune modulation in fish-a brief overview. **Fish and Shellfish Immunology**, Oxford, v. 5, p. 549-567, 1995.

SADO, R.Y.; MATUSHIMA, E.R. Avaliação histopatológica, imuno-histoquímica e ultraestrutural da resposta inflamatória crônica do robalo (*Centropomus* spp.) ao BCG. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, p. 58-64, 2007. Supplement.

SAINT-PAUL, U. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 205-240, 1986.

SAMPAIO-OLIVEIRA, A.M.B.M.; CONTE, L.; CYRINO, J.E.P. Produção de Characiformes autóctones. In: CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALOSSO, D.M., CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 8, p. 217-238.

SANTOS, L.E.S.; BORTOLOZO, E.A.F. Q. Omega 3 Intake: Considerations on the potential benefits in lipid metabolism. **Publication Uepg - Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v. 14, n. 2, p. 161-170, 2008.

SARGENT, J.R.; TOCHER, D.R.; BELL, G. The lipids. In: HALVER, J.E. (Ed.). **Fish nutrition**. Washington: Academic Press, 2002. p. 181-247.

SATOH, S.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Requirement of tilapia for tocopherol. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 53, p. 119-124, 1998.

SENADHEERA, S.P.S.D.; TURCHINI, G. M.; THANUTHONG, T.; FRANCIS, D.S. Effects of dietary α -linolenic Acid (18:3n-3)/linoleic Acid (18:2n-6) ratio on growth performance, fillet fatty acid profile and finishing efficiency in murray cod. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 309, p. 222-230, 2010.

SENER, E.; YILDIZ, M.; 1, SAVAS, E. Effect of vegetable protein and oil supplementation on growth performance and body composition of Russian sturgeon juveniles (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833) at low temperatures. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 6, p. 23-27, 2005.

SHELDON JR., W.M.; BLAZER, V.S. Influence of dietary lipid and temperature on bactericidal activity of channel catfish macrophages. **Journal of Aquatic Animal Health**, Philadelphia, v. 3, p. 87-93, 1991.

SHILS, M.E.; SHIKE, M.; ROSS, A.C.; CABALLERO, B.; COUSINS, R.J. **Modern nutrition in health and disease**. 10th ed. Lippincott: Williams & Wilkins, 2003. 1951 p.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídios e proteínas: III. Aplicação à insulina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 21-40, 2003.

SIMOPOULOS, A.P. Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 77-90, 2004.

SITJÁ-BOBADILLA, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, J. Diet related changes in non-specific immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 9, p. 637-640, 1999.

SMITH, K. R.; DUCKETT, M. J.; AZAIN, M. J.; SONON, R. N.; PRINGLE, T. D. The effect of anabolic implants on intramuscular lipid deposition in finished beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, p. 430-440, 2007.

SOUZA, S.M.G.; ANIDO, R.J.V.; TOGNON, F.C. Ácidos graxos Omega-3 e Omega-6 na nutrição de peixes – fontes e relações. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v. 6, p. 53-71, 2007.

STOSKOPF, M.K. **Fish medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. 882 p.

SULIEMAN, M.A.; NASSER, A.A.; ALI, S. Effect of dietary lipid source on the growth performance and body composition of *Oreochromis niloticus*. **Pakistan Veterinary Journal**. Faisalabad, v. 20, p. 57-63, 2000.

TAKEUCHI, T.; WATANABE, T.; OGINO, C. Supplementary effect of lipids in high protein diet of rainbow trout. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, Tokyo, v. 44, p. 677-681, 1978.

TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R.A.; GIOLI, L.D.; FAUSTINO, C.D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes; Characidae) em policultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 423-431, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress, 2004. 144 p.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M. **Herbarium**: compendio de fitoterapia. 3. ed. Curitiba: Editora Herbarium, 1997. 317p.

THOMPSON, K.D.; TATNER, M.F.; HENDERSON, R.J. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio on immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Aquaculture Nutrition**. Oxford, v. 2, p.21–31, 1996.

TIRAPEGUI, J. **Nutrição, metabolismo e suplementação na atividade física**. São Paulo: Atheneu, 2005. 350 p.

TOCHER, D. M. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. **Reviews in Fisheries Science**, Tokyo, v. 11, p. 107-184, 2003.

TORSTENSEN, B.E.; LIE, O.; FROYLAND, L. Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) - effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid enriched sunflower oil as dietary lipid sources. **Lipids**, Berlin, v. 35, p. 653-664, 2000.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALOSSO, D.M., CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 6, p. 171-193.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. cap. 10, p. 225-255.

VAL, A.L.; SILVA, M.N.P.; VAL, V.M.F.A. Estresse em peixes: ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Ed.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Livraria Varela, 2004. cap. 3, p. 75-88.

VAZ, J.S.; DEBONI, F.; AZEVEDO, M.J.; GROSS, J.L.; ZELMANOVITZ, T. Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 19, p. 489-500, 2006.

VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 380 p.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, K.; HATHA, A.A.M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 76, p. 165-168, 2002.

WAITZBERG, D.L. Imunonutrição. In: _____. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 1516-1518.

WALTERS, G.R.; PLUMB, J.A. Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. **Journal of Fish Biology**, London, v. 17, p. 177-185, 1980.

WENDT, S.B.T. **Comparação da eficácia da calêndula e do óleo de girassol na cicatrização por segunda intenção de feridas em pequenos animais**. 2005. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

WU, F.C.; TING, Y.Y.; CHEN, H.Y. Dietary docosahexaenoic acid is more optimal than eicosapentaenoic acid affecting the level of cellular defence responses of the juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 14, n. 3, p. 223-238, 2002

YILDIRIM-AKSOY, M.; LIM, C.; SHELBY, R.; KLESIOUS, P.H. Increasing fish oil levels in commercial diets influences hematological and immunological responses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Journal World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 40, p. 76–86, 2009.

YILDIZ, H.Y. Effects of experimental infection with *Pseudomonas fluorescens* on different blood parameters in carp (*Cyprinus carpio* L.). Israeli. **Journal of Aquaculture**. Bethesda, v. 50, n. 2, p. 82-85, 1998.

YOUDIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J.A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience**, Oxford, v. 18, n. 4/5, p. 383-399, 2000.

ZAKERI, M.; KOCHANIAN, P.; MARAMMAZI, J. G.; YAVARI, V.; SAVARI, A.; HAGHI, M. Effects of dietary n-3 HUFA concentrations on spawning performance and fatty acids composition of broodstock, eggs and larvae in yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 310. p. 388–394, 2011.