



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

PEDRO FILIPE RIBEIRO ARAÚJO

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO FÍGADO E INTESTINO E HEMATOLOGIA DO
BEIJUPIRÁ, *Rachycentron canadum*, ALIMENTADOS COM DIETAS À BASE DE
DIFERENTES NÍVEIS DE INCLUSÃO DE FARELO DE SOJA**

FORTALEZA

2013

PEDRO FILIPE RIBEIRO ARAÚJO

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO FÍGADO E INTESTINO E HEMATOLOGIA DO
BEIJUPIRÁ, *Rachycentron canadum*, ALIMENTADOS COM DIETAS À BASE DE
DIFERENTES NÍVEIS DE INCLUSÃO DE FARELO DE SOJA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais, do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de Concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes, Ph.D.

Coorientador: Prof. Dr. Thales Passos de Andrade, Ph.D.

FORTALEZA

2013

PEDRO FILIPE RIBEIRO ARAÚJO

AValiação Histológica do Fígado e Intestino e Hematologia do
Beijupirá, *Rachycentron canadum*, Alimentados com Dietas a Base de
Diferentes Níveis de Inclusão de Farelo de Soja

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais, do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de Concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Aprovada em: ____/____/_____.

Prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes, Ph.D. (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Thales Passos de Andrade, Ph.D. (Coorientador)
Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Prof. Dr. Marcelo Vinícius do Carmo e Sá, Dr.
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À academia, para que este trabalho possa inspirar futuras pesquisas correlatas.

Aos meus pais, pela confiança e encorajamento no cumprimento desta tarefa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma etapa exitosa da minha vida.

Ao CNPq e CAPES, por concessão de bolsa durante os meses de pesquisa.

Ao MPA e ao MCT/CNPq, pelo direcionamento de recursos à aquicultura através da sub-rede: “NUTRIÇÃO, SANIDADE E VALOR DO BEIJUPIRÁ, *Rachycentron canadum*, CULTIVADO NO NORDESTE DO BRASIL”.

Ao Projeto “SANIDADE E BIOSEGURANÇA APLICADA A VIABILIZAÇÃO DO CULTIVO COMERCIAL DO BEIJUPIRÁ *Rachycentron canadum* (LINNAEUS, 1766) NO NORDESTE DO BRASIL”, sem o qual não teríamos a possibilidade de conduzir a presente pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Alberto Nunes e ao co-orientador, Prof. Thales Andrade, pelos inestimáveis auxílios e qualidade de ensino durante a execução deste trabalho.

À Graça Coelho, pela valorosa administração burocrática envolvida na realização da pesquisa e pelo processamento das amostras de sangue avaliadas no decorrer do projeto.

Aos meus pais, Almir e Salete, pela doação incondicional.

À Fazenda Aquabravo (Eng. Ricardo Lima), pelo acesso aos primeiros exemplares de beijupirá para treinamento da equipe, que proporcionou maior consistência à realização dos trabalhos.

À professora Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira e a turma do CEDECAM, D'vila Maciel, Igor Uchoa, Kelviane Costa, Liana Pinho, Lidiane Romão, Marcela Paz, Mariana Coimbra e Mayara Barreto, pela colaboração nas coletas e processamento de amostras; Max e João Mafaldo, pelas boas risadas nos momentos de descontração.

À Carolina Coelho, Erika Targino, Pollyana Moraes e Marcionília, pela inestimável amizade.

À excelente turma do laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, nas pessoas da Prof^a. Oscarina Sousa e Dra. Edirsana Carvalho e Cristiane Teles, pela disposição em auxiliar-me nas questões paralelas ao projeto de dissertação e pela boa amizade.

À Neiva Maria, pelas valorosas observações textuais que possibilitaram a melhor forma e apresentação deste arquivo.

Ao amigo de graduação, Erivaldo Nascimento, pela boa fé na mediação de contatos com o setor produtivo.

À Roberta, pelo companheirismo, compreensão e apoio nos últimos meses, principalmente durante a escrita desta dissertação.

“Não tentes ser um homem de sucesso, tenta antes ser um homem de valor” (Albert Einstein).

RESUMO

Em virtude do exponencial crescimento dos cultivos comerciais do beijupirá, *Rachycentron canadum*, em países da Ásia, tais como China e Taiwan, com perspectivas promissoras também para o Brasil, fazem-se necessárias pesquisas que visem fornecer bases tecnológicas para a sustentabilidade da atividade no Nordeste brasileiro, como o desenvolvimento de formulações de rações eficientes. O presente estudo objetivou analisar a sanidade desses organismos submetidos à condição experimental, com a finalidade de observar níveis aceitáveis de farelo de soja em dietas balanceadas para essa espécie. Foram testadas cinco dietas experimentais formuladas para conter 48% de Proteína Bruta (PB) e 12% de Extrato Etéreo (EE). As cinco dietas variaram no percentual de substituição de farinha de peixe por farelo de soja, a partir da dieta base, em quatro níveis: 12% (CB12); 25% (CB25); 37% (CB37) e 50% (CB50). Avaliou-se também uma dieta comercial para peixes marinhos contendo 40% PB e 8% EE. As dietas foram ofertadas durante 56 dias. Na despesca foram amostrados cinco indivíduos de cada tratamento, os quais foram analisados quanto à integridade das estruturas externas; análise a fresco do muco e brânquias; coleta de sangue e de tecidos para análises em laboratório. Na análise a fresco foram observados protozoários do gênero *Epystilis* e nematoides. Os resultados hematológicos indicaram que elevadas inclusões de farelo de soja afetam o padrão dos leucócitos do beijupirá, elevando a contagem de neutrófilos e diminuindo a de linfócitos nas dietas CB37 e CB50. A histologia revelou maior infiltração de leucócitos na lâmina própria do intestino distal na dieta CB37, bem como uma diminuição das vacuolizações supranucleares do tratamento CB50. Os resultados sugerem que nas condições avaliadas, até 25% de substituição da farinha de peixe pelo farelo de soja não impactam significativamente na sanidade do beijupirá, embora se tenha observado início de lesões neste tratamento, que se agravaram nas demais substituições. A ração comercial impactou de forma semelhante às piores dietas para os organismos.

Palavras-chave: 1. Peixe – Alimentação e rações. 2. Peixe – Doenças. 3. Peixe – Histologia.

ABSTRACT

Since the exponential growth on commercial culture of cobia, *Rachycentron canadum*, in Asian countries like China and Taiwan with good perspectives to Brazil, new insights of research such as the development of efficient feed formulations, have been needed to provide technological bases and sustainability of this sector on Brazilian Northeast. The present study aimed to analyze cobia's health under experimental condition and acceptable levels of soybean meal in balanced diets by this species. It was tested five experimental diets formulated to contain 48% of Crude Protein (CP) and 12% of Crude Fat (CF). It was changed the percentage content of fishmeal replacement by soybean meal, from basal diet, at four levels: 12% (CB12); 25% (CB25); 37% (CB37) e 50% (CB50). It was also evaluated a commercial feed to marine fishes with 40% PB e 8% EE. The diets were offered for a 56-days period. On the harvest, five fish were sampled from which treatment and observed for external structures integrity; mucus was analyzed in a wet mount; the blood and tissues collection to laboratorial assessment. It was observed *Epystilis* protozoan and nematodes in wet mount. Hematological results have showed that the higher inclusion levels of soybean meal level did affect the normal total counting numbers of leucocytes of cobia, increasing neutrophils and decreasing total counting numbers of lymphocytes CB37 and CB50 diets. The histology showed that most of leucocytes were migrating in distal intestine of lamina propria, diet CB37, as well as decreasing of supranuclear vacuolization in diet CB50. The results suggest that up to 25% crude protein in form of soybean meal has not had a significant impact in cobia's health. The commercial marine fish feed impacted similarly to worst diets.

Keywords: 1. Fish – Food and feeds. 2. Fish – Diseases. 3. Fish – Histology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Procedimentos de coleta e processamento de sangue do beijupirá, <i>Rachycentron canadum</i>	25
Figura 2 – Técnicas e ferramentas utilizadas na coleta de tecidos do beijupirá, <i>Rachycentron canadum</i>	26
Figura 3 – Micro-organismos removidos através de raspagem do muco do beijupirá, <i>Rachycentron canadum</i> , por ocasião da coleta dos espécimes após experimento conduzido pelo LANOA	29
Figura 4 – Fígado do beijupirá, <i>Rachycentron canadum</i> , mostrando lesões associadas à utilização de farelo de soja nas dietas após experimento conduzido pelo LANOA	30
Figura 5 – Padrão histológico geral do intestino distal do beijupirá, <i>Rachycentron canadum</i> , após experimento conduzido pelo LANOA	37
Figura 6 – Grande número de células mitóticas nas vilosidades do intestino distal do beijupirá, <i>Rachycentron canadum</i> , após experimento conduzido pelo LANOA	39
Figura 7 – Padrão histológico do fígado do beijupirá, <i>Rachycentron canadum</i> , após experimento conduzido pelo LANOA	42
Figura 8 – Área necrótica do fígado do beijupirá, <i>Rachycentron canadum</i> , após experimento conduzido pelo LANOA	43

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Contagem dos neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\text{mm}^3$) para as dietas testadas para o beijupirá, *Rachycentron canadum*, após experimento conduzido pelo LANOA e peso médio (em gramas) dos indivíduos 31
- Gráfico 2 – Contagem dos linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) para as dietas testadas para o beijupirá, *Rachycentron canadum*, após experimento conduzido pelo LANOA e peso médio (em gramas) dos indivíduos 32
- Gráfico 3 – Variação dos demais parâmetros hematológicos entre as dietas testadas para o beijupirá, *Rachycentron canadum*, após experimento conduzido pelo LANOA e peso médio (em gramas) dos indivíduos 33
- Gráfico 4 – Infiltração de leucócitos no intestino para as dietas testadas para o beijupirá, *Rachycentron canadum*, após experimento conduzido pelo LANOA e peso médio (em gramas) dos indivíduos entre os tratamentos 34
- Gráfico 5 – Vacuolizações supranucleares entre as dietas testadas para o beijupirá, *Rachycentron canadum*, após experimento conduzido pelo LANOA e peso médio (em gramas) dos indivíduos entre os tratamentos 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentuais de inclusão de farinha de peixe e farelo de soja na dieta base e nas diferentes dietas avaliadas, excetuando-se a ração comercial	22
Tabela 2 – Parâmetros comumente associados à enterite em peixes e as devidas pontuações para os graus de severidade	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	A espécie	17
3.2	A farinha de peixe	18
3.3	Ingredientes alternativos à farinha de peixe	19
3.4	O farelo de soja	20
3.5	As enfermidades nutricionais	20
4	METODOLOGIA	22
4.1	Dietas experimentais	22
4.2	Caracterização do sistema experimental	23
4.3	Manejo profilático	23
4.4	Manejo alimentar	24
4.5	Coleta, processamento das amostras e análise dos tecidos	24
4.5.1	<i>Coleta, processamento e análise do sangue</i>	24
4.5.2	<i>Coleta, processamento das amostras e análise dos demais tecidos</i>	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1	Exame macroscópico	29
5.2	Exames hematológicos	30
5.3	Exames histológicos do intestino e fígado	33
5.3.1	<i>Intestino</i>	34
5.3.2	<i>Fígado</i>	41
6	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura, segundo dados da FAO (2012), tem se desenvolvido a elevadas taxas anuais nas últimas três décadas, atingindo em 2010 uma produção de 59,9 milhões de toneladas, valor doze vezes superior à produção do início da década de 1980. Atualmente, a aquicultura contribui com 47% do pescado destinado ao consumo humano no mundo, apresentando uma produção estimada em 119,4 bilhões de dólares.

Ainda de acordo com os mais recentes dados da FAO, a América Latina, que na década de 1980 contribuía com 0,50% da produção aquícola mundial (24.590 toneladas), hoje produz aproximadamente 1,88 milhão de toneladas que representam, no entanto, modestos 3,10% da produção mundial.

No Brasil, a produção aquícola somou para o ano de 2010, 479.398,6 toneladas; deste total 82,3% são advindas da aquicultura continental, representada majoritariamente pela piscicultura (Ministério da Pesca e Aquicultura, 2012). Das 85.058,6 toneladas produzidas pela maricultura brasileira, quase 70 mil (80% da maricultura brasileira) são atribuídas à carcinicultura, que tem na Região Nordeste seus maiores produtores, mais especificamente os Estados do Rio Grande do Norte e Ceará. Estes dados mostram que a maricultura brasileira ainda contribui pouco com a produção mundial.

Embora tenha experimentado um considerável crescimento desde a década de 1980 até 2003, a carcinicultura sofreu gradativas quedas de resultados zootécnicos e, na sequência, surtos de enfermidades virais, que ocasionaram prejuízos significantes à atividade, a qual ainda não conseguiu recuperar o pico de produção atingido em 2003 (NUNES; MADRID; ANDRADE, 2011).

De acordo com dados da Associação Brasileira de Criadores de Camarão (2011), as exportações brasileiras de pescado sofreram uma queda da magnitude de 55.159 toneladas de 2003 a 2011, correspondendo a um valor aproximado de 142 bilhões de dólares. Em 2012, o déficit brasileiro de exportação de pescado foi de 320.273 toneladas, aproximadamente um bilhão de dólares (Associação Brasileira de Criadores de Camarão, 2012).

Em 2007 formou-se, no Brasil, a Rede de Pesquisa e Desenvolvimento em Piscicultura Marinha (Repimar) da qual parte dos primeiros esforços vislumbraram fornecer bases científicas para a produção comercial do *Rachycentron canadum*, contando com esforços do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, então Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (SILVA; COELHO, 2010).

Entre os projetos executados na conjuntura do desenvolvimento da piscicultura marinha, embora não fazendo parte da Repimar, o projeto: “Sanidade e biossegurança aplicada a viabilização do cultivo comercial do beijupirá, *Rachycentron canadum* (LINNAEUS, 1766) no Nordeste do Brasil” avaliou, dentre as diversas hipóteses, a possibilidade de se utilizar esta espécie como uma alternativa à carcinicultura em áreas afetadas pelas enfermidades virais.

Na última década, o beijupirá tornou-se alvo de muitos trabalhos de pesquisa por todo o mundo e seu cultivo tem despontado como uma indústria promissora, sobretudo nos países orientais como China e Taiwan, entre outros (FAO, 2012; LIAO *et al.*, 2004; RESLEY; WEBB JR.; HOLT, 2006; SARDENBERG *et al.*, 2010).

Isso ocorreu porque, de acordo com Sardenberg *et al.* (2010), *R. canadum* é uma das espécies com grande potencial para piscicultura marinha, por apresentar características biológicas e de mercado favoráveis à aquicultura. Considerando-se esses aspectos positivos, acredita-se que o beijupirá seja a espécie favorável ao desenvolvimento da maricultura brasileira.

No entanto, Wiefels (2011) pondera a necessidade do desenvolvimento de mercado consumidor para esse pescado, cuja produção torna-se iminente no Brasil. O autor aponta ainda para a preocupação em se produzir um pescado de alta qualidade, capaz de ser direcionado a mercados cujo preço seja viável ao desenvolvimento da atividade.

Os cultivos comerciais de beijupirá apresentaram grande desenvolvimento nos últimos anos até 2011. Segundo dados da FAO (2012), a produção desta espécie evoluiu de nove toneladas em 1997 para 961 toneladas em 1998 e mantiveram um crescimento anual significativo, atingindo 40.768 toneladas no ano de 2010, gerando uma receita aproximada de US\$ 70.644 milhões.

Contudo, Madrid e Nunes (2013) reportaram recentemente que a produção desta espécie tem diminuído consideravelmente em países asiáticos, principalmente em função do mercado. Ainda segundo esses autores, investidores que apostaram no cultivo do beijupirá em países asiáticos, estão direcionando suas instalações à produção de outras espécies, como é o caso da Marine Farms ASA, uma empresa norueguesa que desde o ano 2000 resolveu investir no cultivo do beijupirá no Vietnã e que de acordo com Madrid e Nunes (2013) está reduzindo sobremaneira o cultivo de *R. canadum* em favor do pampo, *Trachinotus blochii*.

No tocante à larvicultura da espécie, novas tecnologias têm sido desenvolvidas e atualmente se conseguem obter desovas ininterruptas ao longo do ano, cuidando-se basicamente da manutenção de temperaturas adequadas à desova; fornecimento de alimento

vivo e separação dos alevinos por classes de tamanho, evitando-se o canibalismo durante o processo de produção dos mesmos (SARDENBERG *et al.*, 2010).

Resley, Webb Jr. e Holt (2006) apontam para a possibilidade de serem realizados cultivos de beijupirá em salinidades tão baixas quanto 5 g/l e tão altas quanto 44,5 g/l em sistemas de recirculação.

Dentre os desafios do cultivo do beijupirá está o surgimento de doenças, para as quais a espécie se apresenta susceptível. Sandenberg *et al.* (2010) reportaram que nas larviculturas, *Amyloodinium* spp.; *Cryptocarion*; *Photobacterium* spp.; *Vibrio* spp. e viroses causadas por linfocitose são comuns.

No Brasil, Andrade *et al.* (2010) encontraram, pela primeira vez, a ocorrência do copépodo *Caligus* sp. associada a mortalidades em cultivo piloto realizado por uma fazenda localizada no município de Beberibe-CE, enquanto que Figueiredo (2012) foi quem primeiro reportou a ocorrência de *Photobacterium damsela* subespécie *piscicida*, numa larvicultura comercial de São Paulo.

Embora Liao *et al.* (2004) afirmem que indivíduos de 30g atingem até 7 kg entre 10 e 13 meses de cultivo em Taiwan, no Brasil, Sampaio *et al.* (2011) obtiveram indivíduos com 4,2 kg de peso médio ao final de 12 meses de um cultivo; este experimento foi realizado em condições ótimas de oxigênio e baixa densidade de estocagem num sistema de produção trifásico. No entanto, estes autores chamam atenção para a possibilidade de selecionar linhagens com maior potencial de crescimento, através de gerações.

O fato de *R. canadum* ocorrer naturalmente na costa brasileira, somado as suas características de desempenho, colocam o Brasil como um dos grandes potenciais produtores desta espécie que, segundo Madrid e Nunes (2013), tem apresentado ganhos de peso de até 4 kg a 5 kg no primeiro ano de cultivo nos países asiáticos como Vietnam.

Neste contexto, considerando o significativo crescimento da atividade no mundo e a potencialidade brasileira de se destacar neste setor, faz-se necessário o avanço nas tecnologias de produção.

Gatlin (2008) afirma que a ração influencia não só o crescimento, mas também nos custos de produção e na saúde dos peixes, desempenhando assim um papel fundamental no setor produtivo. Portanto, o desenvolvimento de rações balanceadas que atendam as necessidades nutricionais da espécie, faz-se importante para o desenvolvimento deste negócio.

No entanto, os estudos que visam substituir a farinha de peixe das dietas por fontes proteicas alternativas sempre impactam sobre o desempenho zootécnico das espécies, como é mostrado por Salze *et al.* (2010), além de alterarem a morfologia de órgãos

envolvidos no processo digestivo dos peixes em cultivo (ESCAFFRE; KAUSHIK; MAMBRINI, 2007; HEIKKINEN *et al.*, 2006; HU *et al.*, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar possíveis alterações anatomo-patológicas no trato digestório, e sobre a hematologia de juvenis de beijupirá, *Rachycentron canadum*, alimentados com rações contendo diferentes níveis de proteína vegetal, observando também a condição geral de saúde dos animais sob cultivo.

2.2 Objetivos específicos

1. Observar macroscopicamente e por microscopia a presença de eventuais patógenos no beijupirá ao final do período experimental de cultivo.
2. Diagnosticar, por meio da hematologia, aspectos ligados à condição normal e de estresse em juvenis de beijupirá, *Rachycentron canadum*, associando tais características à utilização de diferentes níveis de farelo de soja nas dietas, e a possíveis alterações de desempenho zootécnico.
3. Diagnosticar e associar, por meio da histopatologia, os efeitos do farelo de soja sobre a morfologia do trato digestório de juvenis de beijupirá, *Rachycentron canadum*, a possíveis quedas de desempenho zootécnico.
4. Estudar a viabilidade da utilização de ingredientes vegetais na dieta do beijupirá, *Rachycentron canadum*, indicando níveis ótimos de inclusão sem danos à sanidade dos estoques cultivados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A espécie

O beijupirá, *Rachycentron canadum* (LINNAEUS, 1766), é uma espécie pelágica que se distribui largamente em águas quentes e temperadas das regiões tropicais e subtropicais desde Massachusetts (EUA) ao Rio da Prata (Argentina) na região do Atlântico oeste, e do Marrocos à África do Sul na costa leste do Atlântico. O beijupirá distribui-se ainda por todo o Oceano Índico e na costa oeste do Pacífico (SHAFFER; NAKAMURA, 1989).

Embora seja considerada uma espécie pelágica, *R. canadum* possui hábito alimentar bentônico junto a ecossistemas recifais podendo ainda ser encontrado próximo a fundos lamosos, arenosos ou de cascalho (COLLETTE, 1999; SHAFFER; NAKAMURA, 1989). Podem ainda exibir comensalismo nadando próximo a tubarões e raias, alimentando-se dos organismos descobertos pelo revolvimento que as referidas espécies fazem no solo (SHAFFER; NAKAMURA, 1989).

O item alimentar mais encontrado em estômagos de beijupirá engloba o grupo dos crustáceos, sendo encontrados representantes deste grupo em 100% dos indivíduos analisados, principalmente caranguejos e camarões peneídeos (BOSCHUNG, 1957; CHRISTMAS *et al.*, 1974; DARRACOT, 1977).

Franks *et al.* (1996) colocam os peixes e crustáceos decápodes dentre os itens alimentares de juvenis de beijupirá com apenas 80 g, mostrando que este hábito é adquirido desde muito cedo. Estes autores reportam ainda que os crustáceos são dominantes em número e volume percentual do conteúdo alimentar nos estômagos estudados.

Arendt *et al.* (2001) encontraram que o siri azul, *Callinectes sapidus*, e o vermelho, *Ovalipes ocellatus*, foram os itens alimentares com maior índice relativo de importância em estômagos de beijupirá coletados na Baía de Chesapeake, EUA. Por esta característica são chamados popularmente de “comedores de caranguejo” (do inglês, *crabeater*).

Estudos de idade e crescimento mostram que as fêmeas apresentam maiores taxas de ganho de peso que os machos. Richards (1967) reportou que as fêmeas capturadas com um ano de idade, apresentaram em média 1,81 kg frente a 1,5 kg para os machos de idade equivalente. Para grupos com dois anos de idade, o peso médio das fêmeas foi de 4,63 kg enquanto o dos machos, 3,76 kg. Por fim, quando machos de nove anos pesaram em média 18,96 kg, as fêmeas pesaram 28,44 kg.

Mach *et al.* (2010), mostraram que juvenis alimentados com rações a base de peixe e caranguejo tiveram desempenho superior àqueles alimentados com dietas a base de peixe ou caranguejo usados individualmente como fonte proteica.

No entanto, Benetti *et al.* (2010) encontraram que juvenis de 45 g, sob condições de cultivo, recebendo ração com 53% de proteína e 10% de gordura, atingiram de seis a oito quilos no primeiro ano. Um crescimento significativamente superior ao observado em condições naturais.

Por ser o beijupirá uma espécie carnívora, a expansão do seu cultivo retoma a preocupação quanto ao uso de proteínas e ácidos graxos animais de alta qualidade, sobretudo da farinha e óleo de peixe, na formulação de dietas comerciais.

3.2 A farinha de peixe

A farinha de peixe é um produto intensivamente aplicado como fonte proteica de rações para os mais diversos grupos animais (DERSJANT-LI, 2002; NRC, 2011). Porém, dados da FAO (2012) mostram que a produção pesqueira em todo mundo encontra-se estabilizada. Em função disso, verifica-se a utilização de pequenos peixes – antes sem muito valor comercial e que compunham a matéria prima de farinha de peixe – diretamente na alimentação humana que tem aumentado nos últimos anos.

Assim, espera-se que daqui a alguns anos a alimentação humana possa estar competindo com a aquicultura pela utilização dos recursos marinhos. Além disso, dados da FAO (2010) mostram que o preço da farinha de peixe quase triplicou desde 1994, o que sugere uma futura inviabilidade do seu emprego na ração animal, pelo menos como única fonte proteica.

Tacon e Metian (2008) fizeram um prognóstico de utilização da farinha e óleo de peixe até 2020. Nesta previsão os autores reportam um aumento de aproximadamente 97% na produção de peixes marinhos com redução de 32% na utilização de farinha de peixe nas rações comerciais para o ano de 2020 em relação a 2010. Dentre os fatores responsáveis por essa diminuição está o preço deste ingrediente que, segundo estes autores, dobrou entre os anos de 2005 e 2006.

3.3 Ingredientes alternativos à farinha de peixe

Segundo Gatlin *et al.* (2007), a aquicultura tem procurado fontes economicamente viáveis e ambientalmente corretas para substituir a farinha e óleo de peixe como componentes das rações para organismos aquáticos.

Neste contexto, muitos trabalhos têm sido realizados testando a substituição desse ingrediente tão importante por derivados de vegetais, visando um maior equilíbrio ambiental na prospecção de peixes para a fabricação de rações, como também uma diminuição dos custos de produção na aquicultura (CRAIG *et al.*, 2006; KOWALSKA *et al.*, 2010; MARTINÉZ-LLORENS *et al.*, 2012; NAGEL *et al.*, 2012).

Em razão de tal necessidade, muitos estudos relacionados à demanda nutricional de espécies de peixes surgiram nas últimas décadas, buscando suprir a falta de informação a respeito de nutrientes requeridos pelas várias espécies cultivadas ou cultiváveis (BLAABJERG *et al.*, 2010; KHAJEPOUR; HOSSEINI, 2012; VANDENBERG *et al.*, 2011; YUE; ZHOU, 2008).

Os resultados de alguns desses trabalhos mostram que enfermidades de caráter nutricional, como enterite, são evidenciadas quando da utilização de ingredientes vegetais na formulação de dietas, sobretudo para peixes carnívoros (ESCAFFRE *et al.*, 2007; HEIKKINEN *et al.*, 2006).

Zhou *et al.* (2004) detectaram uma razoável digestibilidade aparente para ingredientes proteicos correntemente utilizados em substituição à farinha de peixe, nas dietas comerciais para juvenis de beijupirá. A digestibilidade encontrada teve pouca variação estatisticamente significativa entre os ingredientes, principalmente aqueles oriundos de vegetais, mas também na farinha de carne e ossos.

Craig *et al.* (2006) verificaram que juvenis de beijupirá podem utilizar uma larga variação proteica e lipídica na dieta, sem afetar significativamente seu desempenho em termos de ganho de peso. Os mesmos autores recomendam baixos teores de lipídeos na fabricação de rações, a fim de evitar acumulação de gordura visceral e hepática, resultando em melhor aproveitamento dos nutrientes, bem como em melhor condição sanitária para os indivíduos sob cultivo, já que o conteúdo lipídico do fígado, assim como o índice hepatossomático desses organismos, elevaram-se na medida em que foram aumentados os níveis de lipídios nas dietas. Em função destas observações, os autores sugerem que elevados níveis de lipídios devem ser evitados.

Chou *et al.* (2001) recomendam que o nível ideal de lipídio na dieta para o beijupirá seria em torno de 5,76%, embora em níveis tão elevados quanto 18% de extrato etéreo não se tenha observado diferença significativa no crescimento dos indivíduos. Já Robaiana *et al.* (1998) encontraram que melhores resultados de desempenho e sanidade de *Sparus aurata*, são atingidos quando se atenta para o balanço entre os ácidos graxos da série n-3 e n-6.

Salze *et al.* (2010) deduziram que, embora não se comparando àquelas dietas cuja fonte proteica era somente a farinha de peixe, os melhores índices de desempenho para juvenis de beijupirá foram encontrados em rações que utilizaram uma mistura de derivados de soja, o concentrado proteico de soja e o farelo de soja.

3.4 O farelo de soja

No cenário da produção de soja, o Brasil se destaca como segundo maior produtor mundial, seguido pela Argentina e liderado pelos Estados Unidos. A soja é a terceira commodity mais produzida pelo Brasil tanto em volume como em valor (FAOSTAT, 2013).

Dados de Romarheim *et al.* (2008) relatam não terem evidenciado sinais de enterite em alevinos de beijupirá tratados com dietas onde o farelo de soja substituiu em 50% a farinha de peixe, numa inclusão de 285 g/kg deste ingrediente vegetal. Isso indica uma promissora utilização deste ingrediente em rações comerciais para esta espécie, ao passo que diminui significativamente a parcela de farinha de peixe na composição dessas rações.

Dados da Companhia Nacional de Abastecimento (2013) apontam uma estimativa na produção de soja para 2013 de 82,063 milhões de toneladas, em área plantada de 27 milhões de hectares. Destas, pouco mais da metade (42,40 milhões de toneladas) são consumidas no Brasil. O volume de farelo de soja produzido este ano, resultante do beneficiamento para extração do óleo, foi estimado em 29,74 milhões de toneladas, das quais 14,32 milhões serão consumidas em território nacional.

3.5 As enfermidades nutricionais

Vários trabalhos com diversas espécies mostram a susceptibilidade de peixes, sobretudo os marinhos, a inclusões de ingredientes vegetais substituindo a farinha de peixe (HEIKKINEN *et al.*, 2006; REFSTIE *et al.*, 2006a,b; SAHLMANN *et al.*, 2013).

Dentre as lesões mais comuns nos intestinos de peixes alimentados por rações contendo ingredientes vegetais, estão aquelas relacionadas a inflamações no intestino (enterite), onde se visualizam infiltração de leucócitos, dilatação da lâmina própria e da camada submucosa intestinal, formação de vacúolos supranucleares nos enterócitos (BAEVERFJORD e KROGDAHL, 1996; KOWALSKA *et al.*, 2010; URÁN *et al.*, 2008) e também alterações morfométricas como encurtamento das vilosidades intestinais (ESCAFFRE; KAUSHIK; MAMBRINI, 2007).

Essas alterações podem ocorrer por vários fatores, como a falta de alguns aminoácidos e ácidos graxos essenciais e presença de alguns carboidratos indigestíveis (GATLIN, 2008). O mesmo autor ressalta que o grau de severidade de sinais clínicos está relacionado diretamente ao grau de deficiência nutricional dos organismos.

Sabe-se ainda que o aparecimento das alterações, bem como a tolerância de maior ou menor inclusão de um ingrediente vegetal, estão relacionados à espécie e à idade do organismo alvo (FRANCIS; MAKKAR; BECKER, 2001).

Recentemente, uma publicação de Venold *et al.* (2012) mostrou que a severidade da enterite na truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, foi significativamente reduzida, quando se deu a substituição total da farinha de peixe por ingredientes vegetais, em linhagens selecionadas de quatro gerações alimentadas com dietas à base de proteínas vegetais.

Além da investigação histológica, alguns estudos buscam produzir critérios para a avaliação dos parâmetros hematológicos de peixe, para investigar o status fisiológico de animais cultivados e com potencial para o cultivo, como também de peixes com importância ecológica, muitas vezes presentes na fauna acompanhante das pescarias comerciais (MARSHALL *et al.*, 2012; RIJN; REINA, 2010; TAVARES-DIAS *et al.*, 1999a,b; VÁZQUEZ; GUERRERO, 2007).

Em peixes, alguns destes parâmetros hematológicos mostram-se alterados em função de variáveis diversas, tais como nutricionais, salinidade, infecções, poluentes e drogas utilizadas na aquicultura (OBEMEATA; ADUABOBO; WOKOMA, 2012; RAWLING *et al.*, 2012; SADO & BICUDO, 2010; TAVARES-DIAS *et al.*, 2011; YUE & ZHOU, 2008). No entanto, não se observa uma constância entre os padrões hematológicos, tampouco entre as alterações encontradas nesses parâmetros com as diversas espécies estudadas.

Assim, justifica-se a investigação do uso de ingredientes vegetais – neste caso o farelo de soja – sobre os efeitos deletérios à sanidade desses animais, cujo cultivo apresenta-se como atividade promissora e de elevada rentabilidade.

4 METODOLOGIA

A fabricação das dietas, os tratamentos experimentais com todas as suas etapas – povoamento, arraçoamento e despesca – e as análises de desempenho zootécnico dos organismos avaliados na presente pesquisa foram conduzidos pela equipe do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – LANOA, pertencente ao Centro de Estudos Ambientais Costeiros – CEAC, localizado no município de Eusébio – CE. O referido centro pertence ao Instituto de Ciências do Mar – Labomar, da Universidade Federal do Ceará – UFC.

4.1 Dietas experimentais

Para avaliar o nível ótimo de inclusão do farelo de soja na dieta do beijupirá, formulou-se uma dieta de referência considerada ideal para peixes marinhos, para conter 12% de extrato etéreo e 48% de proteína bruta. Esses nutrientes eram advindos majoritariamente do óleo de peixe e da farinha de salmão, respectivamente.

A dieta de referência continha 51,4 g/kg de farinha de salmão e 161 g/kg de farelo de soja. A partir desta dieta, realizaram-se substituições graduais da farinha de salmão pelo farelo de soja. Os níveis de substituição avaliados foram de 12%, 25%, 37% e 50%. Para efeito de apresentação e discussão dos resultados, as dietas foram nomeadas respectivamente como dieta base, CB12, CB25, CB37 e CB50, seguindo a notação estabelecida por Pinto *et al.* (2013).

Vale ressaltar que esses percentuais de substituição não refletem a inclusão do farelo de soja nas dietas avaliadas, haja vista que a dieta base já continha 16,1% de inclusão de farelo de soja em sua formulação. A tabela 1 auxilia na distinção entre substituição e inclusão do farelo de soja e farinha de peixe entre as dietas.

Tabela 1. Percentuais de inclusão de farinha de peixe e farelo de soja na dieta base e nas diferentes dietas avaliadas, excetuando-se a ração comercial.

Dieta	Percentual de inclusão	
	Farinha de peixe	Farelo de soja
Dieta base	51,4	16,1
CB12	45	24,6
CB25	38,5	33
CB37	32,1	41,5
CB50	25,7	50

Fonte: Informação pessoal do professor Alberto Nunes.

Além das dietas fabricadas pelo LANOA, testou-se ainda uma dieta comercial para peixes marinhos, cujo rótulo dizia conter 40% de proteína bruta e 8% de extrato etéreo.

4.2 Caracterização do sistema experimental

O sistema experimental consistiu de 30 tanques de Polietileno com capacidade nominal de 500 litros dispostos em seis filas com cinco tanques cada, em área coberta (*indoor*).

Para realização do experimento utilizaram-se cinco repetições de cada uma das dietas formuladas com quatro peixes por tanque. A distribuição dos tratamentos e repetições no sistema experimental foi aleatória.

O abastecimento destes tanques era realizado com água captada do Estuário do Rio Pacoti, filtrada a 50 µm em filtro de areia e armazenada em caixas de 10 m³.

Cada tanque possuía tubulação independente de drenagem e abastecimento de água, onde o abastecimento era realizado por gravidade através de tubulações vindas de caixas de 10 m³, localizadas externamente ao galpão que abrigava os tanques do sistema experimental.

A drenagem ocorria também por gravidade, onde a água escoava para tanques externamente alocados, à semelhança das caixas de abastecimento. A água armazenada no tanque de drenagem era então filtrada e bombeada, retornando às caixas de abastecimento de 10 m³, caracterizando assim um sistema fechado de recirculação.

No sistema, a recirculação era mantida contínua onde cerca de 80% da água dos tanques era renovada diariamente.

4.3 Manejo profilático

Uma vez por semana, a circulação era interrompida; então, se aplicavam alíquotas de ácido cítrico e sulfato de cobre, à proporção de 1:1, em cada tanque individualmente para se alcançar a concentração de 1 ppm na água, seguindo a metodologia de Peregrino Jr. (2009).

Após uma hora de ação desses compostos, os sistemas de abastecimento e drenagem dos tanques eram reabertos, mas com desvio da água drenada para que não houvesse a contaminação do sistema pelos compostos utilizados no manejo profilático. Depois de eliminados os referidos compostos, mediante descarte da água, a recirculação era então retomada.

4.4 Manejo alimentar

Inicialmente os peixes foram alimentados com as dietas testadas à proporção de 10% de sua biomassa, distribuídos em duas refeições diárias. Através do monitoramento das sobras ou falta de ração nos tanques, eram realizados os devidos ajustes na oferta do alimento. Caso sobrasse ração e esta sobra fosse inferior a 10% do total ofertado, mantinha-se a oferta para o dia seguinte. Não havendo sobras, aumentava-se 5% no total da oferta anterior. Se houvesse uma sobra acima de 10% da ração ofertada (1% da biomassa), reduziam-se 10% na próxima oferta. O intuito deste procedimento era ajustar o consumo das dietas para melhor controle na contabilização do consumo, melhor qualidade de água e mensuração de parâmetros zootécnicos dos espécimes avaliados, evitando os desperdícios e a privação de alimento, caracterizando assim um sistema de oferta *ad libitum*.

4.5 Coleta, processamento das amostras e análise dos tecidos

Findo o período experimental, a equipe do Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos – CEDECAM deslocou-se ao LANOA para coleta dos tecidos dos animais. Os peixes eram então anestesiados em eugenol a 50 mg/l, observados quanto à integridade das estruturas externas, à presença de sinais externos de lesões e/ou enfermidades. Em seguida eram pesados, medidos e realizava-se uma raspagem sobre a linha lateral, para investigação de parasitas e/ou epicomensais à luz do microscópio óptico; amostras das brânquias também eram coletadas para este mesmo fim. Na sequência, era realizada punção sanguínea na veia caudal usando seringa de 3 ml tipo tuberculina e/ou corte do pedúnculo caudal para a coleta de sangue e esfregaço.

4.5.1 Coleta, processamento e análise do sangue

O sangue era coletado em tubos BD Microtainer® contendo ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico (Dipotassium EDTA), para serem levados ao laboratório do CEDECAM, onde se procedeu a realização do hematócrito segundo metodologia descrita por Goldenfarb *et al.*, (1971) (figuras 1A e 1D). Uma alíquota do sangue era também coletada em lâmina de vidro para realização do esfregaço sanguíneo (figura 1B) e 10 microlitros eram diluídos em dois mililitros de solução de formol citrato, para fixação dos eritrócitos (figura 2C). Os eritrócitos fixados eram então contados em câmara de Neubauer e, após substituição

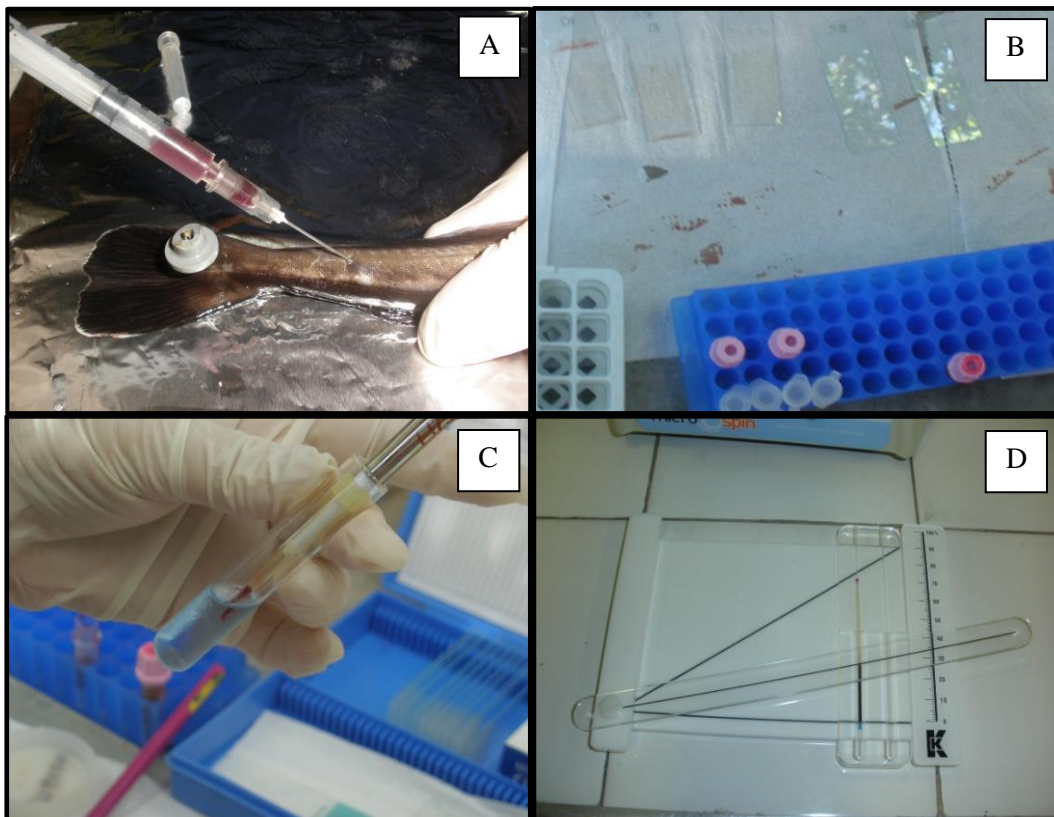
na fórmula nº 1 segundo proposto por Tavares-Dias e Moraes (2003), o resultado expresso em células por μl .

$$\text{ERITR} = \text{N}^\circ \times 5 \times 10 \times 200 / 1.000.000 \quad (1)$$

Em laboratório, enchem-se os capilares para realização do hematócrito em centrífuga MICRO SPIN, a 10.000 rpm por 5 minutos. A proporção de eritrócitos era então lida em régua adequada para esse fim (figura 1D). As lâminas de esfregaço sanguíneo eram coradas pela técnica rápida Panótica e analisadas sob microscopia óptica, onde se procedia a contagem total dos leucócitos pelo método indireto e a contagem diferencial conforme Tavares-Dias e Faustino (1998). Para obter-se o total de leucócitos, contavam-se essas células em meio a 1.000 eritrócitos, posteriormente o valor era aplicado na fórmula nº 2.

$$\text{LEUC} = \text{N}^\circ \times \text{ERITR} : 1000 \quad (2)$$

Figura 1 – Procedimentos de coleta e processamento de sangue do beijupirá, *Rachycentron canadum*.



Fonte: Autor. Em A, a coleta do sangue através da punção do pedúnculo caudal. Em B, os esfregaços para contagem diferencial de leucócitos. Em C a fixação dos eritrócitos para contagem dos mesmos. Em D, a realização do hematócrito.

Na contagem diferencial, um total de 100 leucócitos por lâmina era contado, diferenciando-os conforme as diferentes linhagens destas células (neutrófilos, eosinófilos, basófilos e linfócitos) usando-se contador eletrônico para células sanguíneas Kacil CCS-02.

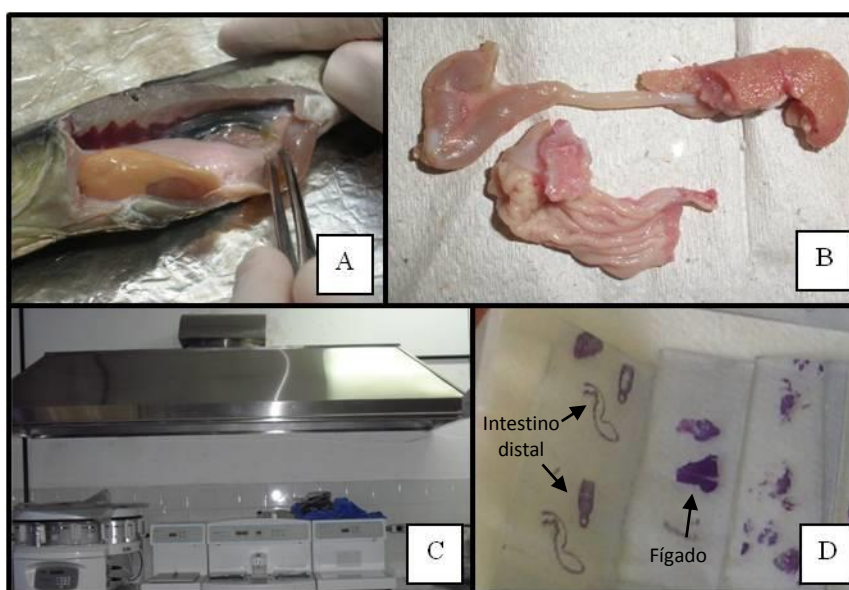
4.5.2 Coleta, processamento das amostras e análise dos demais tecidos

Após a coleta do sangue, a cavidade celomática era aberta com auxílio de pinças e bisturis para exposição dos órgãos internos. Estes eram observados quanto à integridade de suas estruturas e então era realizada a coleta de porções do fígado, estômago, intestinos anterior, médio e posterior (figura 2A e 2B).

Estas porções coletadas eram imediatamente imersas em solução de Davidson AFA para fixação. Os tecidos eram mantidos por 24 horas na solução de fixação que era então substituída por solução alcoólica a 70%, quando podiam então ser manipulados.

Na sequência, os tecidos eram processados em rotina histológica onde eram organizados em histocassetes e desidratados em série alcoólica crescente de 70%, 80%, 95% e 100%; diafanizados em xilol e infiltrados com parafina liquefeita num processador automático de tecidos LUPETEC PT05. Após infiltração, os tecidos eram emblocados em parafina com auxílio de um emblocador HESTION TEC 2800 (figura 2C).

Figura 2 – Técnicas e ferramentas utilizadas na coleta de tecidos do beijupirá, *Rachycentron canadum*.



Fonte: Autor. Em A, a exposição e coleta do trato digestório (alvo deste estudo) e em B maiores detalhes do estômago, intestinos e cecos pilóricos. Em C os equipamentos utilizados na desidratação, diafanização e emblocamento dos tecidos. Em D as lâminas preparadas para análise histológica.

Para montagem das lâminas histológicas foram realizados cortes a cinco micrômetros de espessura, em micrótomo LEICA MR2125RT. Os cortes eram postos em banho-maria para eliminação das dobras nos tecidos e então coletados em lâminas de vidro.

Após aderência dos tecidos às lâminas, estes foram corados em hematoxilina e eosina (H&E, figura 3D) e analisados ao microscópio óptico (Leica), utilizando-se índices propostos por Baeverfjord e Krogdahl (1996) adaptados para presente estudo (tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros comumente associados à enterite em peixes e as devidas pontuações para os graus de severidade.

Pontuação	Parâmetro	Pontuação	Parâmetro
	Vilosidades (V)		Vacuolização supranuclear (SNV)
1	Tamanho normal.	1	Sem vacuolização.
2	Alguma dilatação ou encurtamento.	2	Início de vacuolização.
3	Dilatação difusa e início de rompimento do tecido.	3	Aumento difuso da vacuolização.
4	Rompimento difuso do tecido.	4	Aumento no tamanho dos vacúolos.
5	Total rompimento dos tecidos.	5	Grande número e tamanho dos vacúolos.
	Células mucosas (CM)		Infiltração de leucófilos (IL)
1	Células dispersas (normal).	1	Pequena quantidade na submucosa.
2	Aumento do número e espaçamento das células.	2	Maior quantidade e na submucosa e alguma migração para a lâmina própria.
3	Número difuso e amplamente disperso.	3	Aumento da migração para a lâmina própria.
4	Células densamente agrupadas.	4	Número difuso na LP e na SM.
5	Células altamente abundantes.	5	Grande quantidade na LP e SM.
	Lâmina própria (LP)		Submucosa (SM)
1	Tamanho normal.	1	Normal.
2	Leve aumento do tamanho.	2	Leve aumento no tamanho.
3	Tamanho médio.	3	Tamanho médio.
4	Grande tamanho.	4	Grande.
5	Muito grande.	5	Muito grande.

Fonte: Baeverfjord e Krogdahl (1996). A tabela foi adaptada para avaliação do surgimento de enterite no beijupirá, *Rachycentron canadum*, devido à utilização de farelo de soja em sua dieta.

Os fígados foram analisados de forma qualitativa. As imagens foram obtidas através de uma câmera digital CANON Power shot S50 acoplada através do software Zoom browser EX.

Os dados obtidos das leituras e atribuições dos índices foram tratados estatisticamente no software SPSS 7.5 for Windows (Illinois, USA) através de teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

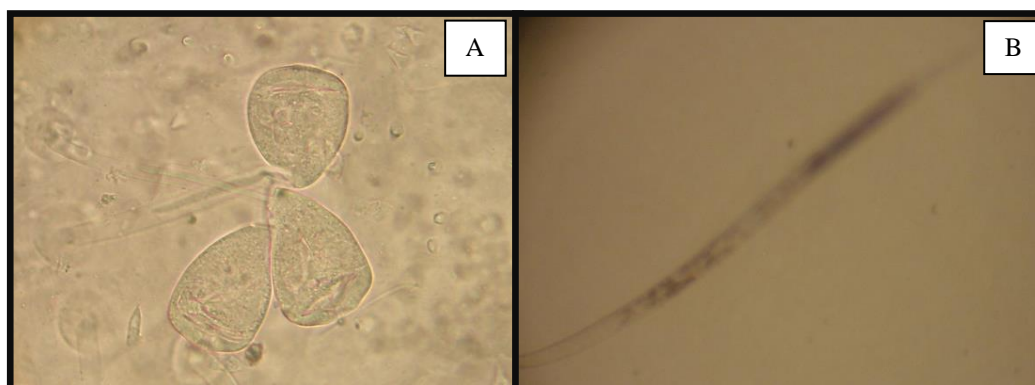
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados correspondentes à avaliação zootécnica do beijupirá irão integrar parte dos requisitos para a obtenção do título: Doutor em Ciências Marinhas Tropicais, em forma de tese, apresentados futuramente à banca do Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar – Labomar/UFC, pelo aluno Ricardo Camurça Pinto. No entanto, os dados de peso médio dos peixes, nos tratamentos conduzidos pela equipe do LANOA, foram gentilmente cedidos para efeitos de comparação com os resultados aqui apresentados, tornando possível o atendimento às metas objetivadas nesta dissertação.

5.1 Exame macroscópico

Dos trinta indivíduos amostrados, três apresentaram protozoários epibiontes do gênero *Epystilis* sp., e quatro indivíduos possuíam nematodos aderidos à sua superfície corporal, mas sem associação possível com as dietas testadas (figura 3).

Figura 3 – Micro-organismos removidos através de raspagem do muco do beijupirá, *Rachycentron canadum*, por ocasião da coleta dos espécimes após experimento conduzido pelo LANOA.



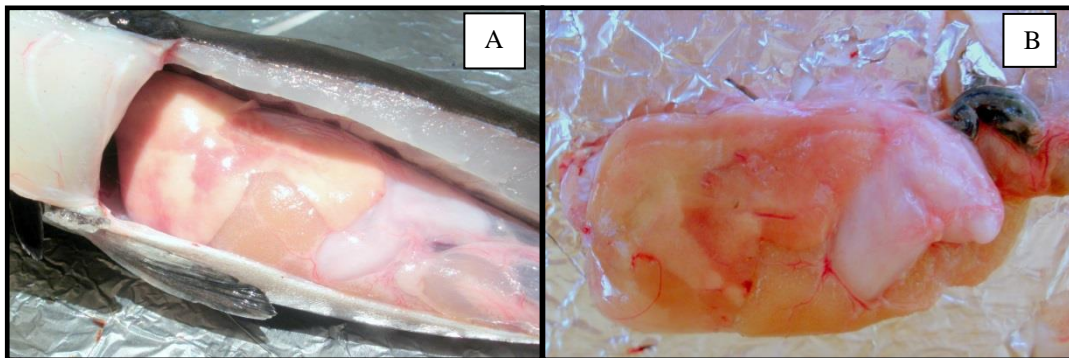
Fonte: Autor. Em A, visualização da estrutura peduncular do protozoário do gênero *Epystilis*. Em B, larvas de nematodos.

Embora sendo o beijupirá um peixe marinho, quando em contato com a água estuarina do Rio Pacoti, teve sua superfície corporal colonizada por protozoários de água doce. Provavelmente *Epystilis* sp. foram carreados pela água do rio e bombeados para o sistema experimental. Isto chama atenção para a eficácia do manejo profilático utilizado, onde a preocupação com a não contaminação do sistema experimental pelos compostos químicos utilizados exigia nova captação de água do estuário.

Além disso, o experimento de engorda visava manter o ambiente de cultivo o mais semelhante possível ao ambiente das fazendas comerciais, que em sua quase totalidade não empregam medidas rígidas de biossegurança.

Internamente, os indivíduos cujas dietas apresentavam maior proporção de farelo de soja mostraram tamanho hepático reduzido, bem como manchas amarronzadas no fígado e, em alguns casos, aspecto liquefativo deste órgão (figura 4).

Figura 4 – Fígado do beijupirá, *Rachycentron canadum*, mostrando lesões associadas à utilização de farelo de soja nas dietas após experimento conduzido pelo LANOA.



Fonte: Autor. A: manchas amarronzadas. B: Aspecto liquefativo do parênquima hepático.

5.2 Exames hematológicos

Os resultados das análises hematológicas dos organismos mostraram diferenças estatísticas para a contagem dos neutrófilos segmentados (gráfico 1) e linfócitos (gráfico 2) ao nível de significância de 5%.

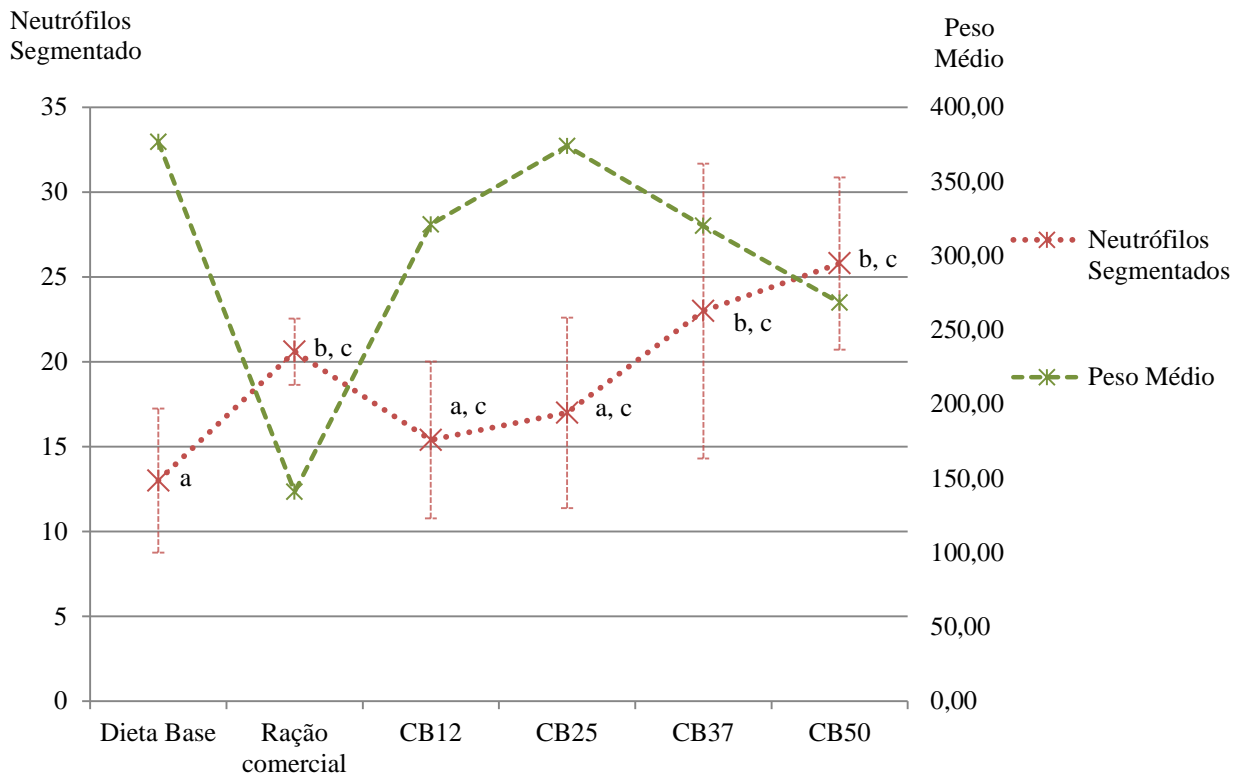
O comportamento das contagens de linfócitos e de neutrófilos para a dieta comercial e para as dietas CB37 e CB50, assemelha-se a situações em que os indivíduos enfrentam algum problema de ordem inflamatória, como enterite, onde há uma diminuição na contagem de linfócitos (ALVAREZ *et al.*, 1988), e um aumento dos neutrófilos.

Sabe-se que os granulócitos, e em particular os neutrófilos, migram para as regiões afetadas durante infecções iniciando a resposta imune inata (MORAES; MORAES, 2009; PINHEIRO DA SILVA; SORIANO, 2009).

Rijn e Reina (2010) observaram um aumento na relação entre granulócitos/linfócitos para o tubarão, *Cephaloscyllium laticeps*, submetido a estresse em condições laboratoriais. Este achado poderia sugerir que as alterações encontradas neste trabalho seriam decorrentes do estresse sofrido pelos peixes durante a manipulação. No entanto, o fato dessa alteração só haver se manifestado nos tratamentos com maiores níveis de

farelo de soja, somado às mesmas condições de manipulação entre os tratamentos, enfraquecem esta hipótese.

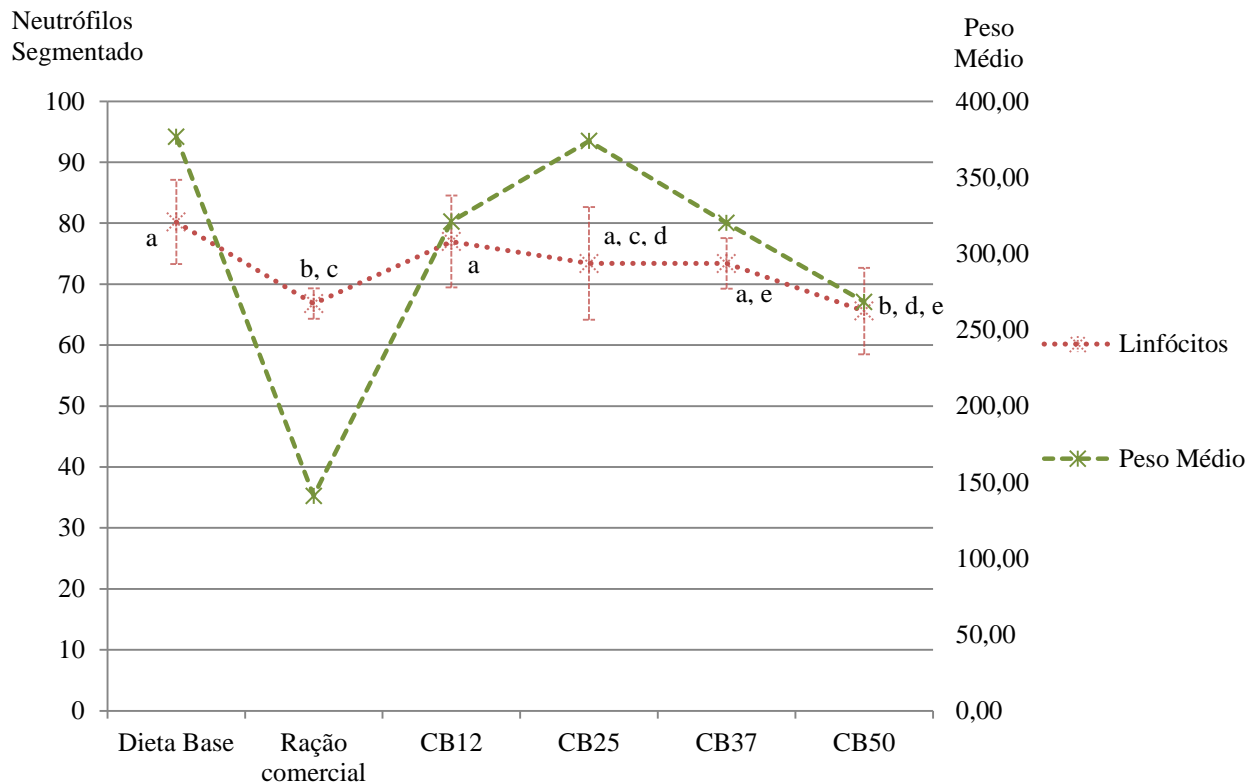
Gráfico 1 – Contagem dos neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\text{mm}^3$) para as dietas testadas para o beijupirá, *Rachycentron canadum*, após experimento conduzido pelo LANOA e peso médio (em gramas) dos indivíduos.



Fonte: Autor. Letras iguais indicam ausência de significância estatística entre as dietas. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância.

Outra hipótese que poderia ser levantada quanto à variação dos leucócitos neste experimento, seria o fato de que a mesma deveu-se à aplicação do sulfato de cobre como medida profilática. Contudo, além da aplicação ter ocorrido por um curto período e a uma concentração pequena, Tavares-Dias *et al.* (2011) mostraram que todos os leucócitos de tambaqui, *Colossoma macropomum*, tiveram contagens inferiores quando tratados com sulfato de cobre em diferentes concentrações, não somente os linfócitos. Diferentemente, neste trabalho os neutrófilos apresentaram contagens superiores nos tratamentos que receberam dietas com maiores inclusões de farelo de soja.

Gráfico 2 – Contagem dos linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) para as dietas testadas para o beijupirá, *Rachycentron canadum*, após experimento conduzido pelo LANOA e peso médio (em gramas) dos indivíduos.

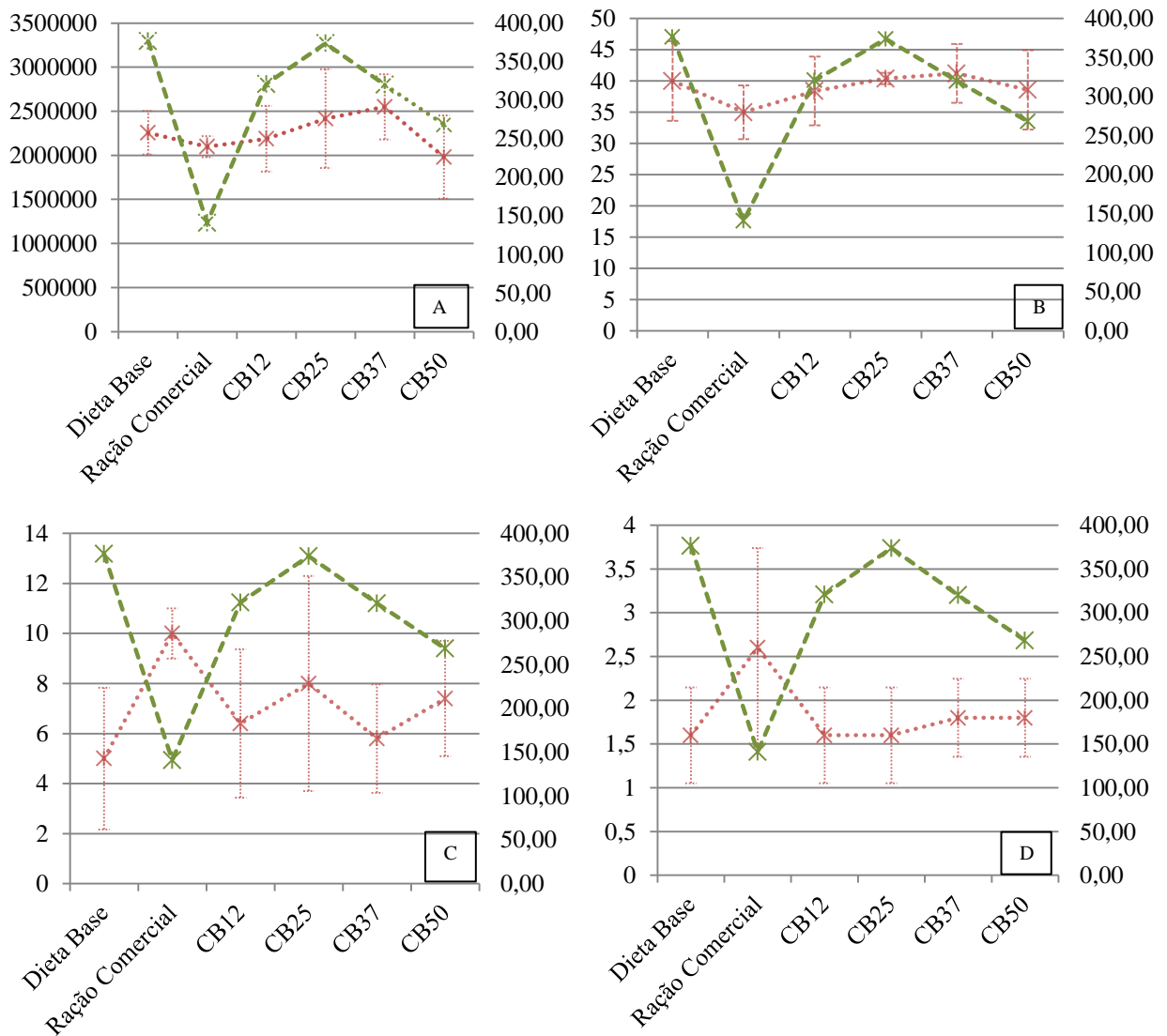


Fonte: Autor. Letras iguais indicam ausência de significância estatística entre as dietas. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância.

Um resultado interessante encontrado neste trabalho é que a dieta comercial e aquelas com maior conteúdo vegetal (CB37 e CB50) impactaram de forma semelhante, e sem diferença estatística entre elas, nas respostas imunológicas do beijupirá. Este resultado leva a crer que a dieta comercial testada possui níveis elevados de componentes vegetais.

Outros parâmetros hematológicos sugeriram variação entre os tratamentos, no entanto, esta variação não foi significativa para o nível de 5%. Pode-se atribuir esta ausência de significância ao elevado desvio padrão das médias encontradas e ao baixo número amostral analisado. Por outro lado, comparando-se visualmente a variação das médias desses parâmetros entre as dietas testadas à diferença entre as médias dos pesos dos indivíduos no gráfico 3, nota-se certa correspondência entre os dados, embora sem confirmação pela ferramenta estatística.

Gráfico 3 – Variação dos demais parâmetros hematológicos entre as dietas testadas para o beijupirá, *Rachycentron canadum*, após experimento conduzido pelo LANOA e peso médio (em gramas) dos indivíduos.



Em A, o comportamento da contagem de eritrócitos (cel/mm³), em B do hematócrito (%), em C dos leucócitos jovens e em D dos monócitos, (ambos em cel/mm³).

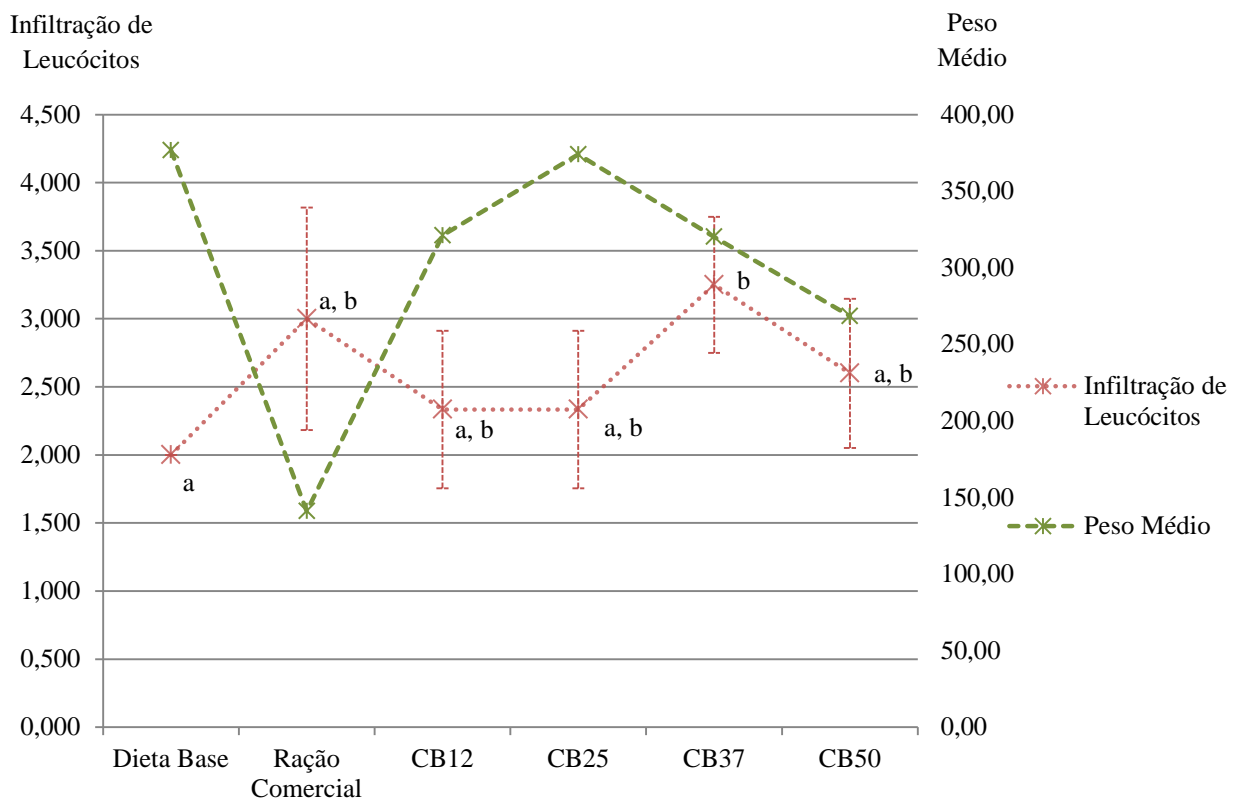
5.3 Exames histológicos do intestino e fígado

As análises histológicas mostraram dados relevantes sobre o efeito das dietas no aparecimento de lesões nos órgãos do beijupirá.

5.3.1 Intestino

Na região distal dos intestinos analisados, observaram-se a presença de vacúolos supranucleares nos enterócitos, infiltração de leucócitos na lâmina própria dos vilos, deformação estrutural das vilosidades, assim como variação na quantidade de células mucosas e espessura da submucosa intestinal em quase todos os tratamentos. À exceção da infiltração de eosinófilos, todas as características reportadas por Baeverfjord e Krogdahl (1996) como sinal de enterite no salmão do Atlântico, *Salmo salar*, foram observadas no beijupirá. Porém, os parâmetros que tiveram significância estatística entre as dietas testadas foram infiltração de leucócitos (gráfico 4) e vacuolização supranuclear (gráfico 5).

Gráfico 4 – Infiltração de leucócitos no intestino para as dietas testadas para o beijupirá, *Rachycentron canadum*, após experimento conduzido pelo LANOA e peso médio (em gramas) dos indivíduos entre os tratamentos.

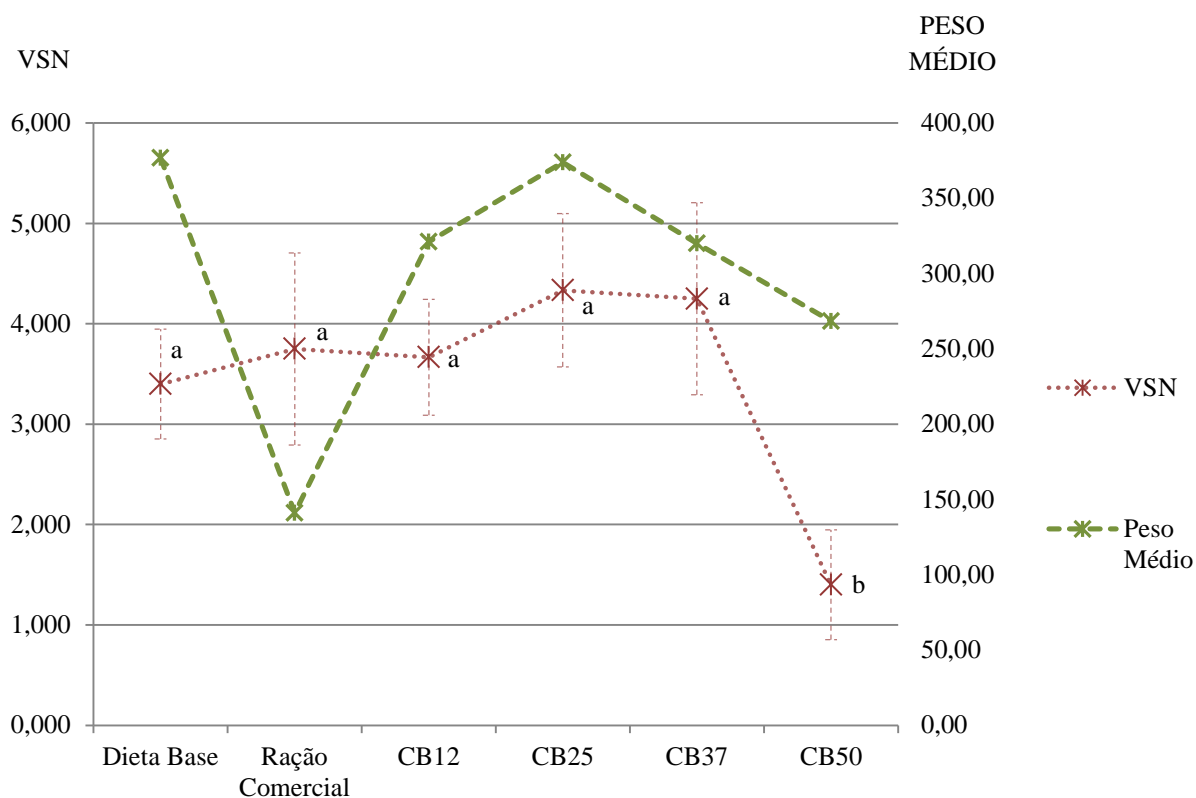


Fonte: Autor. Letras iguais indicam ausência de significância estatística entre as dietas. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância.

Embora a metodologia proposta por Baeverfjord e Krogdahl (1996) e os achados de Urán *et al.* (2008) apontem a infiltração por granulócitos eosinófilos como sinal de enterite no salmão do Atlântico, neste trabalho não foi observada relação desta linhagem de células

com enterite ocorrida no beijupirá. Contudo, à semelhança do que foi reportado por aqueles autores – Baeverfjord e Krogdahl (1996) e Urán *et al.* (2008) – uma mistura de células inflamatórias foi visualizada.

Gráfico 5 – Vacuolizações supranucleares entre as dietas testadas para o beijupirá, *Rachycentron canadum*, após experimento conduzido pelo LANOA e peso médio (em gramas) dos indivíduos entre os tratamentos.



Fonte: Autor. Letras iguais indicam ausência de significância estatística entre as dietas. Letras diferentes indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância.

Moraes e Moraes (2009) colocam a presença de eosinófilos como resultado da exposição prolongada do peixe ao agente agressor. No entanto, Baeverfjord e Krogdahl (1996) observaram infiltrações por eosinófilos no Salmão do Atlântico, *Salmo salar*, quando alimentados com dietas contendo farelo de soja durante um período experimental de apenas três semanas.

Urán *et al.* (2008) estudando o efeito da temperatura na severidade das enterites causadas pelo farelo de soja no salmão do Atlântico, constataram que esta é agravada em temperaturas mais elevadas, com a presença de eosinófilos na lâmina própria.

Contudo, as maiores temperaturas estudadas por esses autores (12°C) não podem ser comparadas à temperatura média da água durante o presente experimento (em torno dos

29°C). Tampouco o período experimental de ambos os trabalhos – Baeverfjord e Krogdahl (1996) e Urán *et al.* (2008) – podem ser comparados às oito semanas utilizadas com o beijupirá durante este experimento. Isto é ainda mais intrigante, pois seriam esperados sinais mais crônicos relacionados à enterite no beijupirá, incluindo-se a presença de eosinófilos na lâmina própria.

Obviamente que, por se tratarem de duas espécies de climas totalmente diferentes, o salmão, de águas frias de clima temperado, não pode ser tomado como um modelo em todos os aspectos biológicos para o beijupirá, de águas quentes e clima tropical. Principalmente para os leucócitos, ao se levar em conta a afirmação de DaMatta *et al.* (2009) que não existe ainda um padrão definido para classificação e morfologia de leucócitos de peixes, e ainda o fato da grande variação na composição celular do sangue entre as espécies.

De acordo com as análises hematológicas realizadas, a linhagem de células sanguíneas que aumentou com a inclusão do farelo de soja nas dietas foi a dos neutrófilos segmentados (gráfico 1). Isto poderia levar a crer que esses neutrófilos estariam relacionados à enterite no beijupirá, e não os eosinófilos.

Curiosamente, nos tratamentos em que se obteve a menor média para a infiltração de leucócitos na lâmina própria, o parâmetro que seguiu a tendência de decréscimo foi a contagem dos linfócitos (gráfico 2), sugerindo que a diminuição desses linfócitos foi responsável pela queda na contagem dos leucócitos.

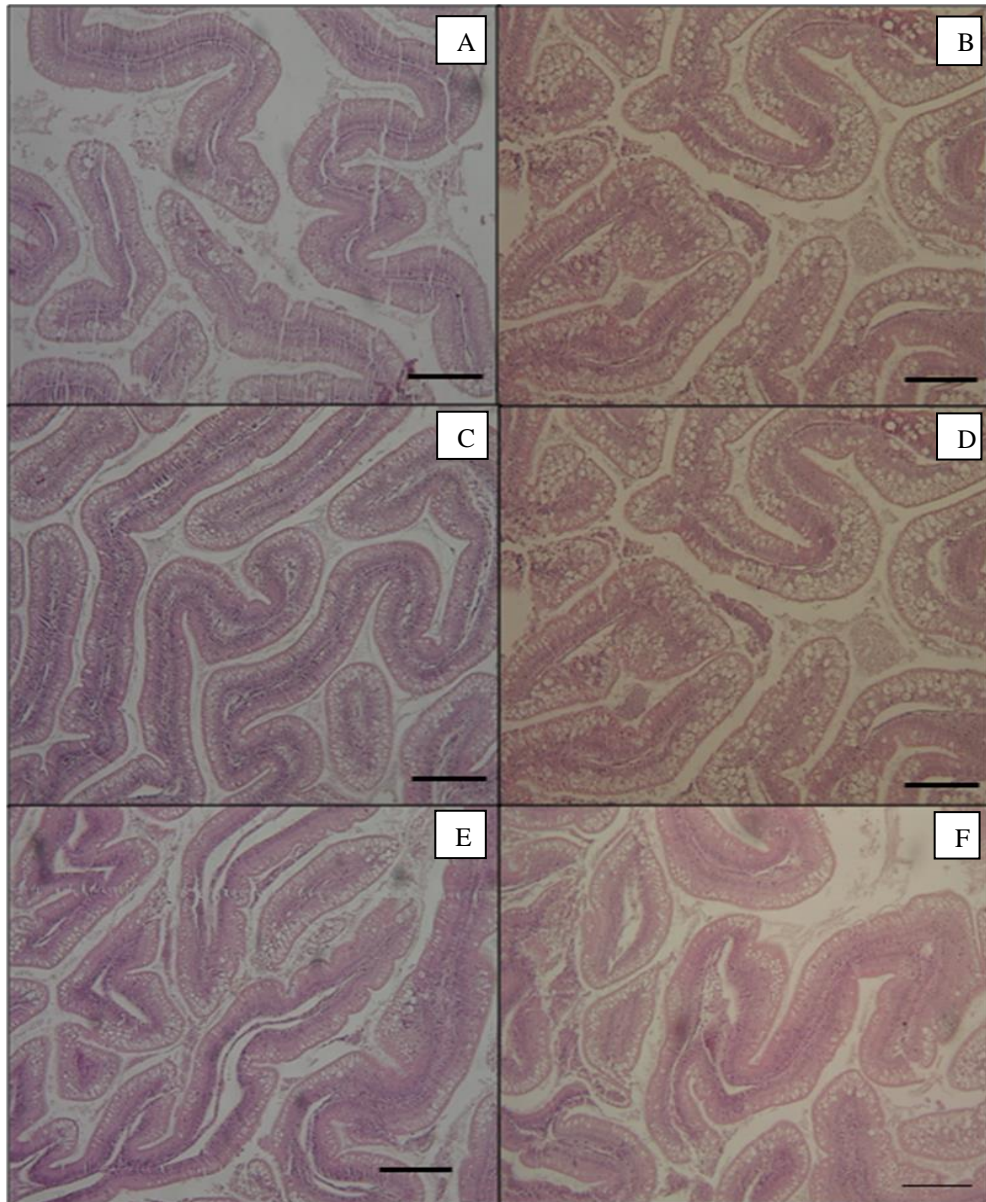
Assim, apesar da dificuldade de melhor observação da lâmina própria no tratamento CB50 (figura 5F), adotou-se a nomenclatura “infiltração de leucócitos” para designar o aporte de células inflamatórias na lâmina própria evidenciado neste trabalho, o que vai ao encontro do reportado por Venold *et al.* (2012).

Esses autores chamaram de infiltração de leucócitos o acúmulo de células sanguíneas e atribuíram às mesmas o alargamento da lâmina própria em um experimento que utilizou farelo de soja na dieta do salmão do Atlântico, *S. salar*.

Embora se tenha observado diferença estatística para a infiltração de leucócitos apenas entre a dieta basal e a dieta CB37 (gráfico 4), pode-se observar a tendência de aumento apresentada pelas médias deste parâmetro de acordo com o incremento do farelo de soja em detrimento à redução da farinha de peixe. Ainda na perspectiva do gráfico 4, o que é comprovado pela análise estatística dos dados, a dieta que mais se aproximou da dieta basal foi a CB12, com menor substituição da farinha de peixe pelo farelo da soja. Também se observou que a ração comercial apresentou uma tendência a assemelhar-se mais às dietas com maiores substituições da farinha de peixe, à exceção da dieta CB50.

Há que se considerar, no entanto, que o decréscimo apresentado na média dos escores atribuídos à infiltração de leucócitos para a dieta CB50 pode ser resultante de um possível mascaramento ocasionado por lesões mais severas na lâmina própria, onde se procuravam visualizar os leucócitos que migraram da submucosa (figura 5F).

Figura 5 – Padrão histológico geral do intestino distal do beijupirá, *Rachycentron canadum*, após experimento conduzido pelo LANOA.



Fonte: Autor. Em A indivíduos tratados com a dieta basal. Em B indivíduos tratados com ração comercial, em C, com a dieta CB12, em D, com a dieta CB25, em E, com a dieta CB37 e em F, com a dieta CB50. Barras: 10 μ m.

O elevado desvio padrão entre os valores dos tratamentos CB12, CB37 e da ração comercial não permitem uma maior clareza na interpretação dos resultados. Isto leva a uma reflexão acerca da resistência individual de cada organismo aos ingredientes que compõem as

dietas (FRANCIS; MAKKAR; BECKER, 2001). Há também que se levar em conta o fato de que exposições a determinados ingredientes, por sucessivas gerações de peixes, torna possível a seleção de linhagens tolerantes a esses ingredientes (VENOLD *et al.*, 2012). Embora se acredite que esse elevado desvio padrão esteja relacionado ao baixo número amostral e consequente ausência de homogeneidade estatística entre eles.

Semelhante ao encontrado para a infiltração de leucócitos, a vacuolização supranuclear do tratamento CB50 pode ter sido mascarada pela presença de enterócitos atrofiados nos intestinos analisados. Qualitativamente, pode-se afirmar, no entanto, que maiores níveis de farelo de soja (CB37 e CB50) impactaram negativamente sobre a integridade celular intestinal dos animais.

A figura 5 representa o padrão estrutural dos intestinos nos seis tratamentos experimentais avaliados. A observação dos intestinos permite inferir sobre uma gradação quanto à severidade das lesões provocadas pelo farelo de soja nas dietas. Nota-se que os enterócitos parecem aumentar o volume de seus vacúolos supranucleares, na medida em que se aumenta a proporção de farelo de soja para substituir até 25% da farinha de salmão (figuras 5A, 5C e 5D).

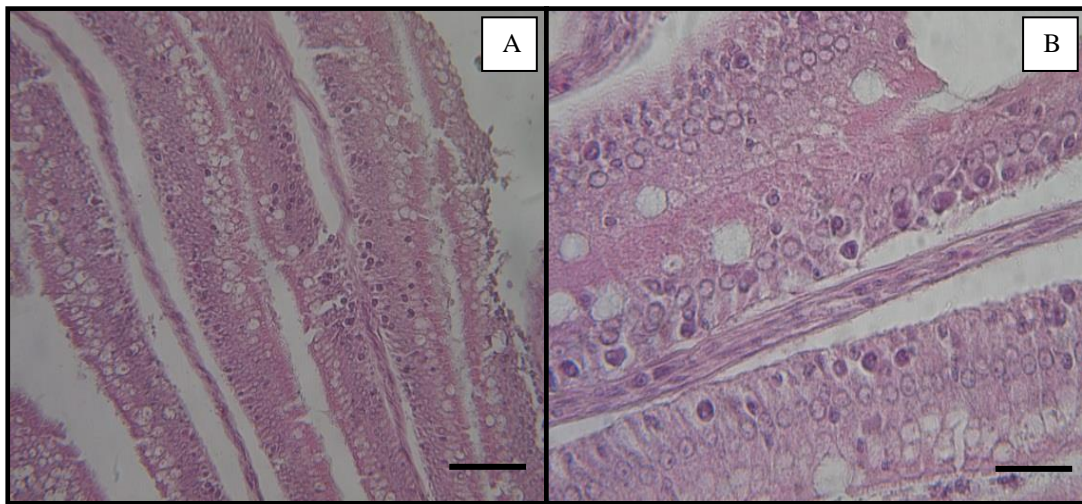
A partir da substituição de 37% da farinha de peixe pela proteína do farelo de soja (CB37), começou-se a observar que os vacúolos regrediram em tamanho e em frequência nos enterócitos e que a lâmina própria já não era visível em grande parte das vilosidades do intestino distal (figura 5E).

Na dieta em que a substituição por farelo de soja atingiu 50% da farinha de peixe, já não se observavam mais vacúolos nos enterócitos e a lâmina própria estava em grande parte despreendida do epitélio intestinal. Quando visível, a lâmina própria apresentava-se alargada e preenchida de leucócitos (figura 5F). Este fato reforça a hipótese de que os resultados encontrados para a infiltração de leucócitos estejam mascarados nos indivíduos provenientes do tratamento CB50.

Uma hipótese encontrada para explicar essa diminuição do número e tamanho dos vacúolos nos enterócitos é a possível regeneração dos tecidos afetados pelas dietas. Esta hipótese é suportada pelos achados de Bakke-McKellep *et al.* (2007b) que relacionam a perda de funcionalidade do tecido intestinal à sua elevada proliferação e apoptose, e consequentemente à imaturidade dos tecidos. Este resultado é semelhante àquele encontrado por Sanden *et al.* (2005) que, utilizando um anticorpo monoclonal, detectaram um aumento na proliferação celular no intestino distal do salmão do Atlântico, *Samo salar* – alimentado com dieta à base de 12,5% de farelo de soja – indicando uma maior regeneração dos enterócitos.

No presente trabalho foi encontrado um número relativamente alto de células mitóticas em meio às vilosidades intestinais dos peixes em todos os tratamentos, o que não permite verificar, com base neste parâmetro, relação entre a presença do farelo de soja e a intensidade na regeneração dos tecidos (figura 6). No entanto, observa-se que as vacuolizações são reduzidas ou inexistentes próximo aos núcleos mitóticos.

Figura 6 – Grande número de células mitóticas nas vilosidades do intestino distal do beijupirá, *Rachycentron canadum*, após experimento conduzido pelo LANOA.



Fonte: Autor. Em A, barra = 5 µm, em B, barra = 2 µm.

Lin e Luo (2011) reportaram que a atividade enzimática das proteases no híbrido de tilápia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, foi afetada pela elevada inclusão de farelo de soja substituindo a farinha de peixe das dietas e sugerem que tal diminuição está relacionada à presença de fatores antinutricionais no farelo de soja. Partindo-se desse princípio, é provável que aspectos enzimáticos estejam envolvidos no surgimento de patologias morfológicas nos tecidos do beijupirá, como já reportado por Bakke-McKellep *et al.* (2000) para o salmão do Atlântico.

A presença de fatores antinutricionais como ácido fítico, saponinas, entre outros, está relacionada à soja e seus derivados (NRC, 1993; 2011). O ácido fítico é sabidamente responsável por reduzir a estabilidade da tripsina, se combinar com proteínas em pH baixo e formar complexos insolúveis ou parcialmente solúveis com elas, e ainda se complexar com íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , dentre outros, tornando essas moléculas indisponíveis para assimilação.

Hossain e Jauncey (1993) encontraram que a inclusão de 10 g de ácido fítico foi responsável pelo surgimento de vacuolizações no epitélio intestinal da carpa comum, *Cyprinus carpio*. Lesões estas semelhantes às encontradas no presente trabalho, em todos os

tratamentos derivados da dieta base até 37% de substituição (figura 5). Entretanto, as vacuolizações diminuíram em níveis mais elevados de inclusão de farelo de soja, à semelhança do reportado por Bakke-McKellep *et al.* (2000).

Knudsen *et al.* (2008) comprovaram que a saponina está relacionada ao surgimento de enterite no salmão do Atlântico, *S. salar*, quando associada ao farelo da amêndoa do tremoço, *Lupinus angustifolius*, mas não causa enterite por si só. A saponina é responsável pelo aumento na permeabilidade do epitélio intestinal, permitindo a passagem de compostos normalmente não absorvidos, o que poderia estar envolvido com o surgimento de inflamações no intestino (NRC, 2011).

De acordo com os apanhados da NRC (2011), alguns compostos alergênicos injetados no intestino distal dos peixes levam a fortes respostas do sistema imune e, segundo os mesmos autores, a soja possui compostos sabidamente alergênicos a muitos animais, incluindo os seres humanos. Assim, a presença de saponinas em consórcio com estes compostos poderia potencializar os efeitos inflamatórios diagnosticados neste trabalho.

Isto sugere que as lesões observadas histologicamente podem ser decorrentes da combinação de diversos fatores antinutricionais e alergênicos intrínsecos aos derivados de soja, ou ainda a possíveis contaminantes danosos à saúde dos peixes, que tenham entrado em contato com a soja, ou seus derivados. Sabe-se ainda que o intestino distal de teleósteos apresenta elevada capacidade de endocitose, o que os torna mais susceptíveis a doenças transmitidas por alimentos (BAKKE-MCKELLEP *et al.*, 2000).

Sealey *et al.* (2009) encontraram resultados muito semelhantes aos aqui reportados para alterações na morfologia do intestino distal, quando utilizaram níveis de inclusão de 43% de farelo de soja na ração de crescimento direcionada à truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*. Mas esses autores não discutiram o surgimento desses vacúolos de grande tamanho na região supranuclear dos enterócitos.

Algumas substâncias tóxicas, como micotoxinas, podem contaminar ingredientes comumente utilizados na produção de rações em alguma etapa de sua produção, processamento, estocagem ou transporte (NRC, 2011). Estimativas do CAST (2003) dizem que 25% de todos os grãos são contaminados com micotoxinas. Assim, há a possibilidade que a presença de alguma dessas micotoxinas esteja causando reações adversas ao desempenho dos animais.

5.3.2 Fígado

No fígado, à medida que os níveis de farelo de soja foram aumentados, foi observada uma perda no tamanho dos vacúolos dos hepatócitos. Além disso, nas dietas CB25, CB37 e CB50, houve um aumento gradativo de infiltrações leucocíticas no parênquima hepático (hepatite), como também congestão dos sinusóides (figuras 7D, 7E e 7F). Lesões desta natureza são reportadas por Blazer e Smith (2007) sinalizando deficiência dietária em fósforo.

Os fígados dos peixes que receberam a dieta comercial apresentaram hepatócitos sem vacúolos, ou quando presentes, bastante reduzidos em tamanho e número (figura 7B).

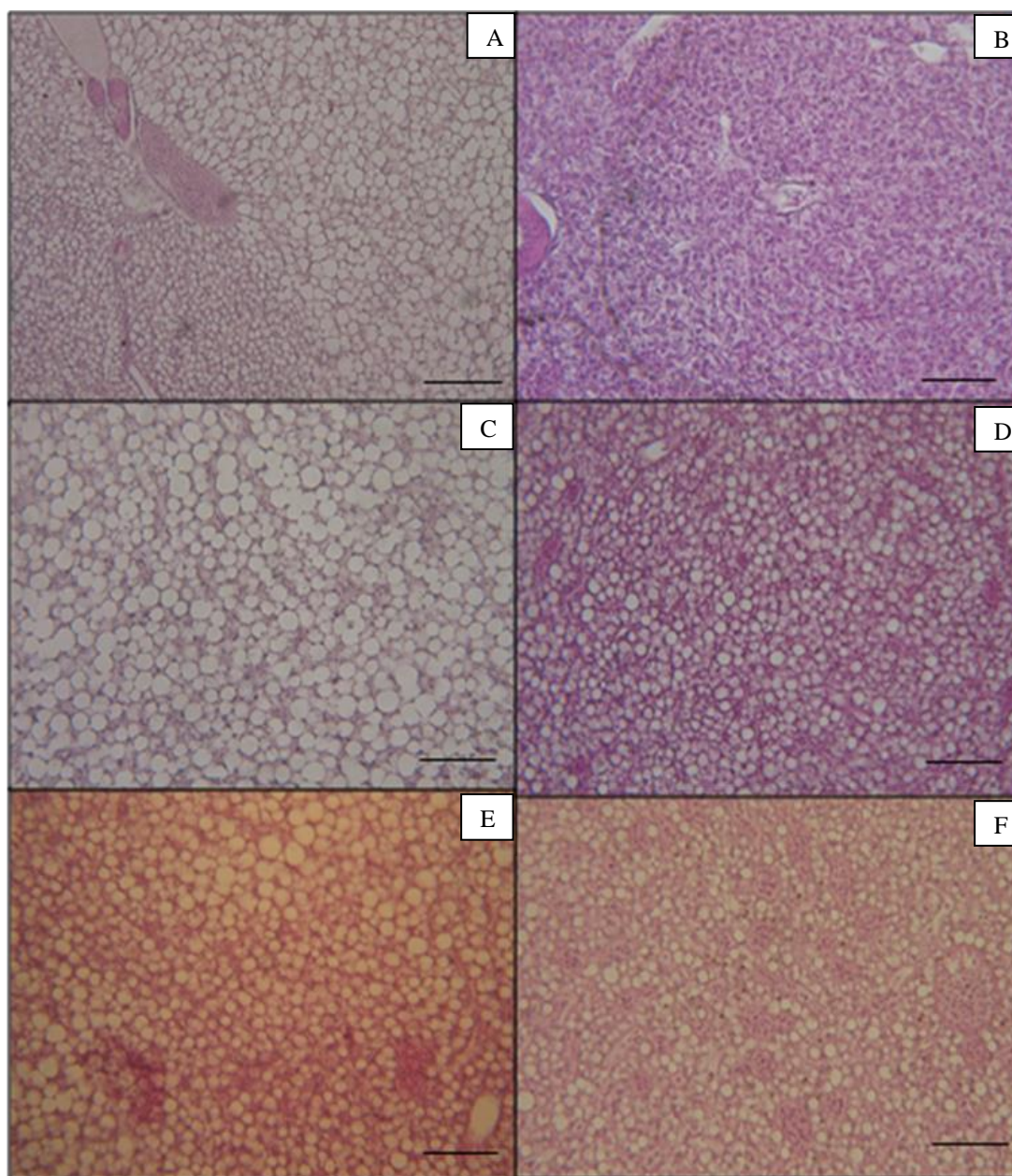
Em todos os tratamentos houve o aparecimento de lesões necróticas no parênquima hepático. Contudo, não foi possível atribuir uma relação entre o aparecimento de necrose e a utilização do farelo de soja. Nestas lesões era possível visualizar, além da área de hepatócitos com a membrana celular destruída, núcleos hipertrofiados e densamente basofílicos e áreas de regeneração, característicos de tal lesão (figura 8).

Kowalska *et al.* (2010) observaram alterações histológicas semelhantes àquelas encontradas nesta pesquisa, quando testaram a utilização de óleos vegetais na substituição do óleo de peixe em rações para a perca (*pikeperch*), *Sander lucioperca*. Estas mudanças nos padrões dos tecidos foram associadas ao perfil dos ácidos graxos encontrados nos óleos avaliados, onde o conteúdo de ácidos graxos saturados e altamente insaturados causou diminuição do tamanho dos vacúolos lipídicos nos hepatócitos e aumento de vacúolos no citoplasma dos enterócitos.

Nas dietas formuladas para o presente trabalho, em virtude do baixo teor de gordura do farelo de soja (0,9 a 1,5%) frente à farinha de salmão (10%), procurou-se manter o conteúdo lipídico constante ao nível de 12% da dieta.

Utilizou-se óleo de peixe para se manter este nível de lipídios nas dietas experimentais, já que o déficit de lipídios devido à substituição da farinha de peixe é do próprio óleo de peixe. Assim, de acordo com a literatura (BOWYER *et al.*, 2012; KOWALSKA *et al.*, 2010; ROBAIANA, *et al.* 1998), é pouco provável que as lesões encontradas neste trabalho estejam associadas ao balanço de ácidos graxos, sobretudo quando se observa que, nos intestinos, houve uma diminuição das vacuolizações decorrente do emprego da dieta CB50 que recebeu maior suplementação de óleo de peixe.

Figura 7 – Padrão histológico do fígado do beijupirá, *Rachycentron canadum*, após experimento conduzido pelo LANOA.

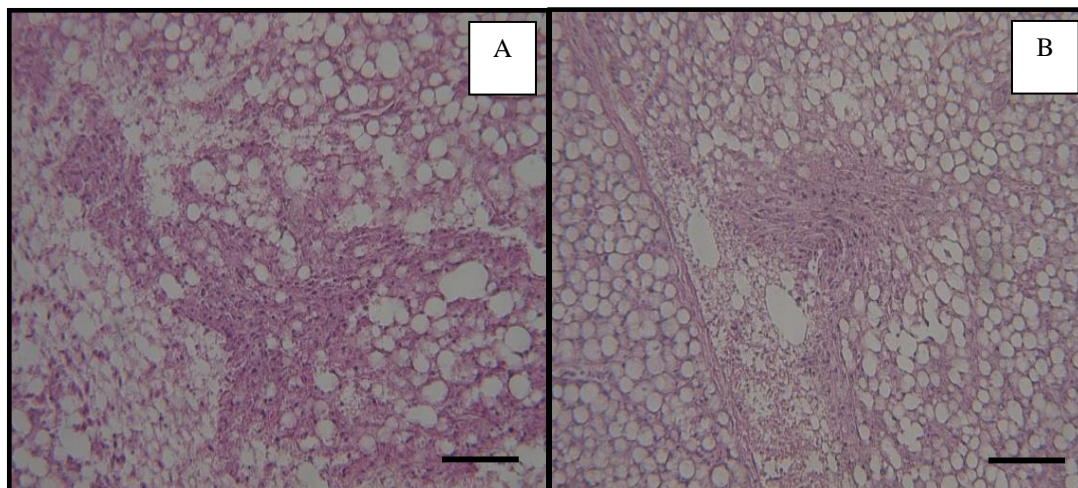


Fonte: Autor. Em A, indivíduos tratados com a dieta basal. Em B, indivíduos tratados com ração comercial, em C, com a dieta CB12, em D, com a dieta CB25, em E, com a dieta CB37 e em F, com a dieta CB50. Barra: 5 μ m.

Há que se considerar ainda, que a rancificação de lipídios está relacionada ao aparecimento de lesões nos tecidos, sobretudo no fígado (NRC, 1993, 2011). No mesmo instante, o aumento da suplementação lipídica deveria agravar o quadro das lesões nos fígados analisados o que, pelo observado microscopicamente, se expressou como congestão e não como lesões degenerativas, embora a observação macroscópica tenha revelado fígados com

aspecto bastante degenerado (figura 4B). Diante disto, maior atenção deve ser dada à qualidade do óleo de peixe utilizado na fabricação das dietas.

Figura 8 – Área necrótica do fígado do beijupirá, *Rachycentron canadum*, após experimento conduzido pelo LANOA.



Fonte: Autor. Barra = 5 µm.

No que diz respeito à dieta comercial, à luz de um raciocínio imediato, poderia associar-se a pequena vacuolização dos hepatócitos ao nível lipídico da dieta (8%). O beijupirá é uma espécie sem bexiga natatória e, pelo observado nas dissecações realizadas neste trabalho, quase não acumula gordura visceral, mesmo alimentado com dietas ao nível de 12% de gordura.

A observação histológica dos fígados que receberam a dieta base, com hepatócitos grandes, indica que à semelhança de elasmobrânquios – como reportado por Bone e Moore (2007) – o beijupirá armazena gordura no fígado para, dentre outras funções, manter-se na coluna d'água. Soma-se a isto o fato de a natação ativa da espécie demandar mais energia. Com base nesta hipótese, é possível supor que os 8% de gordura na dieta comercial não sejam suficientes para atender os requerimentos energéticos da espécie.

Esta observação vai contra o reportado por Chou *et al.* (2001) em que é sugerido um nível ótimo em torno de 5,76% de gordura nas dietas para esta espécie.

No que se refere às alterações no intestino, a dieta comercial revelou-se mais semelhante à dieta CB25 do ponto de vista qualitativo. Considerando-se o total desconhecimento dos ingredientes que compõem a dieta comercial, compará-la às demais rações avaliadas somente é possível sob a ótica das lesões encontradas, haja vista se conhecer

apenas os conteúdos lipídico e proteico desta ração, nos quais já difere sobremaneira das dietas experimentais.

Acredita-se que a maior contribuição desta dieta comercial no experimento realizado seja para efeito comparativo dos dados de desempenho zootécnico, embora do ponto de vista sanitário esta ração tenha se apresentado como de baixa qualidade.

6 CONCLUSÕES

Ao fim do experimento foram observados microrganismos comuns ao ambiente de captação da água utilizada, mas sem a presença de sinais clínicos associados a patologias ocasionadas por estes.

O uso combinado da histologia com os parâmetros hematológicos, mostrou-se eficiente na avaliação dos efeitos de ingredientes vegetais sobre a sanidade dos organismos em experimentação.

Pelo aqui apresentado, conclui-se que o farelo de soja pode ser utilizado substituindo 12% da farinha de peixe dietária, o que corresponde a 24,6% composição dietária, sem danos significativos à saúde dos juvenis de beijupirá, *Rachycentron canadum*.

O nível de 25% de substituição da farinha de peixe por farelo de soja (33% de inclusão), embora não tenha impactado de forma significativa no intestino distal do beijupirá e no peso médio, apresentou-se iniciando alterações no fígado desta espécie que poderiam se agravar com o maior tempo cultivo com este percentual de inclusão. Essas alterações se agravaram com maiores substituições do ingrediente.

Técnicas complementares à histologia poderiam fornecer maiores detalhes sobre os efeitos de ingredientes alternativos à proteína marinha na morfologia e fisiologia dos organismos aquáticos.

A dieta comercial utilizada neste trabalho, além de um desempenho menor dos indivíduos, mostrou impactar de forma negativa na sanidade do beijupirá, seja pela presença de fatores antinutricionais ou pelo não atendimento das necessidades nutricionais da espécie. Isto pode comprometer o sucesso dos cultivos que se iniciam no País, por não proporcionar o desempenho satisfatório aos investimentos neste negócio, além de criar uma imagem negativa acerca do verdadeiro potencial da espécie.

Mais estudos devem ser fomentados e conduzidos em busca de conhecimento sobre as reais necessidades nutricionais da espécie, melhores custos de produção comercial, susceptibilidade aos fatores antinutricionais, uma vez que em outros países o cultivo do beijupirá vem se desenvolvendo de forma tão promissora e exponencial.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, F.; RAZQUIN, B.; VILLENA, A.; FIERRO, P. L.; ZAPATA, A. Alterations in the peripheral lymphoid organs and differential leukocyte counts in *Saprolegnia*-infected brown trout, *Salmo trutta fario*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 18, p. 181-193, 1988.
- ANDRADE, T. P.; HOLANDA, M. B. C.; COELHO, M. G.; APOLINÁRIO, D. F.; ARAÚJO, P. F. R.; CAVALCALNTE, R. L.; GESTEIRA, T. C. V. Primeiro registro de infestação por *Caligus* sp. associada com mortalidade do beijupirá, *Rachycentrum canadum*, em viveiro escavado no estado do Ceará, entre junho e agosto de 2010. ano 1, n. 3, p. 3, novembro, 2010. **Beijupirá News**. Disponível em: <http://www.labomar.ufc.br/images/stories/arquivos/beijupira/bn_1_3_thales.pdf>. Acesso em 01 abr. 2013.
- AQUAMAPS. Disponível em: <<http://www.aquamaps.org/receive.php>>. Acesso em: 22 mar. 2013.
- ARENDDT, M. D.; OLNEY J. E.; LUCY, J. A. Stomach content analysis of cobia, *Rachycentron canadum*, from lower Chesapeake Bay. **Fishery Bulletin**. v. 4, n. 99, p. 665–670, 2001.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO. **Balança comercial de Pescado Jan – Set – 2011**. Disponível em: <<http://www.abccam.com.br/estatisticas>>. Acesso em: 19 mar. 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAMARÃO. **Balança comercial de Pescados Ano 2012**. Disponível em: <<http://www.abccam.com.br/estatisticas>>. Acesso em: 19 mar. 2013.
- BAEVERFJORD, G.; KROGDAHL, Å. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. **Journal of fish diseases**. v. 19, p. 375–387, 1996.
- BAKKE-MCKELLEP, A.M.; PRESS, C. M.; BAEVERFJORD, G.; KROGDAHL, Å.; LANDSVERK, T. Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal-induced enteritis. **Journal of Fish Diseases**. v. 23, p. 115–127, 2000.
- BAKKE-MCKELLEP, A. M.; KOPPANG, E. O.; GUNNES, G.; SANDEN, M.; HEMRE, G-I; LANDSVERK, T.; KROGDAHL, Å. Histological, digestive, metabolic, hormonal and some immune factor responses in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed genetically modified soybeans. **Journal of Fish Diseases**. v. 30, p. 65–79, February, 2007a.
- BAKKE-MCKELLEP, N. M.; PENN, M. H.; SALAS, P. M.; REFSTIE, S.; SPERSTAD, S.; LANDSVERK, T.; RINGØ, E.; KROGDAHL, Å. Effects of dietary soybean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **British Journal of Nutrition**. v. 97, n. 4, p. 699–713, April, 2007b.
- BENETTI, D. Cobia aquaculture expanding in Americas, Caribbean. **Global Aquaculture Advocate**. p. 46–48, March/April, 2008.
- BENETTI, D.; O'HANLON, B.; RIVERA, J. A.; WELCH, A. W.; MAXEY, C.; ORHUN, M. R. Growth rates of cobia (*Rachycentron canadum*) cultured in open ocean submerged cages in the Caribbean. **Aquaculture**. v. 302, p. 195–201, 2010.
- BLAABJERG, K.; CARLSSON, N-G.; HANSEN-MØLLER, J.; POULSEN, H.D. Effect of heat-treatment, phytase, xylanase and soaking time on inositol phosphate degradation in vitro in wheat, soybean meal and rapeseed cake. **Animal Feed Science and Technology**. v. 162, p. 123–134, 2010.
- BLAZER, V.; SMITH, C. Non-Infectious Diseases. In: **Fish Histology and Histopathology**. (MUMFORD, S.; HEIDEL, J.; SMITH, C.; MORRISON, J.; MACCONNELL, B.; BLAZER, V.) cap 7. United States Fish & Wildlife Service. p. 22, July, 2007.
- BONE, Q.; MOORE, R.H. Buoyancy In: **Biology of fishes**. Taylor & Francis Group. Abingdon, UK. 2007.

- BOWYER, J. N.; QIN, J. G.; ADAMS, L. R.; THOMSON, M. J.S.; STONE, D. A. J. The response of digestive enzyme activities and gut histology in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) to dietary fish oil substitution at different temperatures. **Aquaculture**. v. 368–369, p. 19–28, 2012.
- CONCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins: Risk in plant, animal, and human systems**. Ames, IA. 2003.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira. Grãos Safra 2012/2013 sexto levantamento Março, 2013**. Brasília–DF. Conab, 2013.
- COLLETTE, B. B. Rachycentridae. Cobia. In CARPENTER, K. E.; NIEM, V. H. (eds.). **FAO species identification guide for fishery purposes. The living marine resources of the Western Central Pacific**. Bony fishes part 2 (Mugilidae to Carangidae). FAO, Rome, 1999. v. 4, p. 2655.
- CHOU, R. L.; SU, M. S.; CHEN, H. Y. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**. v. 193, p. 8–89, 2001.
- CRAIG, S. R.; SCHWARZ, M. H.; MCLEAN, E. Juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) can utilize a wide range of protein and lipid levels without impacts on production characteristics. **Aquaculture**. v. 261, p. 384–391, 2006.
- DERSJANT-LI, Y., 2002. The use of soy protein in aquafeeds. In: **Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola**. 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- ESCAFFRE, A.; KAUSHIK, S.; MAMBRINI, M. Morphometric evaluation of changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) due to fish meal replacement with soy protein concentrate. **Aquaculture**. v. 273, p. 127–138, 2007.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Cultured Aquatic Species Information Programme *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766)**. In: Fisheries and Aquaculture Department. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rachycentron_canadum/en>. Rome,. Acesso em: 16 mai. 2011.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 22 mar. 2013.
- FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant- derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Review article, **Aquaculture**. v. 199, p. 197–227, 2001.
- FRANKS, J. S.; GARBER, N. M.; WARREN, J. R. Stomach contents of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, from the northern Gulf of Mexico. **Fishery Bulletin**. v. 2, p. 94, 1996.
- GATLIN, D. M.; BARROWS, F. T.; BROWN, P.; DABROWSKI, K.; GAYLORD, T. G.; HARDY, R. W.; HERMAN, E.; HU, G.; KROGDAHL, Å.; NELSON, R.; OVERTURF, K.; RUST, M.; SEALEY, W.; SKONBERG, D.; SOUZA, E. J.; STONE, D.; WILSON, R.; WURTELE, E. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. **Aquaculture Research**. v. 38, p. 551–579, 2007.
- GATLIN, D. M. III. Non-infectious Diseases: Nutritional Factors. In: **Fish Diseases**. EIRAS, J. C.; SEGNER, H.; WAHLI, T.; KAPOOR, B. G. (eds). Oxon, UK: CABI. 2008. n. 2, p. 1201–1224.
- GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. **American Journal of Clinical Pathology**, Baltimore, v. 56, n. 1, p. 35–39, 1971.
- HEIKKINEN, J., VIELMA, J., KEMILÄINEN, O., TIROLA, M., ESKELINEN, P., KIURU, T., NAVIA-PALDANIUS, D., VON WRIGHT, A., Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**. v. 261, p. 259–268, 2006.

- HOSSAIN, M. A.; JAUNCEY, K. The effects of varying dietary phytic acid, calcium and magnesium levels on the nutrition of common carp, *Cyprinus carpio*. In: Fish Nutrition in Practice . IVth International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. INRA (ed.), pp. 705–715. INRA, Paris, France. 1993
- HU, L.; YUN, B.; XUE, M.; WANG, J.; WU, X.; ZHENG, Y.; HAN, F. Effects of fish meal quality and fish meal substitution by animal protein blend on growth performance, flesh quality and liver histology of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). **Aquaculture**. v. 372–375, p. 52–61, 2013.
- KHAJEPOUR, F.; HOSSEINI, S.A. Citric acid improves growth performance and phosphorus digestibility in Beluga (*Huso huso*) fed diets where soybean meal partly replaced fish meal. **Animal Feed Science and Technology**. v. 171, p. 68–73, 2012.
- KNUDSEN, D.; JUTFELT, F.; SUNDH, H.; SUNDELL, K.; KOPPE, W.; FRØKIÆR, H. Dietary soya saponins increase gut permeability and play a key role in the onset of soyabean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). **British Journal of Nutrition**. v. 100, p. 120–129, 2008.
- KOWALSKA, A.; ZAKĘŚ, Z.; JANKOWSKA, B.; SIWICKI, A. Impact of diets with vegetable oils on the growth, histological structure of internal organs, biochemical blood parameters, and proximate composition of pikeperch *Sander lucioperca* (L.). **Aquaculture**. v. 301, p. 69–77, 2010.
- LIN, S.; LUO, L. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. **Animal Feed Science and Technology**. v. 168, p. 80–87, 2011.
- MACH, D.N.T.; NGUYEN, M.D.; NORTVERDT, R. Effects on digestibility and growth juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) fed fish or crab silage protein. **Aquaculture Nutrition**. v. 16, p. 305–312, 2010.
- MADRID, R. M.; NUNES, A.J.P. Cultivo do Beijupirá no Vietnã e os ensinamentos para o Brasil. **Revista da ABCC**. Ano XV, n. 2, p. 44–48, junho de 2013.
- MARSHALL, H.; FIELD, L.; AFIADATA, A.; SEPULVEDA, C.; SKOMAL, G.; BERNAL, D. Hematological indicators of stress in longline-captured sharks. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v. 162, p. 121–129, 2012.
- MARTÍNEZ-LLORENS, S.; BAEZA-ARIÑO, R.; NOGALES-MÉRIDA, S.; JOVER-CERDÁ, M.; TOMÁS-VIDA, A. Carob seed germ meal as a partial substitute in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Amino acid retention, digestibility, gut and liver histology. **Aquaculture**. v. 338–341, p. 124–133, 2012.
- MASSAD, C. Marine Farms Vietnam. **Beijupirá News**. Ano 1, n. 2, p. 4, Julho, 2010.
- MORAES, F.R.; MORAES, J. R.E. Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico In: TAVARES-DIAS, M (Org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**.. Embrapa Amapá. Macapá. 2009.
- NAGEL, F.; DANWITZ, A.; TUSCHE, K.; KROECKEL, S.; BUSSEL, C.G.J. SCHLACHTER, M.; ADEM, H.; TRESSEL, R.P.; SCHULZ, C. Nutritional evaluation of rapeseed protein isolate as fish meal substitute for juvenile turbot (*Psetta maxima L.*) — Impact on growth performance, body composition, nutrient digestibility and blood physiology. **Aquaculture**. v. 356–357, p.357–364, 2012.
- NUNES, A. J. P.; MADRID, R. M.; ANDRADE, T. P. Carcinicultura marinha no Brasil: Passado, Presente e Futuro. **Panorama da aquicultura**. v. 21, n. 124, março/abril, 2011.
- NUTRIENT REQUIREMENT OF FISH AND SHRIMP. Committee on the Nutrient Requirement of Fish and Shrimp, Board and Agriculture and Natural resources, Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the National Academies. The National Academies Press. Washington, D.C. 2011.
- OBEMEATA, O.; ADUABOBO, H. WOKOMA, E. Acute haematological response of a cichlid fish *Sarotherodon melanotheron* exposed to crude oil. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**. v. 4, n. 9, p. 151–155, November. 2012.

PEREGRINO Jr., R. B. **Formação e manejo de um plantel de reprodutores do beijupirá (*Rachycentron canadum*) em Pernambuco**. 2009. 56f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade federal rural de Pernambuco, Recife, 2009.

PINTO, R. C.; NETO, H. S.; CASTRO, L. F.; VIEIRA, C. C. F.; SÁ, M. V. C.; NUNES, A. J. P. Níveis mínimos de farinha de peixe em rações para juvenis do beijupirá, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) sem comprometimento do desempenho zootécnico. *In*: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CARCINICULTURA, 10/ SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE AQUICULTURA, 7., 2013, Natal. Anais do X SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CARCINICULTURA/ VII SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE AQUICULTURA. Natal. Associação Brasileira dos Criadores de Camarão, 2013 1 CD-ROM.

RAWLING, M. D.; MERRIFIELD, D.L.; SNELGROVE, D.L.; KÜHLWEIN, H.; ADAMS, A.; DAVIES, S. J. Haemato-immunological and growth response of mirror carp (*Cyprinus carpio*) fed a tropical earthworm meal in experimental diets **Fish & Shellfish Immunology**. v. 32, p. 1002–1007, 2012.

REFSTIE, S.; LANDSVERK, T.; BAKKE-MCKELLEP, A.M.; RINGØ, E.; SUNDBY, A.; SHEARER, K.D.; KROGDAHL, Å. Digestive capacity, intestinal morphology, and microflora of 1-year and 2-year old Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed standard or bioprocessed soybean meal. **Aquaculture**. v. 261, p. 269–284, 2006a.

REFSTIE, S.; GLENCROSS, B.; LANDSVERK, T.; SØRENSEN, M.; LILLEENG, E.; HAWKINS, W.; KROGDAHL, Å. Digestive function and intestinal integrity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed kernel meals and protein concentrates made from yellow or narrow-leafed lupins. **Aquaculture**. v. 261, p. 1382–1395, 2006b.

RESLEY, M.J.; WEBB JR., K.A.; HOLT, G.J. Growth and survival of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture**. v.253, p.398–407, 2006.

RIJN, A. V.; REINA, R. D. Distribution of leukocytes as indicators of stress in the Australian swellshark, *Cephaloscyllium laticeps* Jason. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 29, p.534–538, 2010.

ROMARHEIM, O.H.; ZHANG, C.; PENN, M.; LIU, Y.-J.; TIAN, L.-X.; SKREDE, A.; KROGDAHL, Å.; STOREBAKKEN, T. Growth and intestinal morphology in cobia (*Rachycentron canadum*) fed extruded diets with two types of soybean meal partly replacing fish meal. **Aquaculture Nutrition**. v.14, p.174–180, 2008.

ROBAINA, L.; IZQUIERDO, M. S.; MOYANO, F.J.; SOCORRO, J.; VERGARA, J.M.; MONTERO, D. Increase of the dietary *n*-3/*n*-6 fatty acid ratio and addition of phosphorus improves liver histological alterations induced by feeding diets containing soybean meal to gilthead seabream, *Sparus aurata*. **Aquaculture**. v. 161, p. 281–293, 1998.

SADO, R. Y.; BICUDO, A. J. A. Dietary levamisole influenced hematological parameters of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). **Journal of the World Aquaculture Society**.v. 41, n. S1, February, 2010.

SAHLMANN, C.; SUTHERLAND, B.J.G.; KORTNER, T.M.; KOOP, B.F.; KROGDAHL, Å.; BAKKE, A.M. Early response of gene expression in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during the development of soybean meal induced enteritis. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 34, p. 599–609, 2013.

SALZE, G.; MCLEAN, E.; BATTLE, P.R.; SCHWARZ, M.H.; CRAIG, S.R. Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**. v.298, p.294–299, 2010.

SAMPAIO, L.A.; MOREIRA, C.B.; MIRANDA-FILHO, K.C.; ROMBENSO, A.N. Culture of cobia *Rachycentron canadum* (L) in near-shore cages off the Brazilian coast. **Aquaculture Research**. v.42, p.832–834, 2011.

SANDEN, M.; BERNTSEN, M. H. G.; KROGDAHL, Å.; HEMRE, G-I.; BAKKE-MCKELLEP, A-M. An examination of the intestinal tract of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr fed different varieties of soy and maize. **Journal of Fish Diseases**. v. 28, p. 317–330, 2005.

SARDENBERG, B.; BENETTI, D.; BROWN, P.; FARKAS, D.; MIRALAO, S.; DAVIS, D.; DAUGHERTY, Z.; HOENIG, R.; WELCH, A.; STIEGLITZ, J. Maturação, desova, larvicultura e produção comercial de

alevinos de beijupirá (*Rachycentron canadum*) - Tecnologia desenvolvida e disponível. **Beijupirá News**. Ano 1, n. 2, p. 3, Julho, 2010.

SEALEY, W. M.; BARROWS, F. T.; SMITH, C. E.; OVERTURF, K.; LAPATRA, S. E. Soybean meal level and probiotics in first feeding fry diets alter the ability of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to utilize high levels of soybean meal during grow-out. **Aquaculture**. v. 293, p. 195–203, 2009.

SHAFFER, V. R.; NAKAMURA, E. L. **Synopsis of biological data on the cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae)**. Technical Report. National Oceanic and Atmospheric Administration – NOAA. National Marine Fisheries Service 82, FAO Fisheries Synopsis 153. December. 1989.

SILVA, F. P.; SORIANO, F.G. Neutrophils recruitment during sepsis: critical points and crossroads. **Frontiers in Bioscience**. v. 14, n. 12, p. 4464–4476, 2009.

TACON, A. G. J.; METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. **Aquaculture**. v. 285, p. 146–158, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C. D. Parâmetros hematológicos da Tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars Veterinária**, n. 14, p. 254–63, 1998.

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

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1986 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “Pesque-Pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience J**. v. 1, n. 19, p. 103-110, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; FERREIRA, J. S.; AFFONSO, E. G.; ONO, E. A.; MARTINS, M. L. Toxicity and effects of copper sulfate on parasitic control and hematological response of tambaqui *Colossoma macropomum* **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 355–365, 2011.

URÁN, P.A.; SCHRAMA, J.W.; ROMBOUT, J.H.W.M.; OBACH, A.; JENSEN, L.; KOPPE, W.; VERRETH, J.A.J. Soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at different temperatures. **Aquaculture Nutrition**. v. 14, p. 324–330, 2008.

VÁZQUEZ, G. R.; GUERRERO, G. A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Tissue and Cell**. v. 39, p. 151–160, 2007.

VANDENBERG, G.W.; SCOTT, S.L.; SARKER, P.K.; DALLAIRE, V.; NOÛE, J. Encapsulation of microbial phytase: Effects on phosphorus bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Animal Feed Science and Technology**. v. 169, p.230–243, 2011.

VENOLD, F. F.; PENN, M.H.; THORSEN, J.; GU, J.; KORTNER, T.M.; KROGDAHL, Å.; BAKKE, A.M. intestinal fatty acid binding protein (fabp2) in atlantic salmon (*salmo salar*): localization and alteration of expression during development of diet induced enteritis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. v. 164, n. 1, p. 229–240, 2013.

WIEFELS, R. Comercialização: A chave do sucesso da maricultura do beijupirá. **Beijupirá News**. Ano 2, n. 4, Janeiro, 2011.

YUE, Y.R.; ZHOU, Q.C. Effect of replacing soybean meal with cottonseed meal on growth, feed utilization, and hematological indexes for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. **Aquaculture**. v. 284, p.185–189, 2008.

ZHOU, Q.; TAN, B.; MAI, K.; LIU, Y. Apparent digestibility of selected feed ingredients for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**. v. 241, p. 441–451, 2004.