

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**Eduardo Kelm Battisti**

**CRESCIMENTO, HEMATOLOGIA E PARÂMETROS OXIDATIVOS DE JUNDIÁS  
(*Rhamdia quelen*) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO VITAMINA A**

**Santa Maria, RS  
2016**

**Eduardo Kelm Battisti**

**CRESCIMENTO, HEMATOLOGIA E PARÂMETROS OXIDATIVOS DE JUNDIÁS  
(*Rhamdia quelen*) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO VITAMINA A**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal – Nutrição de Peixes, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia**. Defesa realizada por videoconferência.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Lazzari

**Santa Maria, RS  
2016**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Battisti, Eduardo Kelm  
CRESCIMENTO, HEMATOLOGIA E PARÂMETROS OXIDATIVOS DE  
JUNDIÁS (Rhamdia quelen) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO  
VITAMINA A / Eduardo Kelm Battisti.-2016.  
48 p.; 30cm

Orientador: Rafael Lazzari  
Coorientador: João Radünz Neto  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, RS, 2016

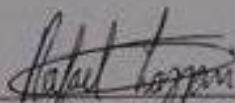
1. Vitamina A 2. Estresse oxidativo 3. Nutrição de  
peixes 4. Parâmetros de crescimento 5. Metabolismo I.  
Lazzari, Rafael II. Radünz Neto, João III. Título.

Eduardo Kelm Battisti

**CRESCIMENTO, HEMATOLOGIA E PARÂMETROS OXIDATIVOS DE  
JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO  
VITAMINA A**

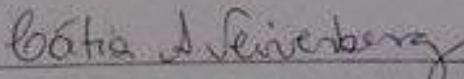
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal – Nutrição de Peixes, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Aprovado em 23 de fevereiro de 2016



---

Rafael Lazzari, Dr. (UFSM)  
(Presidente/Orientador)



---

Cátia Aline Veiverberg, Dr. (UFSM)



---

Igo Gomes Guimarães, Dr. (UFG)

Santa Maria, RS  
2016.

**Dedico este trabalho  
aos meus familiares,  
amigos e colegas**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização e conclusão deste estudo, de maneira especial, agradeço:

Ao meu orientador Rafael Lazzari pela oportunidade concedida em participar do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ), pela oportunidade de participar do Grupo de Pesquisas de Piscicultura do Campus de Palmeira das Missões, pela confiança em mim depositada, pelo respeito, pelo interesse em minha formação acadêmica e profissional, pelos incentivos e dedicação depositados neste estudo, obrigado pela orientação.

Aos meus pais Plínio Battisti e Gledir Lúcia Kelm, por todo amor e apoio, por acreditarem em mim, pelas vezes em que se doaram ao máximo para que eu seguisse estudado e chegasse cada vez mais próximo dos meus objetivos e sonhos.

A minha irmã, pelo carinho, amor, apoio e ajuda.

Aos meus amigos, que entenderam a minha ausência e que sempre me apoiaram.

Aos professores envolvidos nesse estudo e envolvidos na minha formação.

Aos colegas e estagiários do Laboratório de Piscicultura – Campus Palmeira das Missões.

Aos meus colegas do PPGZ, pelo apoio.

Aos funcionários e técnicos que contribuíram.

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram neste trabalho obrigado.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade Federal de Santa Maria

### **CRESCIMENTO, HEMATOLOGIA E PARÂMETROS OXIDATIVOS DE JUNDIÁS (*Rhamdia quelen*) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO VITAMINA A**

AUTOR: EDUARDO KELM BATTISTI  
ORIENTADOR: RAFAEL LAZZARI

Data e Local da Defesa: 23 de fevereiro de 2016, Santa Maria - RS

A vitamina A é lipossolúvel e ocorre de três formas químicas no tecido animal: álcool (retinol), aldeído (retinal) e ácido carboxílico (ácido retinóico). É um nutriente essencial para os peixes, exigido em pequenas quantidades, importante para a saúde, crescimento e reprodução. Neste estudo, o objetivo foi determinar a exigência nutricional e a resposta em crescimento, alterações hematológicas e parâmetros oxidativos de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas contendo níveis de vitamina A. Para isso, foi realizado um experimento com duração de 70 dias, com 500 jundiás (peso médio inicial =  $23,00 \pm 4,27$  g), distribuídos em 20 tanques (25 peixes por tanque), com quatro repetições por tratamento. As dietas utilizadas foram semi-purificadas e formuladas para atender às exigências proteicas e energéticas da espécie (37% proteína bruta e 3.400 kcal/kg de energia digestível). Foram testados cinco níveis de vitamina A: 0; 1500; 3000; 4500; 6000 UI/kg na dieta. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia (8, 12 e 18 horas), 3% do peso vivo, em três refeições. Foram realizadas três biometrias para coleta de dados: no dia 0, aos 35 e aos 70 dias (final do experimento). Foram mensurados os seguintes parâmetros: peso médio (g), comprimento total e comprimento padrão (cm). Os peixes utilizados para coleta de amostras de tecidos foram eutanasiados por meio de overdose de benzocaína (dose: 250mg/L). Foi realizada coleta de amostras de fígado, brânquias e músculo para a determinação de parâmetros oxidativos (proteína tecidual, TBARS, tióis não proteicos, catalase, superóxido dismutase, glutathione-S-transferase). Foram realizadas análises hematológicas dos peixes, quantificando número total de eritrócitos, hematócrito, taxa de hemoglobina, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média. Também foram realizadas análises de composição corporal (proteína bruta, gordura, matéria seca e matéria mineral) dos jundiás utilizando amostras de peixe inteiro e amostras de filé. Constatou-se que fornecer dietas com níveis acima de 3500 UI de vitamina A/kg é ideal para melhor crescimento, animais cresceram proporcionalmente ao aumento de quantidade de vitamina A na dieta. Não ocorreu efeitos nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de plasma. Considerando os parâmetros de qualidade de filé e proteção oxidativa o nível de 4500 UI/kg de vitamina A na dieta apresentou melhores resultados. No filé, houve maior quantidade de proteína e menor quantidade de gordura e quanto ao estresse oxidativo, foi observado menor atividade de enzimas que atuam como antioxidante, provando que retinóides e carotenóides agem doando elétrons para espécies reativas ao oxigênio, poupando a proteção enzimática.

**Palavras-Chave** – Dieta, enzimas oxidativas, exigência, metabolismo, nutrição, parâmetros de crescimento.

## ABSTRACT

Animal Science Master Dissertation  
Postgraduate Program in Animal Science  
Federal University of Santa Maria

### **GROWTH, HEMATOLOGY AND OXIDATIVE PARAMETERS OF SILVER CATFISH (*Rhamdia quelen*) FED WITH DIETS CONTAINING VITAMIN A**

AUTHOR: EDUARDO KELM BATTISTI

ADVISER: RAFAEL LAZZARI

Date and Defense Place: February 23, 2016, Santa Maria – RS

Vitamin A is a fat soluble compound occurring in three chemical forms in animal tissues: alcohol (retinol), aldehyde (retinal) and acid (retinoic acid). It is an essential nutrient for fish, required in small quantities, important for the health, growth and reproduction. In this study, the objective was to determine the nutritional requirement and the response in growth, hematological disorders and oxidative parameters of juvenile catfish (*Rhamdia quelen*) fed diets with vitamin A. We conducted an experiment lasting 70 days, with 500 silver catfish (initial weight =  $23.00 \pm 4.27$  g), distributed in 20 tanks (25 fish per tank), with four replications. The semi-purified diets were formulated to meet the protein and energy requirements of the species (37% CP and 3.400 kcal/kg DE). Five vitamin A levels were tested: 0; 1500; 3000; 4500; 6000 IU kg<sup>-1</sup>. Fish were fed three times a day (8, 12 and 18 hours), at 3% PV. Three sampling was performed at the beginning, the middle and the end of the experiment. The following parameters were measured: average weight (g), total length and standard length (cm). Fish used to collect tissue samples were killed by benzocaine overdose (dose: 35 mg L<sup>-1</sup>). Liver, gills and muscle samples were collected to determine oxidative stress parameters (tissue protein, TBARS non-protein thiols, catalase, superoxide dismutase, glutathione-S-transferase). Hematological analyzes of fish were made by analyzing the total number of red blood cells, hematocrit, hemoglobin, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration. Analysis of body composition (crude protein, fat, dry matter and mineral matter) of silver catfish to whole fish and fillet samples were also carried out. It has been found that providing diets with levels greater than 3500 IU of vitamin A kg<sup>-1</sup> is ideal for better growth, animals increased proportionally to the increase of vitamin A in the diet. There were no effects on hematological and biochemical parameters of plasma. Considering the fillet quality parameters the level of 4500 IU kg<sup>-1</sup> of vitamin A in the diet showed better results, there were a higher amount of protein and less fat in the fillet. To oxidative protection the level of 4500 IU kg<sup>-1</sup> of vitamin A in the diet showed better results too, was observed lower activity of enzymes that act as an antioxidant, proving that retinoids and carotenoids act by donating electrons to reactive oxygen species, saving the enzymatic protection.

**Keywords** - Diet, oxidative enzymes, nutritional requirements, metabolism, nutrition, growth parameters.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - A: Nível suplementação e ponto de platô para ganho de peso (g); B: Nível de suplementação e ponto de platô para ganho de peso relativo (%). .....	28
Figura 2 - A: Atividade da enzima catalase no fígado de peixes alimentados com diferentes níveis de vitamina A; B: substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado de peixes alimentados com diferentes níveis de vitamina A. ....	31
Figura 3 - Esquema de possíveis fontes que levam a formação de espécies reativas e mecanismos de defesa.....	35

## LISTA DE TABELAS

### APRESENTAÇÃO

Tabela 1 - Variáveis eritrocitárias do jundiá (*Rhamdia quelen*).....17

### ARTIGO 1

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais .....22

Tabela 2 - Parâmetros médios de qualidade da água no decorrer do experimento .....24

Tabela 3 - Parâmetros de crescimento de *Rhamdia quelen* alimentados com dietas contendo diferentes níveis de vitamina A .....27

Tabela 4 - Índices de deposição de lipídio e proteína na carcaça, digestivo e hepatossomático, quociente intestinal .....28

Tabela 5 - Composição centesimal dos peixes (peixe inteiro e filé) ao final do período experimental .....29

Tabela 6 - Hematologia de jundiás alimentados com diferentes níveis de vitamina A.....29

Tabela 7 - Bioquímica plasmática de jundiás alimentados com diferentes níveis de vitamina A .....30

Tabela 8 - Bioquímica hepática dos jundiás alimentados com diferentes níveis de vitamina A .....30

Tabela 9 - Parâmetros oxidativos dos jundiás alimentados com diferentes níveis de vitamina A .....31

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>12</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO .....</b>	<b>13</b>
3.1 VITAMINAS NA NUTRIÇÃO DE PEIXES .....	13
3.2 VITAMINA A .....	14
3.3 HEMATOLOGIA E ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXES .....	17
<b>4 CAPÍTULO I .....</b>	<b>20</b>
RESUMO.....	20
1. Introdução .....	21
2. Materiais e métodos .....	21
3. Resultados .....	27
4. Discussão .....	31
5. Referências.....	36
<b>5 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO C.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO D.....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O consumo de pescado no Brasil em 2013 foi de 14,5 kg per capita. A produção de peixes em cativeiro no Brasil somou 628.704,3 toneladas em 2011, 31,1% mais que o ano anterior. Esta quantidade ainda é insuficiente para suprir a demanda interna. A origem do pescado produzido no Brasil é de 34% nacional e 66% de proveniente de importação. A balança comercial brasileira de pescado no ano de 2010 apresentou um déficit de US\$ 748 milhões, representando uma elevação de US\$ 273 milhões em relação ao déficit computado em 2009 (US\$ 475 milhões) (MPA, 2014).

A espécie mais produzida no Brasil é a tilápia, com um total de 253.824,1 toneladas. Entre as espécies nativas destaca-se o jundiá (*Rhamdia quelen*), com um total produzido de 1.747,3 toneladas em 2011 (MPA, 2011). Este peixe apresenta boa velocidade de crescimento, boa eficiência alimentar, facilidade de reprodução e larvicultura (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004; RADÜNZ & BORBA, 2012).

A obtenção de índices produtivos satisfatórios na piscicultura é fortemente influenciada pela nutrição, visto que a alimentação representa mais de 60% do custo da atividade (TEIXEIRA *et al.*, 2008). Na busca de estratégias eficientes para minimizar os custos na alimentação e melhorar a qualidade nutricional das dietas, é necessário o conhecimento das exigências corretas de cada nutriente para cada peixe.

Entre os nutrientes exigidos, as vitaminas destacam-se pela importância nos processos metabólicos e fisiológicos. Além disso, podem influenciar na diminuição do estresse, geralmente causado pela alta densidade e manejo, afetando o sistema imunológico e a saúde do animal (MC DOWELL, 2000). Devido à importância destas substâncias e por não serem sintetizadas ou acumuladas em quantidades insuficientes para atender as exigências dos peixes, é essencial a sua suplementação na dieta (WEBSTER & LIM, 2002). Mesmo que o jundiá apresente potencial produtivo, poucos estudos com vitaminas foram publicados (BORBA *et al.*, 2007; PEIL *et al.*, 2007).

A quantidade de vitamina A que os peixes exigem já foi estudado para algumas espécies exóticas (NRC, 1993; NRC, 2011). No entanto para o jundiá, assim como a maioria das espécies nativas, ainda não foram determinados níveis adequados de vitamina A e tampouco há informações a respeito das respostas do animal frente à inclusão deste nutriente na dieta. Neste contexto, o estudo da influência de diferentes níveis dietéticos de vitamina A no desempenho produtivo, hematologia e parâmetros oxidativos tornam-se necessários.

## **2 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar a exigência dietética de vitamina A do jundiá (*Rhamdia quelen*) por meio de resposta em crescimento, alterações hematológicas e parâmetros oxidativos.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito da inclusão de níveis de vitamina A na dieta sobre o crescimento e deposição proteica de filé, deposição de gordura intra-visceral de juvenis de jundiá.

- Verificar alterações no balanço de óxido-redução ocasionadas pela alimentação dos jundiás com dieta contendo níveis de vitamina A.

- Analisar a hematologia de juvenis de jundiá alimentados com níveis de vitamina A na dieta.

### 3 ESTUDO BIBLIOGRÁFICO

#### 3.1 VITAMINAS NA NUTRIÇÃO DE PEIXES

Vitamina é, na verdade, uma descrição genérica para todos os compostos de um grupo que têm a mesma atividade biológica (COMBS, 1992). As vitaminas são compostos orgânicos, tais compostos podem ser vitamina para algumas espécies e para outras não, alguns outros compostos são vitaminas somente sob condições dietéticas ou ambientais específicas. Esses nutrientes são exigidos em pequenas quantidades, porém essenciais para a saúde, crescimento e reprodução dos organismos vivos (LEHNINGER *et al.*, 2000). Podem agir como cofatores ou substratos, desempenhando funções específicas nos processos metabólicos celulares, com atividade catalítica (STEFFENS, 1989). Devido à importância destas substâncias e por não serem sintetizadas ou acumuladas em quantidades suficientes para atender as exigências dos peixes, é essencial a sua suplementação na dieta (WEBSTER & LIM, 2002).

As vitaminas são classificadas em lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K) e hidrossolúveis (vitaminas C, Mioinositol, Colina e vitaminas do Complexo B). As vitaminas hidrossolúveis normalmente funcionam como coenzimas, já as vitaminas lipossolúveis funcionam independentemente de enzimas, com exceção da vitamina K que também pode atuar como coenzima (COMBS, 1992; NRC, 2011).

As vitaminas hidrossolúveis, com exceção da vitamina B<sub>12</sub>, não são armazenadas em grandes quantidades no organismo. Já as lipossolúveis são absorvidas no intestino, conjuntamente com os lipídios da dieta, e posteriormente armazenadas no fígado. Quando ingeridas em grandes quantidades, excedendo às exigências metabólicas da espécie, há possibilidade de acumulação nos tecidos, resultando em toxicidade, ou seja, hipervitaminose (NRC, 2011).

Para muitas espécies de peixes produzidos, as exigências em vitaminas ainda não foram determinadas e geralmente usam-se os resultados de estudos com salmonídeos, carpas e bagres como referência (SILVA & ANDERSON, 1995). No entanto, a resposta de várias espécies de peixes pode ser diferente, alterando o valor quantitativo da exigência (HEPHER, 1988). Normalmente, são avaliados parâmetros de crescimento, concentração mínima de vitamina no fígado e ausência de anormalidade para definir as exigências de vitaminas, baseando-se em resultados de ensaios de dose-resposta. Porém, outros critérios bioquímicos e respostas imunológicas também são utilizados (NRC, 2011).

Em sistemas intensivos de criação, há menor disponibilidade de alimento natural, reforçando a necessidade de uma dieta bem balanceada. Logo, é necessária a suplementação vitamínica adequada, além da necessidade de adicionar às dietas um suplemento vitamínico que garanta uma diminuição nos efeitos do estresse causada pela alta densidade e manejos intensos (HALVER, 1985; TOGUYENI *et al.*, 1997; DAVIS *et al.*, 1998;). Estudos demonstram que altas doses de algumas vitaminas podem influenciar positivamente o sistema imunológico de peixes, aumentando a tolerância ao estresse e resistência a doenças (LIM & WEBSTER, 2001; KOSHIO, 2007).

As exigências nutricionais em vitaminas para máximo crescimento, sob condições ótimas, podem ser aumentadas de 3 a 10 vezes sob condições como estresse, doenças e interação social (HALVER, 1985; TOGUYENI *et al.*, 1997; DAVIS *et al.*, 1998). Além de crescimento reduzido e aumento da mortalidade, outros sinais clínicos como perda de apetite, descoloração da pele, perda de coordenação, nervosismo, hemorragias, fígado com grânulos de gordura e aumento à susceptibilidade a infecções bacterianas podem ser observados em peixes com deficiências vitamínicas (DAVIS *et al.*, 1998; HEPHER, 1988).

Devido à importância desses nutrientes, é indispensável o cuidado ao manusear tais nutrientes, pois as vitaminas geralmente são instáveis ao aquecimento, umidade e oxidação que ocorrem no processamento das rações, por isso em geral são utilizadas em quantidades maiores do que a exigida (NRC, 1993). Além do processamento das rações, outro problema na mensuração da quantidade de vitaminas é a incerteza do conteúdo e biodisponibilidade das vitaminas nos ingredientes que compõe as rações, as exigências em vitaminas são, na maioria das vezes, atendidas pela adição de um suplemento vitamínico contendo quantidades excessivas. Os suplementos vitamínicos podem ser vitaminas isoladas ou associadas entre si, adicionadas nas dietas para suprir a demanda desses nutrientes pelo animal. Dentre as vitaminas lipossolúveis, temos a vitamina A também conhecida como retinol.

### 3.2 VITAMINA A

Vitamina A é a denominação geral para qualquer composto que possui atividade biológica de retinol (BLOMHOFF, 1994). Desempenham atividade biológica em três formas químicas: álcool (retinol), aldeído (retinal) e ácido (ácido retinóico). O ácido retinóico, ao se ligar a receptores nucleares, regula a expressão gênica, processos de diferenciação e proliferação celular, crescimento e desenvolvimento de estruturas do esqueleto, bem como de sistemas, tais como sistema nervoso e imunológico (BORBA *et al.*, 2012).

Segundo Fernández & Gisbert (2011), os peixes não são capazes de sintetizar vitamina A, necessitando obtê-la em concentração e forma química adequada. Esse processo de conversão e transformação é variável conforme a espécie de peixe. Compostos vegetais (carotenoides) e animais (retinol esterificado) podem ser considerados como fontes de vitamina A (BORBA *et al.*, 2012). Dos quase 600 tipos de carotenóides, apenas cerca de 50 têm atividade pró-vitamina A, como o beta-caroteno, que após conversão para retinol por ação da beta-caroteno-15,15'-dioxigenase, atua como vitamina A (COMBS, 1992). O primeiro passo na transformação do beta-caroteno em vitamina A é uma clivagem oxidativa para produzir all-trans-retinal, o qual é reduzido a retinol (ONG, 1994). É muito provável que a conversão de beta-caroteno em vitamina A seja maior quando há deficiência da mesma vitamina no animal (AMAR *et al.*, 2001).

O metabolismo de compostos retinóides é absorvido da dieta por meio de metabolismo complexo, que inclui um número elevado de proteínas transportadoras (FERNÁNDEZ & GISBERT, 2011). Compostos de retinol esterificados são incorporados a micelas que são secretadas na linfa. No fígado, as micelas são incorporadas para os hepatócitos e os compostos de retinol esterificados são armazenados, após hidrólise são lançados como retinol livre no plasma (BORBA *et al.*, 2012). Segundo os mesmos autores, depois de circular no plasma ligado a determinada proteína (RBP), o retinol, nas células-alvo, liga-se a outra proteína transportadora (CRBP) podendo transformar-se pela ação de enzimas em duas formas ativas: o retinal, utilizado para a regeneração da rodopsina na retina do olho e o ácido retinóico, principal metabólito ativo da vitamina A.

A vitamina A e seus derivados do ácido retinóico atuam no controle de divisão celular, tendo como função, controlar o crescimento dos tecidos e/ou controlar a polaridade ou orientação das células dentro de um tecido. No linguado japonês (*Paralichthys olivaceus*), além de estar envolvido com o desenvolvimento das nadadeiras dos animais, o ácido retinóico estimula o desenvolvimento de cromatóforos durante a metamorfose (MIWA & YAMANO, 1999). O ácido retinóico, que tem efeito no desenvolvimento da morfologia das células cone horizontal presente nos olhos dos peixes (WEILER *et al.*, 1997; WEILER *et al.*, 2000).

A vitamina A tem apresentado papel importante no sistema imune, influenciando tanto no sistema inato quanto no adaptativo (STEPHENSEN, 2001). Juvenis de *Carassius auratus*, após alguns meses ingerindo dietas sem vitamina A apresentaram maior susceptibilidade a infecções bacterianas, além de avitaminose no fígado, glândulas intestinais e na pele (GRAHAM & JONES, 1969). Níveis elevados de vitamina A na dieta reforçam certas funções imunes, tais como a migração de leucócitos do rim e da atividade bactericida do soro



em salmão (*Salmo salar*). Também reforçam a ação inibidora das proteases, migração de leucócitos, atividade do complemento sérico e da atividade fagocitária em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (THOMPSON *et al.*, 1995; AMAR *et al.*, 2000).

Nos peixes, 90% da vitamina A armazenada é encontrada no fígado e os outros 10% estão divididos entre olhos, plasma, gordura e aparelho reprodutivo (KATSUYAMA & MATSUNO, 1988). Por consequência disto, somado ao fato de que a deficiência de vitamina A é a segunda forma mais comum de má nutrição, é importante determinar as exigências nutricionais desta vitamina, especialmente a partir da quantificação dos depósitos hepáticos (HOLE & TAYLOR, 1996).

Quantidade de vitamina A tem sido determinado para algumas espécies, mas os valores variam entre as espécies (NRC, 1993, 2011). Os valores de exigência em vitamina A encontrados no NRC (2011) para algumas espécies são de 1,8 mg/kg para tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), 1,2-6,0 mg/kg para carpa comum (*Cyprinus carpio*), 0,3-0,6 mg/kg para bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), 0,75 mg/kg para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e 0,9 mg/kg para larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*) (PEIL *et al.*, 2007).

Na preparação e armazenagem das rações, a vitamina A pode sofrer oxidação, independente da forma química, especialmente na presença de calor úmido, minerais ou gorduras rancificadas (MASUMOTO, 2002). Em função disso, pode haver menores quantidades de vitamina A do que o calculado na dieta, quando a suplementação não é suficiente, há déficit. Vários efeitos negativos são relatados em peixes alimentados com dietas deficientes em vitamina A: hemorragias, crescimento retardado, baixa eficiência alimentar, anorexia, coloração anormal, deformidade óssea, lesões nos olhos, hemorragias, quantidade de eritrócitos, fragilidade osmótica, anemia, letargia e alta mortalidade (MOHAMED *et al.*, 2003; NRC, 2011).

Por outro lado, o excesso de vitamina A também causa problemas aos peixes, tais como aumento da mortalidade, crescimento anormal da coluna vertebral e redução no ganho em peso corporal (ORNSRUD *et al.*, 2002).

Para o jundiá, os valores usados na formulação de rações são baseados em dados conhecidos para a exigência do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (BALDISSEROTTO *et al.*, 2010). Na literatura, encontramos apenas um trabalho envolvendo a suplementação de vitamina A para larvas de jundiá, sendo o nível de 3000 UI/kg foi considerado o mais adequado, considerando a sobrevivência, biomassa e comprimento total (PEIL *et al.*, 2007).

Devido às características que apontam o jundiá como uma espécie nativa importante e promissora ao desenvolvimento da piscicultura, somado a falta de informações sobre as

respostas metabólicas e fisiológicas do animal em consequência de diferentes níveis de vitaminas na dieta, tornam-se necessários estudos para determinar os níveis ótimos de vitamina A, de modo a alcançar melhores índices de crescimento e de saúde para o jundiá.

### 3.3 HEMATOLOGIA E ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXES

As alterações do hemograma, quando o animal está enfermo, podem estar relacionadas ao tipo de patógeno do grau de evolução da patologia, em função disso o quadro hematológico de diferentes peixes e condições de criação vêm sendo estudado (TAVARES-DIAS *et al.*, 2002). Ainda é muito difícil determinar quantidades ou resultados hematológicos ideais para as espécies, pois fatores, como estado nutricional, sazonalidade, maturação gonadal, sexo e variação genética influenciam significativamente as variáveis hematológicas (KORI-SIAKPERE, 1985). Diferenças na metodologia de coleta de sangue, quanto ao tipo de anticoagulante utilizado, também podem atuar como fonte de variação de resultados hematológicos em peixes (TAVARES-DIAS *et al.*, 2002). Para a espécie *Rhamdia*, foram avaliadas diferentes variáveis eritrocitárias: Eritrócitos ( $10^6/\text{mL}$ ); Hemoglobina (g/dL); Hematócrito (%); VCM (fL); HCM (g/dL). Para estas variáveis foram encontrados os seguintes valores apresentados na tabela abaixo.

Tabela 1 - Variáveis eritrocitárias do jundiá (*Rhamdia quelen*)

Eritrócitos ( $10^6/\text{mL}$ )	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	HCM (g/dL)	Ambiente	Autores
1,700	7,44	30,14	241,94	24,92	-	FORESTI <i>et al.</i> , 1977
1,585	11,43	35,19	23,11	32,98	natural	KAVAMOTO <i>et al.</i> , 1983
1,950	6,73	26,50	139,03	25,94	cativeiro	TAVARES – DIAS <i>et al.</i> , 2002

Em dietas isentas de vitamina A, houve redução dos valores de hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos em tilápias (GUIMARÃES, 2009). Para juvenis da mesma espécie, não houve diferenças quanto ao hematócrito e à hemoglobina, na avaliação das quantidades de vitamina A na dieta. É importante que mais estudos sobre hematologia em

diferentes condições nutricionais sejam conduzidos, pois geralmente, enfatiza-se exclusivamente o aspecto de ganho em peso, sem levar em consideração o estado metabólico e de saúde dos peixes. Além disso, a hematologia uma ferramenta importante para monitorar condições de bem-estar (LAZZARI *et al.*, 2011).

O oxigênio é necessário para muitas reações metabólicas de suporte da vida. O oxigênio e os seus intermediários, no entanto, podem reagir com os componentes celulares, com resultante degradação ou inativação de moléculas essenciais (CHOW, 1979). Também é um bom agente oxidante, que se reduz ao receber elétrons podendo formar intermediários reativos como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) que são radicais livres (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Esses intermediários também são conhecidos como Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Radicais livres podem ser átomos, grupos de átomos ou moléculas que possuem elétrons livres não pareados em sua camada orbital externa, o que explica sua instabilidade e elevada reatividade (KIRKHAM *et al.*, 2006). Quando há um desequilíbrio entre a concentração das EROs e a geração do sistema de defesa antioxidante, o quadro é reconhecido como estresse oxidativo, podendo levar a injúrias e até mesmo à morte celular (MARTÍNEZ-ALVARÉZ *et al.*, 2005; PAVANATO & LLESUY, 2008). O estresse oxidativo pode ocorrer pelo excesso de produção de radicais livres e pela sua deficiência nos mecanismos antioxidantes (PETEAN *et al.*, 2007; BARREIROS & DAVID, 2006).

Para neutralizar o ataque dessas EROs, células vivas têm um sistema de defesa biológico composto de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (SIES, STAHL & SEVANI, 2005; HUANG & PRIOR, 2005). O sistema de defesa enzimático, representado principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona-peroxidase (GPx) e glutaciona-redutase (GR), minimiza os danos causados pelo estresse oxidativo (BONNEFOY *et al.*, 2002). Outro sistema de defesa é o não enzimático, representado pelas vitaminas (A, C, E), os compostos polifenólicos (como a própolis), e os compostos de baixo peso molecular (como os carotenóides) que atuam como varredores de radicais livres, quelantes de minerais e bloqueadores de espécies reativas de oxigênio (SPADA & SILVA, 2004).

Os peróxidos lipídicos são resultado da deterioração oxidativa de lipídios poli insaturados. Os ácidos graxos poli insaturados são excelentes alvos para o ataque de radicais livres, devido a suas múltiplas duplas ligações (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORBERG & ARNÉR, 2001). Como a membrana das células e organelas celulares contém grandes quantidades de ácidos graxos poli insaturados, são eles os componentes celulares

mais atingidos pelas espécies reativas ao oxigênio. Há perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo das organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; YOSHIDA *et al.*, 2003). Os derivados de ácidos graxos poli insaturados são instáveis e se decompõem para formar uma série de compostos complexos, que incluem compostos carbonílicos reativos, como o malondialdeído (MDA) (YAGI, 1998; ARMSTRONG & BROWNE, 1994).

Em situação de estresse oxidativo pode ocorrer a peroxidação lipídica, observado pelo aumento do malondialdeído (MDA) (PARVEZ & RAISUDDIN, 2005). A quantificação do MDA tem sido utilizada para avaliar a extensão do dano oxidativo. Esta quantificação pode ser feita pela reação de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (OHKAWA *et al.*, 1979), a qual tem sido usada como uma medida de lipoperoxidação.

Devida importância de tais parâmetros, os mesmos devem ser avaliados em experimentos, nesse caso, nos jundiás que serão alimentados com dietas contendo diferentes níveis de vitamina A, avaliar não apenas crescimento, relacionar nutrição e saúde e verificar se a vitamina A atua como sistema de defesa não enzimático em meio a situações de estresse oxidativo.

O seguinte e único capítulo, Capítulo – I, intitulado “Crescimento e defesa antioxidante de jundiás *Rhamdia quelen* alimentados com dietas contendo diferentes níveis de vitamina A” será submetido para o periódico **Aquaculture**.

## 4 CAPÍTULO I

### CRESCIMENTO E DEFESA ANTIOXIDANTE DE JUNDIÁS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE VITAMINA A

**RESUMO** - A vitamina A é um nutriente essencial para várias espécies de peixes, exigido em pequenas quantidades, importante para a saúde, crescimento e reprodução. Foi realizado um estudo para avaliar a exigência nutricional e a resposta em crescimento, alterações hematológicas e parâmetros oxidativos de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de vitamina A. Para isso, foi realizado um experimento com duração de 70 dias, com 500 jundiás (peso médio inicial = 20 g), distribuídos em 20 tanques. As dietas foram semi-purificadas e formuladas para atender às exigências proteicas e energéticas dos animais, (37% PB e 3.400 kcal/kg ED). Foram testados cinco tratamentos: 0; 1500; 3000; 4500; 6000 UI/kg de vitamina A na dieta. Ao final do experimento foram aferidos e mensurados diferentes parâmetros zootécnicos, foi realizada coleta de sangue e alguns exemplares foram eutanasiados, utilizados para análises metabólicas, qualidade de carcaça e parâmetros oxidativos. Os resultados obtidos mostram que diferentes quantidades de vitamina A na dieta interferem no crescimento de peixes da espécie *Rhamdia quelen*. O crescimento dos peixes aumentou proporcionalmente a quantidade incluída de vitamina A, o nível mínimo para crescimento é de 3500 UI/kg de vitamina A na dieta. Peixes que receberam 4500 UI/kg de vitamina A na dieta apresentaram filés de melhor qualidade com maiores quantidades de proteína e menos gordura. Níveis de vitamina A até 6000 UI/kg dieta não afetaram parâmetros hematológicos. A elevação dos níveis de vitamina A, testados no presente estudo (a partir de 4500 UI/kg) melhoram o sistema de defesa antioxidante de peixes, foi observado menor atividade de enzimas que atuam como antioxidante, provavelmente retinóides e carotenóides agiram como *scavengers* doando elétrons para espécies reativas ao oxigênio, poupando a proteção enzimática e colaborando para a economia de energia do animal. Baseado nos resultados bioquímicos, para as condições experimentais, recomendamos o nível de 4500 UI/kg para juvenis de *R. quelen*.

**Palavras-Chave:** vitaminas, retinol, *Rhamdia quelen*, ganho de peso, estresse oxidativo

## 1. Introdução

Nos processos metabólicos ocorrem reações de oxidação que envolve transferência de elétrons, no entanto quando há desequilíbrio das reações de oxirredução, ocorre produção de radicais livres, que em quantidades excessivas, podem resultar em stress oxidativo para diferentes sistemas biológicos, onde proteínas, lipídios e DNA podem ser danificados (Han et al., 2012).

Certas vitaminas constituem uma categoria de antioxidantes exógenos que em conjunto com carotenoides contribuem para os sistemas antioxidantes. Recentemente a vitamina A tem ganhado destaque, impulsionando a pesquisa de seus precursores, considerados como importantes antioxidantes (Baydas et al. 2002; Ramalho et al., 2003; Paiva e Russel, 1999).

A vitamina A ocorre em três formas no tecido animal, álcool (retinol), aldeído (retinal) ou ácido (ácido retinóico), é um nutriente com alto potencial de oxidação. Nutriente indispensável para os peixes, presente em inúmeros processos biológicos, como diferenciação e proliferação celular, crescimento, visão, reprodução, desenvolvimento embrionário, estresse, resistência a infecções e manutenção da saúde (Fernández e Gisbert, 2011).

Apesar da importância nos sistemas biológicos, a vitamina A foi pouco estudada para a maioria das espécies de peixes, pouco se sabe da demanda de vitaminas para o jundiá (*Rhamdia quelen*), para formular rações para essa espécie, é usada a tabela de exigências nutricionais do catfish (*Ictalurus punctatus*). Assim como outras espécies nativas cultivadas, o jundiá requer estudos sobre exigência nutricional para cada fase de crescimento, devida importância da espécie no Brasil, com um total produzido de 1747.3 toneladas em 2011 (MPA 2011).

Há uma lacuna quanto o crescimento e resposta oxidativa associados à vitamina A. Nesse âmbito foi realizado um estudo com o objetivo de avaliar a exigência nutricional e a resposta em crescimento, alterações hematológicas e parâmetros oxidativos de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de vitamina A

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Dietas experimentais

As dietas foram formuladas contendo 37% de PB e 3.400 kcal/kg de ED , para atender às exigências proteicas e energéticas de jundiás conforme SALHI et al., (2004). A exigência

dos demais nutrientes foi utilizada com base nas exigências do bagre do canal, *Ictalurus punctatus* (NRC, 2011). As dietas para os cinco tratamentos foram semi-purificadas, onde os níveis de vitamina A foram adicionados gradualmente (0; 1500; 3000; 4500; 6000 UI/kg da dieta) respectivamente para cada tratamento, através da inclusão de retinol acetato como vitamina A (Lutavit – 1000 Plus BASF®: 1.000.000 UI/g), pré-misturado ao restante da pré-mistura vitamínica e mineral (sem vitamina A). Os ingredientes foram misturados em misturador horizontal, durante esse processo, a pré-mistura vitamínica e mineral, o óleo e a água destilada foram adicionados aos ingredientes. Durante a mistura dos ingredientes, foi medido o pH de todas as dietas e ajustado para 7 usando uma solução de NaOH 6 N, para evitar possíveis diferenças no consumo de ração causada pela variação na palatabilidade da dieta (Montes-Girao e Fracalossi, 2006).

A massa de todos os tratamentos foi submetida à peletização, os pellets foram secos a 55° C durante 24 h. Após a secagem, as dietas foram armazenadas em recipientes de vidro fechado à temperatura de -15° C. A formulação das dietas e composição bromatológica para cada tratamento estão apresentados na Tabela 1. Para quantificação de vitamina analisada nas dietas, amostras foram enviadas para laboratório, as análises foram realizadas pela CBO Análises Laboratoriais – Campinas/SP, por cromatografia líquida - HPLC.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais

INGREDIENTES	Níveis de inclusão de Vitamina A (UI)				
	0	1500	3000	4500	6000
	Quantidade em g/Kg				
Caseína	300	300	300	300	300
Farinha de Peixe	50	50	50	50	50
Gelatina	75	75	75	75	75
Celulose	21,3	21,2995	21,2991	21,2988	21,2982
Maltodextrina	350	350	350	350	350
Amido	140	140	140	140	140
Óleo de canola	20	20	20	20	20
Mistura vitamínico e mineral*	10	10	10	10	10
Fosfato bicálcico	25	25	25	25	25
Sal	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
DL-Metionina	6	6	6	6	6
Vitamina A**	0	0,0005	0,0009	0,0014	0,0018
Melbond	2	2	2	2	2
BHT	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	<b>Composição analisada</b>				
Proteína bruta (%)	35,14±0,25	35,58±0,54	35,11±0,24	35,52±0,40	35,88±0,62
Lipídio (%)	3,16±0,14	3,16±0,16	3,17±0,12	3,19±0,03	3,17±0,02



Matéria seca (%)	91,2±1,05	91,87±1,21	91,67±1,21	91,11±1,33	91,80±2,07
Cinzas (%)	5,12±0,81	5,51±0,10	5,27±0,15	5,62±0,31	5,88±0,52
Vitamina A (mg/kg) ***	0,33	0,35	0,52	0,78	0,86
Vitamina A (UI/kg) ***	1090	1180	1750	2610	2880

\*Mistura vitamínica e mineral (níveis de garantia por quilograma do produto) ácido fólico 2.400 mg; ácido nicotínico 48 g; ácido pantotênico 24 g; antioxidante 19,6 g; biotina 96 mg; cobalto 20 mg; cobre 6.000 mg; ferro 100 g; iodo 200 mg; manganês 40 g; selênio 200 mg; vitamina B1 9.600 mg; vitamina B2 9.600 mg; vitamina B6 9.600 mg; vitamina B12 9.600 µg; vitamina C 96 g; vitamina D3 400.000 UI; vitamina E 24.000 UI; vitamina K 4.800 mg; zinco 6.000 mg. A mistura vitamínica e mineral adquirida não possuía a adição de vitamina A. \*\* Quantidade calculada segundo NRC (2011), onde 10000 UI de vitamina A equivale a 3000 microgramas (µg) e 0,000003 quilogramas (kg). \*\*\* Quantidade de vitamina A analisada nas dietas, análise realizada pela CBO Análises Laboratoriais – Campinas/SP.

## 2.2. Manejo experimental

O experimento foi realizado no laboratório de piscicultura do Departamento de Zootecnia e Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Maria, campus Palmeira das Missões (altitude 639 m, 27°55'16.9"S, 53°19'05.7"W), durante dez semanas, no período de 04 de novembro de 2014 a 12 de janeiro de 2015.

Todos os animais e procedimentos usados nesse experimento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (número: 123/2014).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (dietas) e quatro repetições. Foram utilizados 500 juvenis de jundiá com peso médio de  $23 \pm 4,23$  g, com idade aproximada de 80 dias, provenientes de piscicultura comercial. Antes do início do período experimental os peixes foram adaptados às unidades experimentais, durante 15 dias. Durante todas as manipulações, os peixes foram anestesiados com benzocaína (dose: 35mg/L). Foram alojados 25 animais por tanque. O experimento foi realizado em sistema de recirculação de água composto por 20 tanques (quatro repetições por tratamento) de polipropileno com capacidade de 250L (entrada e saída de água individual), com filtragem biológica e termostatos para controle de temperatura da água. Os animais foram alimentados três vezes ao dia (8, 12 e 18 horas), com 3% da biomassa dividida nas três refeições. Semanalmente foram realizadas pesagens para ajuste de oferta da ração.

A temperatura e oxigênio da água foram verificados diariamente com o oxímetro digital. Semanalmente a amônia total foi determinada utilizando a técnica do salicilato conforme Verdouw et al. (1978); o pH com (pHmetro), a alcalinidade total (mg CaCO<sub>3</sub>/L) pelo método titulação de neutralização; a dureza total (mg CaCO<sub>3</sub>/L) pelo método de titulação de complexação; e o nitrito por kit colorimétrico Alfakit® (Florianópolis, SC, BR). Durante o



transcorrer do período experimental a qualidade da água (Tabela 2) se manteve em níveis ideais para espécie, segundo Baldisserotto e Silva (2004).

Tabela 2. Parâmetros médios de qualidade da água no decorrer do experimento

<b>Parâmetros de qualidade da água</b>	
<b>Parâmetros</b>	<b>Médias</b>
Temperatura	23,40±2,7 °C
Oxigênio dissolvido	6,86±0,9 mg L <sup>-1</sup>
pH	7,23±0,3
Alcalinidade	61,2±17,2 mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>
Dureza	80,1±13,4 mg L <sup>-1</sup> CaCO
Amônia	0,14±0,03 mg L <sup>-1</sup>

Valores médios ± desvio padrão.

### 2.3. Coleta de amostras

Ao final do período experimental, os peixes permaneceram em jejum de aproximadamente 16 horas. Foram utilizados dois animais por tanque (oito por tratamento) aleatoriamente para coleta de sangue. Os animais foram anestesiados com benzocaína (dose: 35mg/L) e a coleta de sangue foi realizada por punção da veia caudal com auxílio de seringas e agulhas descartáveis (25x0,7mm) contendo EDTA a 10%, como anticoagulante. Foi realizada biometria onde todos os animais foram pesados e medidos individualmente para avaliação de crescimento e ganho de peso. Foram retirados sete peixes por tanques (28 por tratamento), os mesmos, anestesiados (dose: 250mg/L) e posteriormente eutanasiados por secção medular. Dentre esses animais eutanasiados, dois foram utilizados para a coleta de dados para os índices somáticos; três para coleta e análise de composição centesimal; e dois para retirada de tecidos para análises dos parâmetros oxidativos.

### 2.4. Análises das amostras

#### 2.4.1. Parâmetros de composição centesimal animal

A análise de composição corporal inicial foi feita utilizando amostra de 20 animais e ao final do período experimental foram utilizados três animais por tanque. Foram analisadas composição de peixe inteiro e de filé, sendo os parâmetros avaliados: umidade, cinzas e proteína bruta, seguindo metodologias recomendadas pela AOAC (1995); e gordura, extraída e quantificada pelo método de Bligh e Dyer (1959).

#### 2.4.2. Parâmetros zootécnicos

Na biometria, os peixes foram medidos, sendo avaliados o peso (g), comprimento total (cm) e padrão (cm), a partir desses dados, foi calculado o ganho em peso diário (g), ganho de peso total (g), taxa de crescimento específico expresso em  $\%/dia^{-1}$  [TCE =  $100 \times (\ln \text{ peso médio final} - \ln \text{ peso médio inicial}) / \text{tempo (dia)}$ ], fator de condição (peso médio/comprimento padrão<sup>3</sup>), ganho de peso relativo em gramas (peso final - peso inicial / peso inicial x 100) e biomassa total (g). Os parâmetros de índices somáticos analisados foram: Rendimento de carcaça (%):  $RC = ((\text{peso eviscerado com cabeça e brânquias}) / (\text{peso peixe inteiro})) \times 100$ ; Índice digestivosomático (%):  $IDS = (\text{peso trato} / \text{peso peixe inteiro}) \times 100$ ; Índice hepatossomático (%):  $IHS = (\text{peso fígado} / \text{peso peixe inteiro}) \times 100$ .

#### 2.4.3. Parâmetros hematológicos

Foi feita análise da série eritrocitária (número total de eritrócitos, hematócrito e taxa de hemoglobina) por contagem em câmara de Neubauer, e posteriormente determinado os seguintes índices eritrocitários: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), pelas fórmulas a seguir:  $VCM = (\text{Hematócrito} \times 10) / \text{Número de eritrócitos}$ ;  $HCM = (\text{Hemoglobina} \times 10) / \text{Número de eritrócitos}$ ;  $CHCM = (\text{Hemoglobina} \times 100) / \text{Hematócrito}$ .

#### 2.4.4. Parâmetros bioquímicos plasmáticos

O sangue coletado foi centrifugado a 3000 rpm/minuto para a obtenção do plasma. No plasma, foram determinados os níveis de glicose, proteínas totais circulantes, triglicerídeos, colesterol total, alanina-aminotransferase e aspartato-aminotransferase utilizando-se kits colorimétricos comerciais da marca Doles<sup>®</sup> (Goiânia, GO, BR).

#### 2.4.5. Parâmetros bioquímicos do fígado

Para análise de proteínas totais (Bradford, 1976), amostra de tecido hepático (50 mg) foi aquecida a 100 °C com KOH 6N e após centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos. Para determinação de glicogênio (Dubois et al., 1956), adicionou-se álcool etílico para a hidrólise e precipitação do glicogênio. Para quantificação de aminoácidos livres (Spies, 1957) e transaminases, uma amostra de 50 mg de fígado foi homogeneizada em tampão (TFK 20 mM) e centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos. Para quantificação de glicose foi utilizado kit comercial por metodologia enzimática. Para determinação de amônia total foi utilizada a técnica do salicilato conforme (Verdouw et al., 1978). O nível de alanina-aminotransferase e

aspartato-aminotransferase foi quantificado utilizando kits colorimétricos comerciais, por metodologia de Reitman e Frankel (1957). Para todos os parâmetros foram feitas leituras em espectrofotômetro, utilizando curva de calibração para o cálculo de determinação da quantidade ou atividade da enzima na amostra.

#### 2.4.6. Parâmetros de estresse oxidativo

Os tecidos retirados dos peixes eutanasiados foram brânquias, fígado e músculo. Foram feitas as seguintes análises para determinação dos parâmetros oxidativos: Medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, conforme Buege e Aust 1978); grupos tióis não proteicos (NPSH, conforme Ellman, 1959); atividade de catalase (CAT, determinada conforme Nelson e Kiesov 1972); atividade da Glutathione-S-transferase (GST, determinada conforme Habig et al., 1974); atividade da superóxido dismutase (SOD, segundo McCord e Fridovich 1969); e proteínas teciduais, pelo método de Lowry et al. (1951).

#### 2.5. Análises estatísticas

Para a análise estatística, foi utilizado pacote estatístico Statistical Analysis System®. Para os parâmetros de crescimento, ao executar as análises, foram analisados cinco tratamentos (dietas) e três repetições. Análises estatísticas para ganho de peso e ganho relativo de peso foi utilizado o modelo descontínuo LRP (Linear Response Plateau – regressão não-linear) metodologia de Gauss-Newton.

Primeiramente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo considerados de distribuição normal aqueles dados que apresentaram  $P > 0,05$ . Os dados que não se enquadraram em tal distribuição, foram submetidos às transformações (a logarítmica, a logarítmica dos (dados+1), a raiz quadrada dos dados, a raiz quadrada dos (dados + 1, ou mais 1/2), a raiz cúbica dos dados), quando este procedimento não ajustava os dados na distribuição normal, era feita detecção das observações influentes (outliers), utilizando o intervalo, chamado de Inter-Quartil (IQR) x 1,5, os mesmos eram excluídos.

Foram testadas as análises de regressão linear, polinomial quadrática e polinomial cúbica para o nível de inclusão de vitamina A testado em nível de 5% de significância, quando mais de um modelo de regressão era significativo, optando-se pelo uso do modelo com maior coeficiente de determinação ( $r^2$ ). Quando a análise de regressão não apresentou significância os dados foram submetidos ao teste de comparação de médias, Tukey em nível de significância de 5%. Valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3. Resultados

#### 3.1. Crescimento e parâmetros de carcaça

O ganho de peso relativo foi  $130,26 \pm 14,4\%$  para o tratamento com 0 UI/kg de inclusão e  $216,34 \pm 6,37\%$  para o tratamento com 6000 UI/kg (Figura 1), mostrando que houve um bom crescimento dos peixes e efeito significativo da vitamina A no crescimento de juvenis de jundiá. O ganho de peso e o crescimento foram maiores nos peixes alimentados com 6000 UI de vitamina A/kg na dieta, seguido dos peixes alimentados com a dieta contendo 4500 UI/kg. Além de influenciar no ganho de peso e crescimento desses peixes, a vitamina A melhorou as demais variáveis zootécnicas, com exceção do comprimento padrão (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros de crescimento de *Rhamdia quelen* alimentados com dietas contendo diferentes níveis de vitamina A

Variáveis	Níveis de inclusão de vitamina A (UI / kg)					P	RE L	RE Q
	0	1500	3000	4500	6000			
GPD (g/dia)	0,44±0,05 <sup>B</sup>	0,43±0,04 <sup>B</sup>	0,50±0,02 <sup>B</sup>	0,62±0,03 <sup>A</sup>	0,71±0,02 <sup>A</sup>	*	*	*
GPT (g)	30,76±3,81 <sup>B</sup>	30,47±3,48 <sup>B</sup>	35,00±1,67 <sup>B</sup>	43,84±2,33 <sup>A</sup>	50,32±1,39 <sup>A</sup>	*	*	*
TCE (%/dia)	1,2±0,10 <sup>B</sup>	1,19±0,09 <sup>B</sup>	1,30±0,04 <sup>B</sup>	1,51±0,05 <sup>A</sup>	1,64±0,03 <sup>A</sup>	*	*	*
FC	0,95±0,08 <sup>C</sup>	1,03±0,01 <sup>BC</sup>	1,10±0,01 <sup>AB</sup>	1,15±0,03 <sup>A</sup>	1,18±0,02 <sup>A</sup>	*	*	*
Biom (g)	1081,82±75,4 2 <sup>B</sup>	1077,37±71,3 5 <sup>B</sup>	1167,83±33,1 6 <sup>B</sup>	1343,43±44,3 3 <sup>A</sup>	1471,69±27,0 1 <sup>A</sup>	*	*	*

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes, na linha, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). NS: não significativo. \*  $p < 0,0001$ ; \*\* $p < 0,0003$ ; \*\*\* $p = 0,008$ ; \*\*\*\* $p = 0,04$ ; \*\*\*\*\* $p = 0,03$ ; \*\*\*\*\* $p = 0,02$ . REL: Regressão de efeito linear. REQ: Regressão de efeito quadrático. Peso: Peso do peixe inteiro (g); CTM: Comprimento total médio (cm); CPM: Comprimento padrão médio (cm); GPD: Ganho de peso diário (g/dia); GPT: Ganho de peso total (g); TCE: Taxa de crescimento específico; FC: Fator de condição; e Biom: biomassa total (g).

Os peixes que receberam as dietas suplementadas com 4500 ou 6000 UI/kg tiveram maior ganho de peso. Utilizando análise de regressão polinomial para o peso, mesmo havendo significância da ANOVA da regressão, entendemos que este modelo não representou adequadamente a distribuição dos dados. No entanto, o modelo descontínuo LRP (Linear Response Plateau – regressão não-linear), estima o nível mínimo de suplementação em 3511 UI/kg para o peso (Figura 1.A) e nível mínimo em 3519 UI/kg, considerando o ganho de peso relativo (Figura 1.B). Nestes pontos calculados, observa-se um ângulo maior entre a linha que expressa o crescimento em relação ao eixo x, ou seja, momento em que a resposta para determinada variável apresenta maior acessão e aos poucos se estabiliza e/ou pode se estabilizar a partir de um aumento do nível de vitamina incorporado na dieta, segundo metodologia de Gauss-Newton (Figura 1).

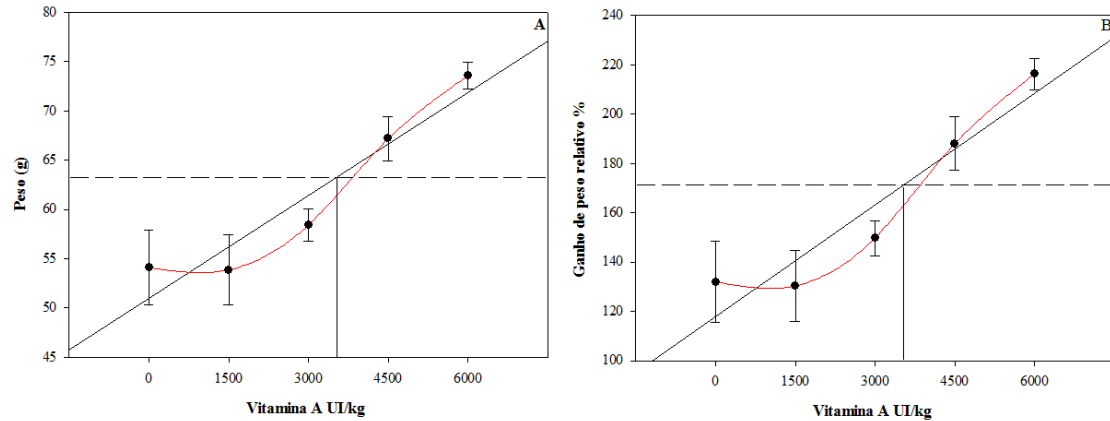


Figure 1. A: Nível suplementação e broken line para ganho de peso (g); B: Nível de suplementação e broken line para ganho de peso relativo (%). Amplitude: Desvio padrão.

O índice digestivo somático, quociente intestinal, o rendimento de carcaça e índice hepatossomático não foram influenciados pela adição de vitamina A (Tabela 4). Houve efeito significativo entre os peixes alimentados com dieta contendo vitamina A em relação à proteína bruta e gordura dos filés. A dieta contendo 0 de inclusão de vitamina A resultou em quantidades inferiores de proteína bruta e os peixes alimentados com a dieta contendo 4.500 UI/kg apresentaram menor quantidade de gordura no filé. No entanto, não houve efeito sobre a umidade e cinzas dos filés dos peixes. Não foi observado efeito da adição de vitamina A no peixe inteiro (Tabela 5).

Tabela 4. Índices de deposição de lipídio e proteína na carcaça de jundiás, digestivo e hepatossomático, quociente intestinal

Variáveis	Níveis de inclusão de vitamina A (UI / kg)					P
	0	1500	3000	4500	6000	
RC	85,95±1,47	85,80±2,19	87,64±0,91	87,03±1,94	86,17±2,28	NS
IHS	1,59±0,30	1,96±0,40	1,91±0,61	2,25±0,58	2,11±0,46	NS
IDS	1,89±0,53	1,75±0,33	1,88±0,34	2,11±0,36	2,14±0,33	NS
QI	0,81±0,22	0,80±0,12	0,86±0,13	0,84±0,22	0,89±0,17	NS

Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Médias com letras diferentes, na linha, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). NS: não significativo. Parâmetros: RC: rendimento de carcaça com brânquias; IHS: índice hepato-somático; IDS: índice digestivo-somático; QI: quociente intestinal.

Tabela 5. Composição centesimal dos peixes (peixe inteiro e filé) ao final do período experimental

Variáveis	Níveis de inclusão de vitamina A (UI / kg)					P
	%	0	1500	3000	4500	
<b>Peixe inteiro</b>						
PB*	16,25±0,55	16,31±0,13	16,47±0,24	16,69±1,02	17,29±0,59	NS
GOR	1,93±0,94	16,00±0,48	1,88±0,30	1,47±1,06	1,84±0,33	NS
MS	31,75±0,92	30,72±1,52	32,42±1,50	31,38±1,87	30,18±1,82	NS
MM	2,07±0,22	1,79±0,17	1,84±0,06	1,74±0,08	1,81±0,25	NS
<b>Filé</b>						
PB**	18,86±0,46 <sup>B</sup>	19,64±0,31 <sup>AB</sup>	20,01±0,22 <sup>A</sup>	20,17±0,61 <sup>A</sup>	20,27±0,08 <sup>A</sup>	0,007
GOR	2,80±0,57 <sup>AB</sup>	2,39±0,52 <sup>AB</sup>	2,70±0,54 <sup>AB</sup>	2,06±0,37 <sup>B</sup>	3,33±0,54 <sup>A</sup>	0,03
MS	25,27±0,54	25,37±0,31	25,10±0,18	25,04±0,62	25,48±0,28	NS
MM	1,65±0,05	1,63±0,13	1,68±0,40	1,62±0,03	1,61±0,09	NS

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Variáveis: PB: proteína bruta; MM: matéria mineral/cinzas; MS: massa seca; GOR: gordura. Equações da regressão do efeito linear: \*  $y = 16,11 + 0,0002x$ ;  $r^2 = 0,54$ ;  $p = 0,02$ . \*\*  $y = 19,12 + 0,0002x$ ;  $r^2 = 0,65$ ;  $p = 0,0005$ .

### 3.2. Parâmetros hematológicos, parâmetros bioquímicos do plasma e fígado

Não foram observados efeitos significativos nos índices de série eritrocitária e de número de eritrócitos em peixes alimentados com diferentes níveis de vitamina A na dieta (Tabela 6). Os resultados bioquímicos plasmáticos são apresentados na Tabela 7, não foram observados efeitos significativos assim como para os parâmetros hematológicos.

Tabela 6. Hematologia de jundiás alimentados com diferentes níveis de vitamina A

Variáveis	Níveis de inclusão de vitamina A (UI / kg)					P
	0	1500	3000	4500	6000	
Hematócrito (%)	34,00±1,08	35,50±1,77	38,87±1,38	35,50±0,60	36,37±1,42	NS
Eritrócito (milhões/mm <sup>3</sup> )	1,85±0,13	1,84±0,18	1,55±0,11	1,72±0,14	1,73±0,19	NS
Hemoglobina (g/dL)	7,68±0,24	7,87±0,20	8,03±0,25	8,73±0,41	8,14±0,35	NS
VCM (fL)	176,27±12,65	212,0±18,15	236,06±7,04	208,27±27,69	186,63±9,98	NS
HCM (pg)	37,80±4,08	45,42±4,64	51,46±3,32	51,85±7,44	42,65±3,04	NS
CHCM (g/dL)	22,09±0,85	21,24±0,54	21,71±0,91	24,46±1,17	22,71±0,55	NS

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Parâmetros: VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 7. Bioquímica plasmática de jundiás alimentados com diferentes níveis de vitamina A

Variáveis	Níveis de inclusão de vitamina A (UI / kg)					P
	0	1500	3000	4500	6000	
PT (g/dL)	3,97±0,32	4,13±0,41	4,22±0,45	3,69±0,54	3,50±0,52	NS
TG (mg/dL)	402,94±59,67	388,22±69,47	375,84±43,59	397,73±62,00	364,20±25,45	NS
COL (mg/dL)	153,27±16,89	177,08±40,46	156,53±10,31	159,50±16,46	139,59±16,52	NS
GLI (mg/dL)	53,85±10,39	50,50±8,65	51,75±5,64	46,70±6,22	44,30±5,77	NS
AST (UI/dL)	21,34±5,79	15,19±6,09	15,72±11,36	16,49±3,09	17,98±10,04	NS
ALT (UI/dL)	4,71±1,69	5,23±1,74	3,84±0,85	3,82±1,65	3,91±1,32	NS

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Parâmetros: TG: triglicerídeos; COL: colesterol total; PT: proteínas totais; GLI: glicose. AST: Aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase.

Os parâmetros bioquímicos do fígado não foram alterados, exceto ALT (Tabela 8). A atividade da ALT foi menor nos peixes alimentados com 4500 UI/kg do que os alimentados com 0 e 1500 UI/kg, dietas com 0, 1500, 3000 e 6000 UI/kg não apresentaram efeitos significativos.

Tabela 8. Bioquímica hepática dos jundiás alimentados com diferentes níveis de vitamina A

Variáveis	Níveis de inclusão de vitamina A (UI / kg)					P
	0	1500	3000	4500	6000	
AST (UI/dL)	2,10±0,37	2,23±0,40	2,08±0,38	2,01±0,40	1,97±0,22	NS
ALT (UI/dL)	1,40±0,22 <sup>A</sup>	1,23±0,30 <sup>A</sup>	1,13±0,31 <sup>AB</sup>	0,67±0,23 <sup>B</sup>	1,00±0,43 <sup>AB</sup>	0,006
Amônia (µmol/g)	12,10±1,13	11,05±2,24	12,56±2,69	12,93±3,03	13,06±3,70	NS
Glicose (µmol/g)	5,37±1,41	3,56±0,85	4,36±0,94	5,19±1,61	5,11±1,12	NS
Glicogênio (µmol glicose/g)	401,13±178,29	408,71±105,10	201,77±119,69	358,17±109,03	320,82±184,37	NS
AA (µmol/g)	48,88±12,31	33,43±6,91	56,69±16,24	38,43±15,28	38,79±15,42	NS
Proteína (mg/g)	39,27±5,93	33,26±7,52	36,31±8,95	42,81±9,97	41,95±7,58	NS

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Parâmetros: AST: Aspartato aminotransferase; ALT: Alanina aminotransferase, AA: Aminoácidos livres.

### 3.3. Parâmetros de estresse oxidativo em tecidos de jundiás

Os parâmetros do estresse oxidativo em jundiás foram diferentes nos peixes alimentados com dietas contendo diferentes níveis de vitamina A e são mostradas na Tabela 9 e Figura 2. As concentrações de TBARS nos peixes foram diferentes no fígado, músculo e brânquias. NPSH e GST não foram significativamente diferentes nas brânquias e músculo. A atividade de catalase (CAT) foi analisada somente no fígado e foi inferior em peixes



alimentados com dietas 3000, 4500 e 6000 UI/kg (Figura 1.A). As concentrações de TBARS foram menores no fígado de peixes alimentados com dietas contendo níveis mais elevados de vitamina A (4500 e 6000 UI/kg) apresentadas na Figura 1.B.

Tabela 9. Parâmetros oxidativos dos jundiás alimentados com diferentes níveis de vitamina A

Variáveis	Níveis de inclusão de vitamina A (UI / kg)					P
	0	1500	3000	4500	6000	
<b>Fígado</b>						
NPSH	0,58±0,08 <sup>B</sup>	0,86±0,12 <sup>A</sup>	0,76±0,08 <sup>A</sup>	0,87±0,04 <sup>A</sup>	0,81±0,10 <sup>A</sup>	0,0001
GST	0,28±0,04 <sup>A</sup>	0,25±0,05 <sup>AB</sup>	0,16±0,02 <sup>B</sup>	0,17±0,03 <sup>B</sup>	0,21±0,08 <sup>AB</sup>	0,002
SOD	5,14±1,05 <sup>A</sup>	3,68±0,42 <sup>AB</sup>	4,76±0,65 <sup>AB</sup>	3,45±0,58 <sup>AB</sup>	3,18±1,59 <sup>B</sup>	0,01
<b>Brânquias</b>						
NPSH	0,16±0,01	0,14±0,02	0,15±0,03	0,14±0,01	0,16±0,01	NS
GST	0,15±0,03	0,15±0,02	0,17±0,03	0,13±0,01	0,16±0,02	NS
TBARS	2,53±0,53 <sup>A</sup>	2,08±0,48 <sup>AB</sup>	1,84±0,15 <sup>AB</sup>	1,45±0,36 <sup>B</sup>	1,81±0,40 <sup>AB</sup>	0,02
<b>Músculo</b>						
NPSH	0,33±0,02	0,35±0,01	0,35±0,01	0,35±0,01	0,35±0,01	NS
GST	0,14±0,01	0,13±0,03	0,12±0,01	0,11±0,01	0,10±0,01	NS
TBARS	1,82±0,32 <sup>A</sup>	1,13±0,41 <sup>B</sup>	0,67±0,19 <sup>BC</sup>	0,66±0,16 <sup>BC</sup>	0,51±0,14 <sup>C</sup>	<0,001

Valores expressos como média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes na linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Parâmetros: TBARS = substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (nmol MDA/mg proteína); SOD = Superóxido Dismutase (UI SOD / mg proteína); GST = Glutathiona-S-Transferase (µmol GS-DNB/min/mg proteína); NPSH = Tióis não proteicos (µmol SH/g tecido).

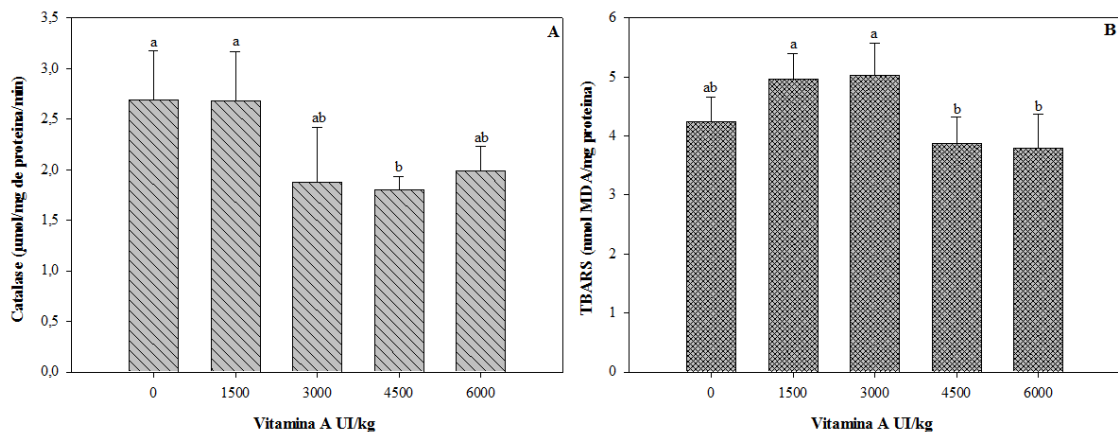


Figure 2. A: Atividade da enzima catalase no fígado de peixes alimentados com diferentes níveis de vitamina A; B: substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado de peixes alimentados com diferentes níveis de vitamina A. Intervalo: desvio padrão. Letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). Amplitude: Desvio padrão.

#### 4. Discussão

Os peixes cresceram proporcionalmente ao aumento das concentrações de vitamina A na dieta. Não foram observados sinais de deficiência de vitamina A nos jundiás, no período testado, onde a sobrevivência foi de 100%. Os resultados observados no presente estudo devem estar relacionados com o possível conteúdo de vitamina A da dieta basal (sem inclusão



de vitamina A comercial), visto que essas dietas continham 5% de farinha de peixes (comumente rica em vitamina A). A razão pela qual foi adicionado farinha de peixe, o que caracterizou a dieta como semi-purificada, foi melhorar a palatabilidade da ração em questão.

Exigências de nutrientes para peixes podem ser estimada pelo modelo de regressão segmentada (Robbins et al., 1979). A "Linear Response Plateau - LRP" permite resultados consistentes em uma avaliação final, em comparação com outros modelos não lineares e ganho de peso é o melhor parâmetro para avaliar exigência nutricional de uma espécie (Portz et al., 2000). Assim, com base na análise LRP, o nível ótimo de suplementação é 3511 UI/kg para ganho de peso e 3519 UI/kg para o ganho de peso relativo. Os resultados obtidos neste estudo são semelhantes aos de Shim & Tan (1990), para estes autores a exigência recomendada para peixes de água doce foi estimada entre 2000 UI e 4000 UI/kg na dieta para manter o crescimento. Determinar o nível mínimo de um nutriente que assegura o crescimento máximo de um peixe é considerado um componente importante da eficácia de custos na composição de alimentos para peixes.

A estimativa de exigência de nutrientes com base no ganho de peso apenas pode ser enganosa, porque um animal pode depositar uma grande quantidade de gordura sem crescimento real (Phillips e Brockway, 1957). A concentração de gordura no filé de peixe tende a diminuir à medida que o nível de vitamina A na dieta é aumentada até o nível de 4500 UI/kg. Já a dieta contendo 6000 UI/kg apresentou maior quantidade de gordura no filé. Outro resultado importante quanto à qualidade de filé foi observado em peixes que receberam quantidades superiores a 3000 UI/kg, apresentaram maior quantidade de proteína no filé (Tabela 5). Estes resultados podem ser explicados porque as células possuem receptores de ácido retinóico. Estes ácidos ou derivados (retinóides) atuam como os hormônios esteroides por induzir a síntese de RNA mensageiro e de proteína específica (Gouillou-Constant e Guillaume, 2001). Neste estudo não houve diferença para composição centesimal de corpo inteiro, assim como observado por Thompson et al. (1995), que ao fornecer diferentes níveis de vitamina A, não observaram efeito significativo sobre a composição corporal de truta arco-íris.

A atividade de alanina aminotransferase (ALT) no fígado foi reduzida em tratamentos com níveis mais elevados de vitamina A (Tabela 8). As transaminases são enzimas relacionadas à transaminação dos aminoácidos no metabolismo intermediário e são considerados indicativos de catabolismo de proteína. A desaminação da proteína ocorre quando há excesso de proteína na dieta ou desequilíbrio de aminoácidos essenciais na dieta, quando o corpo começa a usar a proteína com fonte de energia (Veiverberg et al., 2008;

Champe et al., 2009). Quanto aos efeitos biológicos dos retinóides (metabólitos da vitamina A) ocorrem principalmente por meio da ativação de dois grupos de receptores no núcleo da célula, os receptores para ácido retinóico (RAR) e os receptores X de retinóides (RXR) (Ross et al. 2000). Ao se ligarem aos receptores nucleares, regulam a expressão gênica, processos de diferenciação e proliferação celular, crescimento e desenvolvimento de estruturas do esqueleto, além de sistemas nervoso e imunológico (Borba et al., 2012). Receptores estes ativados por diferentes isômeros do ácido retinóico, o que produz uma reação em cadeia que resulta na ativação ou supressão da transcrição de genes que codificam a síntese de determinadas proteínas, esta pode ser a via pela qual a vitamina A afeta a síntese e deposição de proteína nos tecidos (Guimarães, 2009). Ao codificar a síntese de determinadas proteínas, a reação em cadeia resultante da ativação de receptores ativados por isômeros do ácido retinóico pode contribuir para deposição de tecido proteico no filé, como observado em animais que receberam maior quantidade de vitamina A na dieta. Estes apresentaram maior quantidade de proteína no filé e maior peso.

Apesar de haverem poucos estudos relacionados à ação antioxidante da vitamina A, recentemente esse tema tem ganhado destaque, impulsionando a pesquisa de seus precursores, principalmente os carotenoides, anteriormente reconhecidos apenas por sua atividade pró-vitamínicos, e que atualmente são considerados como importantes antioxidantes (Baydas et al. 2002; Ramalho et al., 2003; Paiva e Russel, 1999). Os mesmos autores caracterizam os carotenoides e os retinóis como importantes sequestradores de radical oxigênio *singlet*, que interrompem a geração de espécies reativas ao oxigênio ainda nas etapas iniciais de sua formação. Uma única molécula de retinol ou  $\beta$ -caroteno é capaz de inativar vários radicais oxigênio *singlet* antes de ser destruída (Bast A, et al., 1998). O  $\beta$ -caroteno é ainda reconhecido como varredor de radicais peroxil, especialmente em condições de baixa tensão de oxigênio.

A atividade de CAT (Figura 2.A) reduziu no fígado de peixes alimentados com dieta contendo 3000, 4500 e 6000 UI/kg, a menor atividade foi a dieta 4500 UI/kg. Anschau (2011) encontrou resultados em que a infecção causada por *Trypanosoma evansi* causou um aumento significativo na atividade de CAT em ratos, e concluiu que as atividades da enzima antioxidante CAT é aumentada diretamente proporcional aos elevados níveis de estresse oxidativo. Nesse sentido, a dieta alimentar de peixe contendo 4500 UI/kg exibem menor atividade da enzima catalase, logo peixes que receberam essa dieta tinham níveis mais baixos de estresse oxidativo, ou porque a quantidade de vitamina A foi adequada, ou seja, não houve estresse devido à falta do nutriente (vitamina A) e/ou porque a vitamina A possui poder

antioxidante. A atividade de GST e SOD também diminuiu no fígado, quando houve aumento nos níveis de vitamina A na dieta (Tabela 9).

A quantificação de MDA foi usada para avaliar a extensão do dano oxidativo. Esta medição pode ser realizada por reação de substâncias que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBA) (Ohkawa et al., 1979). A peroxidação lipídica medida pelo TBARS no tecido hepático apresentou valores inferiores para peixes alimentados com dietas contendo 4.500 e 6.000 UI/kg de vitamina A (Figura 2.A). Em vários estudos na nutrição de peixes que avaliam o efeito antioxidante de vitamina E mostraram uma diminuição nos níveis de malondialdeído com a adição de vitamina E na dieta (Sau et al., 2004; Lim et al., 2005; Peng et al., 2009; Abdel-Hameed et al., 2012). Estudos com a vitamina A não são suficientes para explicar a sua potência antioxidante e como ela ocorre, mas neste estudo, podemos dizer que a vitamina A atua como um mecanismo de defesa ao dano oxidativo e/ou dano lipídico, pois quando apresentam valores elevados, interpreta-se que o potencial antioxidante é diminuído e/ou quando o stress oxidativo é elevado.

Em soluções homogêneas vias de reação foram encontrados para dependem tanto da natureza da reação de radicais livres e a estrutura de carotenoide (El-Agamey et al., 2003; Galano et al., 2010; Han et al., 2012). Três mecanismo possível, como as reações de equações, pode estar envolvidas (Han et al., 2012):  $\text{Car(H)} + \text{RO}^\bullet \rightarrow \text{Car(H)}^{\bullet+} + \text{RO}^-$  (ET) (Buer et al., 2010);  $\text{Car(H)} + \text{RO}^\bullet \rightarrow [\text{RO}\cdots\text{Car(H)}]^\bullet$  (RAF) (Paiva et al., 1999); e  $\text{Car(H)} + \text{RO}^\bullet \rightarrow \text{Car}^\bullet + \text{ROH}$  (HAT) (Pauwels et al., 2007).

A captação de elétrons para carotenoides que limpam ânion superóxido  $\text{O}_2^{\bullet-}$  foi primeiramente confirmada em condições experimentalmente não radiativas (Foss et al., 2004). A reação detalhada de carotenoides com  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , pode ocorrer como duas vias possíveis (Gou et al., 2009; Opstad et al., 2010; Han et al., 2012):  $\text{Car(H)} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Car(H)}^{\bullet+} + \text{O}_2^{2-}$ ; e  $\text{Car(H)} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Car(H)}^{\bullet-} + \text{O}_2$ . A primeira reação é uma transferência de elétrons a partir do carotenoide como na reação onde o carotenoide é oxidado pelo  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para formar o cátion radical correspondente. A segunda reação define uma nova atividade anti-radical de carotenoides ocupando elétrons, como o carotenoide que está sendo reduzido a um ânion radical pela  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Han et al., 2012).

Em havendo fontes, sejam endógenas ou exógenas para a formação de espécies reativas, ocorre estresse oxidativo. A célula se defende com e sem a presença de enzimas. Neste caso, quando ocorre defesa não enzimática, a atividade dessas enzimas é reduzida assim como observado nos resultados do presente estudo (Tabela 9 e Figura 2.A). Isso se deve a

ação de carotenoides e retinóis que agem doando elétrons para as espécies reativas ao oxigênio, logo estas espécies deixam de ser reativas ao oxigênio, dispensando a atividade enzimática. É provável que a quantidade de glutatona reduzida se mantenha, pois não há necessidade de oxidar. Logo diminui a atividade de glutatona transferase (Tabela 9), pois esta tem função de catalisar a glutatona oxidada e metabolizar xenobióticos, temos uma economia de energia, pois não há necessidade de atividade enzimática. Quando há diminuição do potencial das espécies reativas, diminui a peroxidação lipídica (Figura 2.B), além de diminuir a peroxidação proteica e danos de DNA (Kelly et al. 1998).

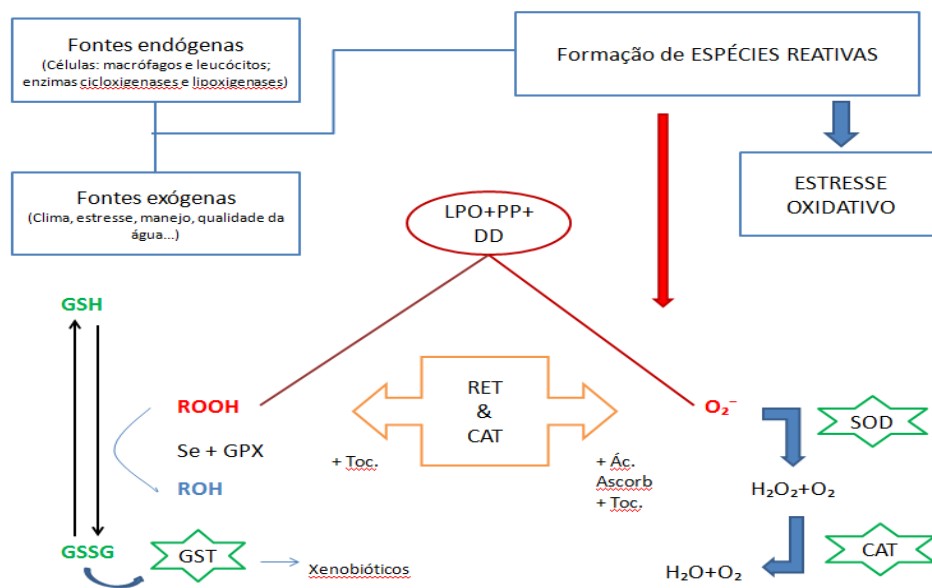


Figura 3. Esquema de possíveis fontes que levam a formação de espécies reativas e mecanismos de defesa. Adaptado de Kelly et al. (1998). LPO: peroxidação lipídica; PP: peroxidação proteica; DD: dano de DNA; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; CAR: carotenoides; RET: retinóis; GPx: glutatona peroxidase; GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; e GST: glutatona transferase.

Níveis entre 4500 e 6000 UI/kg podem ser benéficos em reduzir o dano oxidativo e danos lipídicos, além de melhorar o crescimento. O nível de 4500 UI/kg resultou em filé de melhor qualidade. Com base nestes resultados, sugerimos que a adição de vitamina A seja de 4500 UI/kg na alimentação de jundiás.

## 5. Referências

- Abdel-Hameid, N. H. et al., 2012. Dietary vitamin E requirement for maximizing the growth, conversion efficiency, biochemical composition and haematological status of fingerling *Channa punctatus*. *Aquaculture Research*. 43, 226–238.
- Anschau, V., 2011. Estresse oxidativo e parâmetros hematológicos como biomarcadores da infecção experimental com *Trypanosoma evansi* em ratos. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. PPGCA, Lages.
- Aoac. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 1995. 16 ed., 1137p.
- Baldisserotto, B.; Silva, L.V.F. 2004. Qualidade da água. In: Baldisserotto, B.; Radunz Neto, J. (Eds.) Criação de jundiá. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. 1, 73-92.
- Bast A, et al., 1998. Antioxidant effects of carotenoids. *Int J Vit Nutr Res*. 68: 399-403.
- Baydas G, et al., 2002. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Arch Med Res*. 33, 276-80.
- Bligh, E.G.; Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry*. 37, 911-917.
- Borba, M.R., et al., 2012. Vitaminas e Minerais. In: Fracalossi, D.M. e Cyrino, J.E.P. Nutriaqua. Florianópolis. 1, 121-165.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Buege, J.A., Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol*. 52 (1978) 302-309.
- Buer, C.S.; Imin, N.; Djordjevic, M.A. 2010. Flavonoids: New roles for old molecules. *J. Integr. Plant Biol*. 52, 98–111.
- Champe, P.C., et al., 2009. *Bioquímica Ilustrada*. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed. 528.
- Dubois, M.G. et al., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, San Diego. 28, 350-358.
- El-Agamey, A.; McGarvey, D.J. 2003. Evidence for a lack of reactivity of carotenoid addition radicals towards oxygen: A laser flash photolysis study of the reactions of carotenoids with acylperoxyl radicals in polar and non-polar solvents. *J. Am. Chem. Soc*. 125, 3330–3340.
- Ellman, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82, 70-77.

- Fernández, I.; Gisbert, E. 2011. The effect of vitamin A on flatfish development and skeletogenesis: A review. *Aquaculture*. 315, 34-48.
- Foss, B.J., et al., 2004. Direct superoxide anion scavenging by a highly water-dispersible carotenoid phospholipid evaluated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 2807–2812.
- Galano, A.; Vargas, R.; Martínez, A. 2010. Carotenoids can act as antioxidants by oxidizing the superoxide radical anion. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12, 193–200.
- Gouillou-Coustans M.F., Guillaume J., 2001. Vitamin nutrition. In: *Nutrition and feeding of fish and crustaceans*. (ed. by J. Guillaume, S. Kaushiki, P. Bergot & R. Métailler), Springer-Praxis, Chichester, UK. 145-167.
- Guo, J.-J.; Hsieh, H.Y.; Hu, C.-H. 2009. Chain-breaking activity of carotenes in lipid peroxidation: A theoretical study. *J. Phys. Chem. B.* 113, 15699–15708.
- Guimaraes, I.G. Vitamina A em dietas para tilápia do Nilo. 2009. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 100.
- Habig, W. H., et al., 1974. Glutathione Stransferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249, 7130-7139.
- Han, R.-M.; Zhang, J.-P.; Skibsted, L.H. 2012. Reaction Dynamics of Flavonoids and Carotenoids as Antioxidants. *Molecules*. 17, 2140-2160.
- Kelly S, et al., 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*. 106(7), 375-384.
- Lim, Y. H., Shiau, S. H. 2005. Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, at two lipid levels, and their effects on immune responses. *Aquaculture*. 248, 235–244.
- Lowry, O. H., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Mc Cord, J.M., Fridovich. I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemoglobin, *J. Biol. Chem.* 244 (1969), 6049-6055.
- Montes-Girao, P. J.; Fracalossi, D. M. 2006. Dietary lysine requirement as basis to estimate the essential dietary amino acid profile for jundiá, *Rhamdia quelen*. *Journal of World Aquaculture Society*, Oxford. 37(4), 388-396.
- MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura, 2011 e 2013, Brasília, 2012 e 2014. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/informações-e-estatísticas/estatística-da-pesca-e-aquicultura>.
- Nelson, D. P.; Kiesov, L. A. 1972. *Analytical Biochemistry*. 49, 474-478.

- NRC - National Research Council. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, D.C: National Academies Press, 376p.
- Ohkawa, H., Ohishi, N.; Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Opstad, C.L.; Sliwka, H.-R.; Partali, V. 2010. Facile electron uptake by carotenoids under mild, nonradiative conditions: Formation of carotenoid anions. *Eur. J. Org. Chem.* 4637–4641.
- Paiva S. A. R., Russel RM. 1999.  $\beta$ -caroteno and others carotenoids as antioxidants. *J Am Coll Nutr.* 18, 426-33
- Pauwels, E.K.J.; Erba, P.A.; Kostkiewicz, M. 2007. Antioxidants: A tale of two stories. *Drug News Perspect.* 20, 579–585.
- Peng, L. I.; Gatlin, D. M., 2009. Dietary Vitamin E requirement of the red drum *Sciaenops ocellatus*, *Aquaculture Nutrition.* 15, 313–319.
- Phillips, A.M., Brockway, D.R., 1957. The nutrition of trout: IV. Vitamin requirements. *Prog. Fish-Cult.* 19,119– 123.
- Portz, L., 2000. Regressão segmentada como modelo na determinação de exigências nutricionais de peixes. *Scientia Agricola.* 57(4), 601-607.
- Ramalho RA, et al, 2003. Doenças cardiovasculares: efeito antixodante das vitaminas A, C e E. *Rev Metab Nutr.* 7, 6-9.
- Reitman, S; Frankel, S 1957. Glutamic – pyruvate transaminase assay by colorimetric method. *Am. J. Clin. Path.* 28, 56.
- Robbins, K.R., et al., 1979. Estimation of nutrient requirements from growth data. *J. Nutr.* 109, 1710–1714.
- Ross, S.A., et al., 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev.* 80, 1021-1054.
- Salhi, M. et al., 2004. Growth, feed utilization and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen*, fry fed diets containing different protein and energy levels. *Aquaculture, Amsterdam.* 231, 435-444.
- SAS. Statistical Analysis System., 2013. User's Guide. Version 8.02. SAS Institute INC. North Caroline, SAS, 3864p.
- Sau, S. K., et al., 2004. Dietary vitamin E requirement, fish performance and carcass composition of rohu (*Labeo rohita*) fry. *Aquaculture.* 240, 359–368.
- Shim, K.F. & Tan, C.H., 1990. The dietary requirement of vitamin A in guppy (*Poecilla reticulata* Peters). In: Takeda, M., Watanabe, T. (Eds.), *Proceedings of the Third*

- International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish: the Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture. Japan. 133-140.
- Spies, J.R., 1957. Colorimetric procedures for amino acids. *Methods in Enzymology*.3, 467-477.
- Thompson, I., et al., 1995. The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. *Aquaculture*. 133, 91–102.
- Veiverberg, C.A. et al. 2008. Farelo de soja como substituto à farinha de carne e ossos em dietas para juvenis de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*). *Boletim Instituto de Pesca*, São Paulo. 34(3), 463 – 472.
- Verdow, H., et al., 1978. Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res.* 12, 399-402.
- Wiils, E. D. 1987. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: K Snell e B. Mullock (Eds), *Biochemical toxicology: a practical approach*. IRL Press, Oxford. 127-152.



## 5 CONCLUSÕES GERAIS

- A quantidade de vitamina A na dieta interfere no crescimento de jundiás da espécie *Rhamdia quelen*.
- O nível mínimo recomendado para crescimento de jundiás é de 3500 UI/kg dieta;
- O aumento de vitamina A na dieta proporciona maior quantidade de proteína no filé de jundiás.
- Níveis de vitamina A até 6000 UI/kg dieta não afetam parâmetros hematológicos;
- A elevação dos níveis de vitamina A, testados no presente estudo (a partir de 4500 UI/kg) melhora o sistema de defesa antioxidante de peixes.
- Baseado nos resultados bioquímicos, para as condições experimentais, recomendamos o nível de 4500 UI/kg;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAR, E. C.; KIRON, V.; SATOH, S.; OKAMOTO, N.; WATANABE, T. Effects of dietary b-carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fisheries Sci.** 66:1068-1075, 2000.
- AMAR, E.C.; KIRON, V.; SATOH, S. et al. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defense mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research.**, n.32, suppl. 1. p.162-173, 2001.
- ARMSTRONG D, BROWNE R. The analysis of the free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. **Adv Exp Med Biol.** 366(43):58. 1994.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 16 ed., 1137p., 1995.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Org.). **Espécies Nativas para a Piscicultura no Brasil**, 2º Edição Revisada e Ampliada. Editora UFSM, 606 p., 2010.
- BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Criação do jundiá**. Santa Maria: UFSM, 2004. 232p.
- BARREIROS ALB, DAVID JM. Estresse Oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova.** 29(1):113-23, 2006.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry**, v.37, n.8, p. 911-917, 1959.
- BLOMHOFF, R. Transport and metabolism of vitamin A. **Nutrition Reviews**, v.2, n.52, p.S13-S23, 1994.
- BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse Medicale**, v. 31, n. 25, p. 1174-1184, 2002.
- BORBA M. R.; FRACALOSSO D. M.; FREITAS F. A. Efeito da suplementação de vitamina C sobre a susceptibilidade de alevinos de jundiá. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2007.
- BORBA, M.R.; e SÁ, M.V.C.; ABREU, J.S. Vitaminas e Minerais. Páginas 121-165 In: FRACALOSSO, D.M. e CYRINO, J.E.P. **Nutriaqua**. Florianópolis, 2012.
- CHOW, C. K. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. **Am. J. Clin. Nutr.** 32:1066-1081; 1979.
- COMBS Jr., G.F. **The vitamins, fundamental aspects in nutrition and health**. London: Academic Press, 1992. 528 p.

DAVIS, K.B.; SIMCO, W.A. et al. Effect of reduction of supplementary dietary vitamins on the stress response of channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of The World Aquaculture Society**, v.29, n.3, p.319-324, 1998.

FAO - Food Agriculture Organization. **State of world aquaculture: 2012**. Rome: FAO. 251p, 2012.

FERNÁNDEZ, I.; GISBERT, E. The effect of vitamin A on flatfish development and skeletogenesis: A review. **Aquaculture** 315. p: 34-48, 2011.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FORESTI, F., VOLPATO, G.L., GARCIA, E.M., et al. Medidas de alguns parâmetros morfológicos e fisiológicos do sangue de bagre (*Rhamdia hilarii* Valenciennes, 1840) (Pisces: Pimelodidae). **Ciência e Cultura**, Rio de Janeiro, v.29, n.7, 580, 1977.

GRAHAM, G.L.; JONES, J.H. The histopathologic features of vitamin A deficiency in a fish (*Carassius auratus*). **Transactions of the American Microscopy Society**, v.88, n. 1, p.168-169, 1969.

GUIMARAES, I.G. **Vitamina A em dietas para tilápia do Nilo**. 2009. 100p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

HALVER, J.E. Recent advances in vitamin nutrition and metabolism in fish. In: COWEY, C.B.; MacKIE, A.M.; BELL, J.G. (Ed.). **Nutrition and feeding in fish**. London: Academic Press, 1985. p.415-429.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3<sup>a</sup> ed. New York: Oxford University, 1999. 936 p.

HEPHER, B. **Nutrition of pond fishes**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 388 p.

HOLE, S.M.; TAYLOR, K.D.A. Methods of extraction composition and stability of vitamin A and other components in dogfish (*Squalus acanthias*) liver oil. **Food Chemistry**, v.55, n.3, p.215-220, 1996.

HUANG, D.J. OU, B. PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. V. 53, n. 6, p. 1841- 1856, 2005.

KATSUYAMA, M.; MATSUNO, T. Carotenoid and vitamin A, and metabolism of carotenoids,  $\beta$ -carotene, canthaxanthin, astaxanthin, zeaxanthin, lutein and tunaxanthin, lutein and tunaxanthin in tilapia *Tilapia Nilotica*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 90B, n. 1, p. 131-139, 1988.

KAVAMOTO, E.T., RANZANI-PAIVA, M.J., TOKUMARU, M. Estudos hematológicos em "bagre" *Rhamdia hilarii* (Val.1840) teleósteos, no estágio de desenvolvimento gonadal maduro. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.10, n.único, p.53-60, 1983.

KIRKHAM P, RAHMAN I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. **Pharmacology & Therapeutics**. 111(2):476-94, 2006

KORI-SIAKPERE, O. Hematological characteristics of *Clarias isheriensis* Sydenham. **Journal of Fish Biology**, London, v.27, p.259-63, 1985.

KOSHIO, S. Vitamins. In: NAKAGAWA, H.; SATO, M.; GATLIN III, D. M. Dietary supplements for the health and quality of cultured fish. UK: **Cromwell Press**. p: 35-46, 2007.

LAZZARI, R. et al. Hematologia de jundiás em resposta ao nível de proteína na dieta. **Ciência Rural**, v.12, n.2, 2011.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. Worth Publishers, New York, 2000.

LIM, C. & WEBSTER, C.D. Nutrition and fish health. **The Haworth Press, Binghamton, NY**, 2001.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. M.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 15, p.75-88, 2005.

MASUMOT, T. Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. 2002. Pages 131-146 in Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture, edited by C.D. WEBSTER and C. LIM. CAB International Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK.

MC DOWELL, D. R. **Vitamins in animal and human nutrition**. Iowa: Iowa University Press, Yowa, IA, USA, 2000

MIWA, S.; TAMANO, K. Retinoic acid stimulates development of adult-type chromatophores in the flounder. **Journal of Experimental Zoology**, v.284, p.317- 324, 1999.

MOHAMED, J.S.; SIVARAM, V.; CHRISTOPHER ROY, T.S.; MARIAN, M.P.; MURUGADASS, S.; HUSSAIN, M.R. Dietary vitamin A requirement of juvenile greasy grouper (*Epinephelus tauvina*). **Aquaculture**, v.219, p.693-701, 2003

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. **BOLETIM ESTATÍSTICO DA PESCA E AQUICULTURA**, 2011 e 2013, Brasília, 2012 e 2014, . Disponível em: . Acesso em 10 de abril de 2014.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. **Notícias: Consumo de pescado no Brasil aumenta 23,7% em dois anos**. <http://www.mpa.gov.br/index.php/imprensa/noticias/2226-consumo-de-pescado-no-brasil-aumenta-237-em-dois-anos>. Acessado em 03/2014.

NORBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of fish**. Washington: National Academic Press, 1993. 114 p.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, D.C: National Academies Press, 2011. 376p.

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem** 95: 351-358, 1979.

ONG, D.E. Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. **Nutrition Reviews** , v.52, n.2, p.S24-S 31, 1994.

ORNSRUD, R.; GRAFF, L.E.; HOIE, S. et al. Hypervitaminosis A in first-feeding fry of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture Nutrition**., v.8, n.1, p.7-13, 2002.

PAVANATO, M.A.; LLESUY, S.F. Espécies ativas de oxigênio e de nitrogênio. In: Marroni, N. P. (org). **Estresse oxidativo e inflamação: dos modelos experimentais à clínica**. Canoas: Ed. ULBRA, p.12-24, 2008

PEIL, S.Q. et al. Adição de vitamina A na dieta de pós-larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Biodiversidade Pampeana**, Uruguiana, v.5, n.1, p.9-15, 2007.

PARVEZ, S., RAISUDDIN, S., 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20, 112–117.

PETEAN, CC; GOMES, FM; ROSA E SILVA, JC; FERRIANI, RA; MOURA, MD; REIS, RM; NAVARRO, PAAS. Peroxidação lipídica e vitamina E no soro e no fluido folicular de mulheres inférteis com endometriose submetidas à estimulação ovariana controlada. *Rev Bras Ginec Obst.* 2007; 29(6):303-9.

RADÜNZ NETO J.; BORBA, M. R., Exigências nutricionais e alimentação do Jundiá. In: FRACALOSSI, D.M.; CYRINO, J.E.P. **NUTRIAQUA**. Florianópolis, Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p.241-253, 2012.

SIES, STAHL & SEVANIAN, 2005. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **Journal of Nutrition**. 135(5), 969-972.

SILVA, S.S. de; ANDERSON, T.A. **Fish nutrition in aquaculture**. London: Chapman & Hall, 1995. 319 p.

SPADA, P.K.W.D.S.; SILVA, C.O. Antioxidantes não enzimáticos. In: Salvador M.; Henriques J.A. **Radicais livres e a resposta ao estresse oxidativo**. Canoas, Ed. Ulbra, 2004, 204p.

STEFFENS, W. **Principles of fish nutrition**. New York: Haslsted Press; John Wiley, 1989. 384p.

STEPHENSON, C, B. Vitamin A, infection, and immune function. **Annu. Rev. Nutr.** 2001.21:167-192. Downloaded from [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org) by Universidade Federal da Santa Maria on 05/07/14.

TAVARES-DIAS, M. et al. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá (*Rhamdia quelen*) (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.32, p.693-698, 2002.

TEIXEIRA, E.A. et al. Composição corporal e exigências nutricionais de aminoácidos para alevinos de tilápia (*Oreochromis sp.*). **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, v.9, n.2, p. 239-246, 2008.

THOMPSON, I.; CHOUBER, C.; HOULIHAN, D.F. et al. The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. **Aquaculture**, v.133, p.91-102, 1995.

TOGUYENI, A.; FAUCONNEAU, B.; BOUJARD, T. et al. Feeding behaviour and food utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus*: effect of sex ratio and relationship with the endocrine status. **Physiology & Behaviour**, v.62, n.2, p.273-279, 1997.

WEBSTER, C. D.; LIM, C. Introduction to fish nutrition. In: WEBSTER, C. D.; LIM, C. **Nutrient Requirement and Feeding of Finfish for Aquaculture**. London: CABI Publishing, 2002. Cap. 1, p. 1-27.

WEILER, R.; SCHULTZ, K.; JANSSEN-BIENHOLD, U. Retinoic acid induces vigorous spinule formation at the terminal dendrites of fish retinal horizontal cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.38, n.4, p.S1164, 1997.

WEILER, R.; POTTEK, M.; HE, S. et al. Modulation of coupling between retinal horizontal cells by retinoic acid and endogenous dopamine. **Brain Research Review**, v.32, p.121-129, 2000.

YAGI, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. **Methods Mol Biol**. 108:101-6. 1998.

YOSHIDA, Y.; ITO, N.; SHIMAKAWA, S.; NIKI, E. Susceptibility of plasma lipids to peroxidation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.305, n.3, p.747-753, 2003.



**ANEXO A** - Imagem do sistema de recirculação de água do laboratório de piscicultura da UFSM (Campus de Palmeira das Missões).



**ANEXO B** - Imagem de do acetato retinol (tom alaranjado) adicionado a pré mistura vitamínica mineral durante a confecção da ração experimental no laboratório de bromatológica da UFSM (Campus de Palmeira das Missões).





**ANEXO C** - Imagem do tanque/unidade experimental com peixes da espécie *Rhamdia quelen* nas instalações experimentais do laboratório de piscicultura da UFSM (Campus de Palmeira das Missões).



**ANEXO D – Carta de aprovação – CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais - UFSM****UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM****CARTA DE APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

**Título do Projeto:** "Desempenho, hematologia e parâmetros oxidativos de jundiás (Rhamdia quelen) submetidos a dietas contendo vitamina A."

**Número do Parecer:** 123/2014

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Rafael Lazzari

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

**OBS:** Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

**DATA DE APROVAÇÃO:** 12/11/2014.

Santa Maria, 12 de novembro de 2014.

Prof.ª Dr.ª Vania Lucia Loro  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM