

RAFAEL ALVES VIANNA

**SUPLEMENTAÇÃO DE TREONINA DIGESTÍVEL EM RAÇÕES PARA  
ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO DESAFIADOS COM *SAPROLEGNIA*  
*INFESTANS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

V617s  
2012

Vianna, Rafael Alves, 1987-

Suplementação de treonina digestível em rações para  
alevinos de tilápia do nilo desafiados por  
*Saprolegnia infestans* / Rafael Alves Vianna. - Viçosa, MG,  
2012.

xii, 31f. : il ; 29cm.

Orientador: Eduardo Arruda Teixeira Lanna.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia

1. Tilápia (Peixe). 2. Tilápia (Peixe) - Nutrição.  
3. Aminoácidos na nutrição animal 4 *Saprolegnia infestans*.  
5. Tilápia (Peixe) - Comportamento. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 639.3774

RAFAEL ALVES VIANNA

**SUPLEMENTAÇÃO DE TREONINA DIGESTÍVEL EM RAÇÕES PARA  
ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO DESAFIADOS COM *SAPROLEGNIA*  
*INFESTANS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho de 2012.

---

Prof. Juarez Lopes Donzele  
(Coorientador)

---

Profa. Melissa Izabel Hannas  
(Coorientador)

---

Prof. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho

---

Prof. Eduardo Arruda Teixeira Lanna  
(Orientador)

À Deus.  
Ao meu pai Marcos, e à Roseli  
Aos meus irmãos Caroline e Gustavo, a sobrinha e afilhada Anna Clara.  
Aos meus avós, Helena, Benedicto, Conceição e Francisco (*in  
memorian*).  
**Dedico!**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), por intermédio do Departamento de Zootecnia (DZO), pela acolhida e oportunidade de realização deste curso.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

A Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), pelos fornecimentos dos peixes para a realização desta pesquisa.

Ao Professor Juarez Lopes Donzele, que desde a graduação vem me ajudando com ensinamentos e conselhos, que sem os quais, eu acredito, não seria possível ter conduzido este trabalho.

Ao Professor e amigo Márvio Lobão Teixeira de Abreu, que durante o tempo todo, mesmo ao estar longe, se fez presente com sugestões, pelo companheirismo e ajuda muito obrigado.

Aos professores coorientadores: Melissa Izabel Hannas, Juarez Lopes Donzele, por todas as conversas, críticas e sugestões, não só a respeito deste trabalho, mas a vida. Por me fazerem lembrar que não existe só vida acadêmica, mas também, pessoal e espiritual.

Ao professor Oswaldo Pinto Ribeiro Filho por toda ajuda e por ter aceitado prontamente compor a banca de defesa, por todos os conselhos e ajuda.

Aos professores Marcos Antonio Delmondes Bomfim, Luís Gustavo Braga, pela participação nessa dissertação, tenho certeza que seus conselhos ajudaram muito.

A professora Théa Miriam Machado, pela participação, paciência, e puxões de orelha, muito obrigado, a senhora me fez lembrar de algumas coisas muito importantes.

Reservo-me no direito de escrever mais algumas palavras de agradecimento ao professor Eduardo Arruda Teixeira Lanna neste trabalho devido a todo apoio e confiança em mim depositados. Desde a graduação, muito obrigado pelos puxões de orelha, alertas, conselhos e sugestões e piadas. Foram ao todo cinco experimentos fracassados, vários ensaios biológicos e metodológicos para chegarmos ao experimento que é exposto nesta dissertação. Confesso que em muitas vezes pensei em desistir e procurar algo mais fácil, sem a sua ajuda, professor, com certeza teria desistido nas primeiras tentativas. Seu conselho: *“Ninguém faz por que é difícil, mas se é difícil, aí*

*que você tem ficar mais motivado para conseguir...*” me ajudou muito, agora ao final de tudo posso dizer: O senhor realmente estava certo!. Muito Obrigado por sua presença e zelo constantes durante estes dois anos de mestrado e durante a graduação, não existem palavras que expressem a gratidão e o carinho que sinto pelo senhor.

Aos amigos do LabNUT – Laboratório de Nutrição e Produção de peixes da UFV, Patrícia, Moisés, Guilherme, Lídia, Fabrício, obrigado por todos os bons momentos, conselhos e ajuda, a todos eles a minha eterna gratidão.

A minha amiga Sanae por ter sido sempre paciente e tão empolgada quanto eu, no desenvolvimento desta pesquisa, mesmo você não estando presente, você sempre esteve aqui conosco, muitíssimo obrigado pelas sugestões, críticas, confiança e companheirismo durante o mestrado.

Ao pesquisador Alexmiliano Vogel de Oliveira, ou simplesmente, *Alex*. Parceiro, muito obrigado por toda a sua ajuda, pelas conversas, críticas, solicitude, preocupação e apoio na condução dos experimentos.

Ao mais novo pós-graduando do LabNUT, Thiago Bernardes Fernandes Jorge, pela imprescindível ajuda nos experimentos, apoio e solicitude. Sem sua ajuda minhas tardes fazendo lâminas no Laboratório teriam sido bem mais longas e chatas. Muito obrigado pelo companheirismo.

Ao estagiário: Felipe Martins, que do seu jeito “quietinho” sempre esteve ao meu lado ajudando a alimentar, limpar, e cuidar dos peixes do laboratório. Sua ajuda foi inestimável.

Ao amigo e estagiário Leandro Batista Pereira, que esteve junto desde o início ajudando, com seu jeito único, sempre presente. Também foi grande responsável pela execução do trabalho com críticas, trabalho, sugestões e apoio.

Ao amigo e Gabriel Miranda Batista, que mesmo ao estar longe colaborou com material para isolar o fungo e por sua ajuda, se consegui realizar este experimento uma parte significativa veio de você. Muito Obrigado!

Aos estagiários que estiveram no LABNUT: Renata, Heloisa, Gustavo, Anderson pela amizade e fundamental ajuda na condução do experimento.

Ao amigo, pai e irmão, Alysso Saraiva, ao lado de quem estive desde a graduação, sempre disposto a ensinar-me e ajudar-me e dar-me bons exemplos a ele minha eterna gratidão.

Ao grande amigo Marcus Vinícius de Lima Antunes por todo apoio que me deu desde a graduação e confiança, muito obrigado por sua amizade.

A minha querida amiga Érika Martins de Figueiredo que desde a graduação esteve junto comigo, muitas vezes “dando trabalho”, mas acredite realiza-los ao seu lado foi um grande prazer. Muito obrigado pelas diversas horas de estudo, trabalho, pelas críticas, sugestões e brigas, você me ajudou a crescer muito durante todo esse tempo.

Ao meu grande amigo Jorge Cunha Lima Muniz, por todo seu incentivo, apoio, ajuda sugestões e críticas. Todo o tempo em que estivemos juntos foi de grande felicidade.

Aos amigos que estão na pós-graduação: Evandro, Eric Balbino, Gabriel Cipriano Rocha, Matheus Faria, Diego, Leandro Alebrante, Will, Gabriel Viana, Rodolfo Vieira, Rodrigo, Cléverson, Valdir, Anderson, Rosana, Paula, André Mauric, Laura, Leandro, Erick Darlinson, Carolina Filardi, Luiz Fernando e Natália Krish, Aline “Sinhá”, Lays, pela amizade, pela união, por todos os bons momentos que temos passado juntos e por tantos mais que com certeza virão.

A todos os funcionários do Departamento de Zootecnia, pela amizade e auxílio durante todo o período do curso, em especial Fernanda, Celeste e Rosana.

À minha querida namorada Kenia, pelo amor, PACIÊNCIA, carinho, cumplicidade e incentivo na realização deste trabalho e por estar comigo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Marcos e Roseli, pelo carinho, dedicação e ensinamentos ao longo da vida.

Aos meus irmãos, Gustavo e Caroline, pelo apoio e sincera amizade.

À minha afilhada e sobrinha, Anna Clara pelo apoio e inspiração.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para execução deste trabalho e não foram citados.

E a você que está lendo! Muito Obrigado!

*“O sucesso é construído de fracasso em fracasso,  
mas sem nunca perder o entusiasmo.”*

*(Adaptado [Winston Churchil])*

## **BIOGRAFIA**

RAFAEL ALVES VIANNA, filho de Marcos Valério Silva Vianna e Roseli Aparecida Alves Vianna, nasceu em Tremembé, Estado de São Paulo, no dia 19 de abril de 1987.

Em julho de 2010, graduou-se em Zootecnia, pela Universidade Federal de Viçosa – UFV, na cidade de Viçosa - MG.

Em agosto de 2010, ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Nutrição de Monogástricos (piscicultura), submetendo-se à defesa da dissertação no dia 26 de julho de 2012.

## SUMÁRIO

	Págs.
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9

### CAPÍTULO 1

#### **Efeito da suplementação de L-treonina sobre o desempenho e produção de muco de alevinos de tilápia do nilo desafiados com *Saprolegnia* (*Saprolegnia infestans*).**

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
Introdução.....	14
Material e Métodos.....	16
Resultados.....	21
Discussão.....	24
Conclusão.....	28
Referências Bibliográficas.....	29

## LISTA DE TABELAS

	Págs.
<b>Tabela 1</b> - Composição percentual e química (calculada) das rações experimentais do tratamento controle (Cont.) e suplementado com treonina (Supl.).....	18
<b>Tabela 2</b> - Peso inicial, ganho de peso, taxa de crescimento específico (TCE), consumo de ração, conversão alimentar aparente (CAA), eficiência proteica e área superficial (área) de alevinos de tilápia do Nilo sem inoculação do fungo (Controle e Trat 0) ou inoculado com fungo <i>Saprolegnia infestans</i> e suplementação de treonina (Trat 1) no período de 21 dias antes da inoculação do fungo. Médias $\pm$ Erro padrão da média.....	22

## LISTA DE FIGURAS

	Págs.
<b>Figura 1</b> - Ciclo de vida dos fungos do gênero <i>Saprolegnia</i> sp (adaptado de Van West, 2006).....	4
<b>Figura 2</b> – Variação da temperatura durante o período experimental e incidência de sintomatologia nos tratamentos sem suplementação de treonina e sem inoculação de <i>Saprolegnia infestans</i> (controle), sem suplementação de treonina e com inoculação do fungo (Trat 0) e com suplementação e inoculação, em alevinos de tilápia do Nilo. $n=18$ .....	23
<b>Figura 3</b> – Mortalidade observada após infecção com fungo <i>Saprolegnia infestans</i> nos tratamentos sem suplementação de treonina e sem inoculação de <i>Saprolegnia infestans</i> (controle), sem suplementação de treonina e com inoculação do fungo (Trat 0) e com suplementação e inoculação, em alevinos de tilápia do Nilo.....	24
<b>Figura 4</b> – Produção média de muco ( $n=7$ ) nos dias seguintes a infecção dos tratamentos sem suplementação de treonina e sem inoculação de <i>Saprolegnia infestans</i> (controle), sem suplementação de treonina e com inoculação do fungo (Trat 0) e com suplementação e inoculação, em alevinos de tilápia do Nilo.....	24

## RESUMO

VIANNA, Rafael Alves, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Suplementação de treonina digestível em rações para alevinos de tilápia do nilo desafiados com *Saprolegnia infestans***. Orientador: Eduardo Arruda Teixeira Lanna. Coorientadores: Juarez Lopes Donzele e Melissa Izabel Hannas.

Objetivou-se avaliar a o efeito da adição de treonina na dieta sobre a recuperação de alevinos de tilápia do Nilo. Foram formuladas duas dietas com composição nutricional idêntica, sendo uma dieta isenta de inclusão de treonina industrial e a outra contendo 0,111 g/Kg de inclusão de treonina industrial. 378 peixes foram biometrizados fotografados e dispostos em 21 aquários aos quais foram distribuídos os tratamentos. Os peixes foram então alimentados durante 21 dias com as dietas experimentais em quatro arraçoamentos por dia. Ao final do período de alimentação foi feita a inoculação do fungo *Saprolegnia infestans*. Após a inoculação, diariamente, foi feita avaliação do comportamento dos peixes. Nos dias 1, 3, 5, 7 e 14 foram feitas coletas de um peixe por unidade experimental para quantificação do muco. Não foi observado diferença da inclusão de treonina industrial sobre os parâmetros, peso final, ganho de peso, área de superfície corporal. A produção de muco apresentou alterações a partir do dia 1 entre o controle e os outros tratamentos. O comportamento dos alevinos apresentou tendência a alterações após a inoculação. O tratamento com treonina industrial aparentemente apresentou comportamento menos anormal. Concluiu-se que a suplementação de treonina na dieta melhora o desenvolvimento de alevinos de tilápia do nilo infectados pelo fungo do algodão (*Saprolegnia infestans*).

## ABSTRACT

VIANNA, Rafael Alves, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Supplementation of threonine in diets for Nile tilapia challenged with *Saprolegnia infestans*** Adviser: Eduardo Arruda Teixeira Lanna. Co-advisers: Juarez Lopes Donzele and Melissa Izabel Hannas.

The experiment was aimed to evaluate the effect of the addition of threonine in the diet to recover alevins of Nile tilapia wounded by water mold fungus. Two diets were formulated with the same nutrient composition, being, a diet free from inclusion of industrial threonine and the other containing  $0.111 \text{ g.kg}^{-1}$  of industrial threonine. 378 fishes with an average weight ranging  $0,31 \pm 0,01 \text{ g}$  were photographed and placed in 21 tanks which were distributed to the treatments and fed for four weeks with experimental diets. The fingerlings were challenged with *Saprolegnia infestans* after 4 weeks of feeding. . Analysis of behavior was performed daily. We did not observed positive effect of the inclusion of industrial threonine on performance parameters: final body weight, weight gain, body surface area and The production of mucus also showed changes from day 1 between other treatments and control. The behavior of the juveniles also tended to change after inoculation. The treatments with industrial threonine apparently had less abnormal behavior. It is concluded that the addition of threonine in the diet enhances the development of Nile tilapia stressed water mold fungus (*Saprolegnia infestans*).

## 1 - INTRODUÇÃO GERAL

A demanda crescente por alimentos desafia a produção animal. As atividades zootécnicas devem, então, sempre buscar por técnicas mais eficientes e que causem menor impacto ambiental. Em 2050 estima-se que a população seja de 9,2 bilhões de pessoas, e que a demanda por alimentos seja 60% superior à consumida em 2009; esse incremento na produção de alimentos deverá ser realizado através do aumento de produtividade e ocupação de novas áreas para atividades agrícolas que não ultrapassem 10% (FAO, 2009).

Ao longo do último século, o mundo praticamente exauriu dois dos grandes sistemas naturais de produção de fontes de proteína: a pesca oceânica e a pecuária em extensas áreas de pastagem a fim de suprir uma crescente demanda por proteína animal. Com estagnação da pesca para produção, o crescimento global da produção de peixes, foi originário quase que inteiramente do cultivo em cativeiro. Aquicultura representa mais de 30 por cento da produção total de peixes para o consumo (Delgado et al., 2003).

No âmbito mundial, o Brasil apresenta-se como o vigésimo produtor de peixes. Entre os anos de 1997 a 2005 o crescimento da aquicultura nacional, quando comparada a outros países emergentes, foi considerado modesto (Camargo e Pouey, 2005). A partir de 2006, com o início dos incentivos feitos pelo governo, a atividade passou a assumir crescimento considerável (Oliveira, 2009).

O Brasil atualmente produz aproximadamente 1,25 milhões de toneladas de pescado, sendo do total 38% criado em cativeiros. A aquicultura gera uma receita de 5 bilhões de reais, emprega 800 mil profissionais (MPA, 2011).

A distribuição da produção e espécies de peixes no Brasil foi descrita por Boscardin (2008) sendo: a região sul líder na aquicultura continental com aproximadamente 33% da produção, baseada principalmente no cultivo de tilápias e carpas. O nordeste é a segunda região mais produtiva, com 22% da produção aquícola, apresentando ênfase no cultivo de tilápia e tambaqui. A região centro-oeste detém 18% dos da produção nacional, e este é constituído pelo cultivo principalmente de tambacu, pacu, tilápia e tambaqui. O sudeste brasileiro compreende os 17% restante da produção de pescado nacional, sendo que as espécies mais cultivadas são: tilápia, carpa, truta, tambacu e tambaqui. Finalmente, o norte do Brasil com apenas 10% do total continental produção aquícola, baseada principalmente no cultivo do tambaqui.

Dentre as espécies cultivadas no Brasil destaca-se a tilápia (*Oreochromis niloticus*) como espécie presente em quase todas as regiões brasileiras. Seu cultivo vem sendo estimulado desde 2002 e em 2006 a sua produção representou 42% do total produzido pela aquicultura nacional, caracterizando-a como a espécie mais cultivada (FAO, 2007). Já nos anos entre 2003- 2009 a tilapicultura nacional cresceu aproximadamente 105% (MPA, 2011).

A tilápia juntamente com a maior parte das espécies cultivadas no Brasil apresenta grande resistência a patógenos quando mantidas em condições normais, no entanto, quando o inicia-se o inverno, ou período de secas, ocorre acúmulo de matéria orgânica nos reservatórios de cultivo e concomitantemente com o abaixamento da temperatura, os peixes diminuem seu metabolismo e criam-se condições para o aparecimento doenças (Boyd, 1995; Pillay, 2004; Mishra, 2011).

Grande parte da piscicultura praticada no Brasil é feita em viveiros de terra construídos durante a década de 90 em que se preconizava a atividade sendo praticada quase exclusivamente em viveiros escavados e em pequenas represas. Desde então, os tanques-rede despontam como grande aposta para o crescimento da piscicultura (Escorvo, 2004).

Sob condições de duas estações bem determinadas durante o ano, época das chuvas e seca, a maior parte das piscigranjas apresentam problemas nos meses secos devido a falta de renovação da água dos tanques, acúmulo de matéria orgânica e, conseqüentemente aparecimento, de doenças.

A razão da adoção atual de tanques-rede são os baixos investimentos, comparados aos envolvidos nas práticas tradicionais de produção, as facilidades de implantação e a disponibilidade de locais para sua instalação (Escorvo, 2004; CODEVASF, 2010)

Segundo a FAO (2010), o desenvolvimento da aquicultura em 2004 na América Latina foi altamente desigual. O Chile e o Brasil contribuíram com 72% do total produzido, sendo estimado que, 70% originaram-se do cultivo em tanques-rede e gaiolas. A espécie em destaque foi a tilápia, no Brasil.

A difusão do modelo de criação de peixes dentro de tanques-rede ocorreu rapidamente, em todo território. Por isso, a produção de alevinos para engorda nos tanques-rede teve de ser aumentada, a fim de suprir a demanda crescente.

Segundo Suplicy (2007), o Brasil produziu em 2005, em 175 laboratórios de reprodução de peixes, 617,5 milhões de alevinos. Do total, os alevinos de tilápia

(distribuídos entre as linhagens GIFT, chitralada, prateada, vermelha e GMT) representaram 304,5 milhões (Scorvo Filho et al., 2010).

Durante a fase inicial os alevinos, da maior parte dos peixes cultivados, apresentam grande sensibilidade às alterações ambientais, o que pode ser considerado um importante agente imunossupressor.

Assim como os mamíferos os peixes teleósteos apresentam sistema imune inato e adaptativo. Defesas inatas proporcionam um sistema pré-existente e de ação rápida de proteção não específica e relativamente independente da temperatura, portanto, tem várias vantagens sobre a ação lenta e dependente da temperatura de respostas imune específica, adaptativa (Ellis, 2001).

A pele fornece uma barreira física e química evitando a fixação e penetração de patógenos. Além da ligação e descamação de agentes patogênicos ao muco, este contém diversas substâncias bactericidas, incluindo péptidos antimicrobianos, lisozima, lectinas. Na maioria dos casos as defesas tegumentárias são suficientes para proteger contra organismos mesmo com elevada patogenicidade que muitas vezes só produzem doença quando o tegumento foi fisicamente danificado (Ellis, 2001)

Quando a barreira tegumentar é ultrapassada por agentes patogênicos outros mecanismos prevalecem, esses mecanismos incluem inflamação, fagocitose, produção de citocinas, atividade de células assassinas, ativação dos complementos, liberação de proteínas de fase aguda e a produção de um amplo espectro de substâncias antimicrobianas, frequentemente mediadas pelos leucócitos do sangue periférico (Quadros, 2010).

As doenças infecciosas são responsáveis por grandes perdas nos laboratórios. Vários trabalhos citam bactérias dos gêneros *Aeromonas* sp, *Streptococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Edwardsiella* sp, como sendo as principais causadoras de perdas (Perera et al., 1994; Eldar et al., 1997; Suresh, 1998; Sudheesh et al., 2012; Iregui et al., 2012).

Poucos são os trabalhos que citam fungos como patógeno em peixes cultivados. Diversas espécies de fungos zoospóricos são responsáveis por causar grandes perdas a aquicultura dulcícola todos os anos. Esses danos se estendem desde a fase embrionária até a fase adulta, onde ocasionam doença ulcerativa dérmica. Os fungos pertencentes à ordem das Saprolegnias (isto incluem os fungos dos gêneros *Saprolegnia* sp, *Achlya* sp e *Aphanomyces* sp) são relacionados como os principais causadores dessas perdas em peixes de água doce (Hart e Reynolds, 2002; Van West, 2006). O estabelecimento

desses fungos se dá principalmente devido ao excesso de matéria orgânica na água, principalmente devido a sobras de alimentação e baixa temperatura da água (Van West, 2006).

A *Saprolegnia* sp. é um fungo oportunista facultativo parasitando tanto organismos aquáticos vivos como mortos (Cooke, 2007). Esse parasita vem causando perdas substanciais na aquicultura sendo o segundo patógeno, depois de bactérias, de maior patogenicidade e prevalência (Meyer, 1991).

Van West (2006), revisando a literatura sobre fungos que causam danos a piscicultura verificou que dentre os diversos gêneros de fungos parasitas o *Saprolegnia* é o mais adaptado a atividade parasítica em tecido vivo ou morto de organismos aquáticos. O ciclo de vida do fungo é dividido em varias fases iniciando com a fase zoospórica primária onde o zoósporo nada por um curto período e caso não encontre hospedeiro inicia evolui para a segunda fase o zoósporo secundário, nessa fase o esporo possui maior motilidade que a primeira forma e depois de algum tempo passa a forma de cisto. Diferentemente das outros gêneros, o *Saprolegnia* sp durante a fase de zoósporo secundário, possui flagelos que aumentam sua taxa de aderência na superfície a ser parasitada. Durante a fase encistada o zoósporo pode dar origem a outros zoósporos secundários, o que é chamado de poliplantismo. Caso o zoósporo secundário faça a aderência a um tecido animal, inicia-se a fase germinativa do cisto, dando origem ao micélio, o qual fará parte do ciclo assexuado do fungo. Após o completo desenvolvimento do micélio na epiderme do organismo hospedeiro, Ocorre a formação de estruturas reprodutivas esporângios que produziram os esporos primários (Figura 1).

As lesões fúngicas normalmente se iniciam com a observação de pontuações cotonosas ao longo do corpo do peixe, apresentando coloração que varia do branco ao cinza escura, normalmente nas regiões: dorsal, cranial e caudal; e espalham-se por todo o corpo com o desenvolver da doença (Noga e Dukstra, 1981; Ahmed, 1998; Aly e Ashram, 2000).

Hussein e Hatai (2002) estudando diferentes salmonídeos infectados por *Saporlegnia parasitica* e *Saprolegnia salmonis*, observaram não apenas danos na epiderme, mas que a espécie de oomiceto em questão era capaz de emitir hifas e penetrar em tecido muscular e vasos sanguíneos. Nesse estudo as espécies truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*), salmão masu (*Oncorhynchus masou*) e truta japonesa (*Salvelinus leucomaenis*) a rápida mortalidade ocorreu sem aparente a formação tufos filamentosos ao longo do corpo.

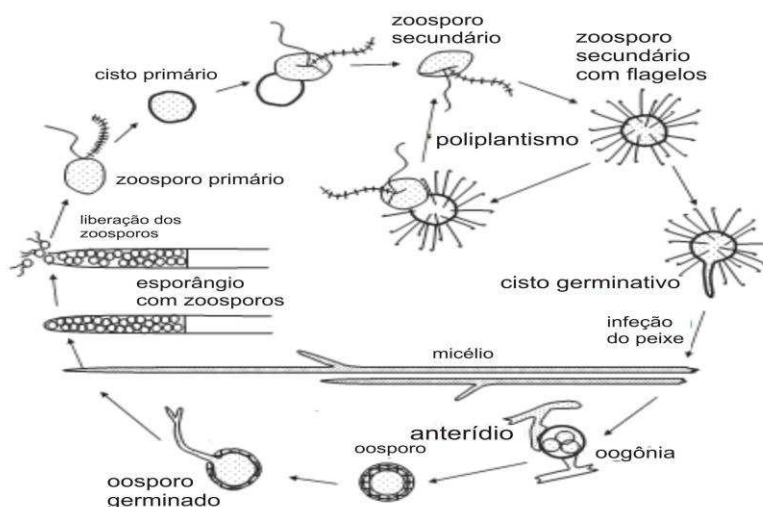


Figura 1 – Ciclo de vida dos fungos do gênero *Saprolegnia* sp (adaptado de Van West, 2006)

Também não ocorreram alterações nos parâmetros sanguíneos sugerindo assim a ocorrência de uma infecção rápida e sistêmica.

As doenças micóticas dos peixes constituem uma das áreas mais controversas em menos exploradas da íctiopatologia, e muitas vezes são desprezados os impactos econômicos que elas causam, ou mesmo são atribuídas a outros patógenos (Meyer, 1991). Diversos autores questionam a importância da *Saprolegnia* como causador de grandes mortalidades em cultivos de peixes. Ademais, as doenças fúngicas são em grande parte das vezes a porta de entrada para outros agentes infecciosos como bactérias e vírus os quais podem causar também grande mortalidade.

Existem tratamentos para os peixes infectados por fungos, mas esses tratamentos aplicam-se a peixes em sistemas de criação superintensivos ou mesmo intensivos. Estas substâncias apresentam grande efetividade, mas, muitas das vezes são de uso controlado, custo elevado e/ou difícil manipulação (Bly *et al.*, 1996 ; Marking *et al.*, 1994; Edgell *et al.*, 1993).

Bly *et al.*, (1996) trabalharam com substâncias antifúngicas que poderiam ser candidatos a um tratamento a infestação por *Saprolegnia* em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*). Foram utilizados os herbicidas anfotericina B e cecropinas A, B, e P1. Não foram observadas reduções no crescimento ou inibição da atividade do fungo para as cecropinas, já anfotericina B na concentração de  $0,125 \mu\text{L.L}^{-1}$  foi capaz de reduzir o crescimento da *Saprolegnia*.

Marking *et al.*, (1994), testaram 21 compostos químicos no combate ao fungo *Saprolegnia* isolado de diversas pisciculturas. Os compostos foram testados em ovos de truta (*Oncorhynchus mykiss*) infectados e em culturas puras do fungo. De todos os compostos avaliados, apenas sete apresentaram efetividade no controle da infestação. Os compostos selecionados foram: Abbott A-73.336 (herbicida), amorolfina, formalina, o glutaraldeído, o peróxido de hidrogênio, óleo de melaleuca, e sal (cloreto de sódio). Dos compostos eficazes apenas peróxido, formalina, hidrogênio e sal aparecem completamente adequados para registro, devido a não toxidez.

Edgell *et al.*, (1993) avaliaram a utilização de níveis de sal (cloreto de potássio) no tratamento tópico de ovos de salmão Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) durante a incubação. Foi observada efetividade de banho de 20 ppt por 60 minutos três vezes por semana em contraste com o tratamento padrão de 1 ppm de verde malaquita por 60 minutos três vezes por semana. A concentração de sal foi efetiva na redução da mortalidade e apresentou vantagem se comparada ao verde malaquita por não causar anormalidades no desenvolvimento das larvas de salmão.

Fitzpatrick *et al.*, (1998) conduziram alguns experimentos avaliando a eficácia de três potenciais agentes controladores da *Saprolegnia* (iodeto, peróxido de hidrogênio e glutaraldeído) contra o fungicida padrão verde malaquita, em adultos de salmão Chinook infestado por *Saprolegnia*. A forma de aplicação foi o tratamento tópico. Observaram resultados efetivos do glutaraldeído na dosagem de 6,2 mg.L<sup>-1</sup>. O iodeto na concentração de 0,02 mg.L<sup>-1</sup> não apresentou diferença contra o tratamento controle e o peróxido de hidrogênio apresentou os resultados mais promissores, a concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup> no qual não foi observada mortalidade.

Os métodos de tratamento, incluindo antibióticos e quimioterapêuticos são frequentemente utilizados, mas muitas vezes não são efetivos. Medidas preventivas são consideradas sustentáveis segundo a FAO e mais recurso vem sendo dispendidos ano após ano neste contexto. A FAO junto a comunidade científica mundial criaram linhas temáticas a fim de aumentar o numero de informações sobre as linhas: 1 “O papel da nutrição na melhoria da saúde dos animais aquáticos”, 2. “aproveitamento do sistema imune específico e não específico e de mecanismos de defesa, do proprio animal, no controle de doenças de animais aquáticos”, 3. “utilização de imunoestimulantes não específicos e imune-estimulantes específicos para reduzir a susceptibilidade à doença”, 4. “utilização de probióticos para a melhoria da qualidade ambiental aquática” e 5.

“redução do uso de produtos químicos e medicamentos em aquacultura” (Subasinghe, 1997).

Atualmente, está sendo amplamente aceito que as abordagens nutricionais são essenciais para minimizar doenças entre os animais cultivados em meio aquáticos. O conceito de que uma melhor nutrição leva a melhoria da saúde é muito familiar em humanos e também é aplicável para os animais aquáticos. Nas últimas duas décadas esforços vem sendo feitos, especialmente no caso das espécies de peixes, para compreender a relação entre a resposta nutricional, imunológico e resistência às doenças. Desequilíbrios nutricionais, especialmente durante as fases larval e juvenil tem um profundo efeito sobre o crescimento resistência a doenças, e de sobrevivência (Kiron, 2012).

A imunonutrição é um segmento dentro da nutrição que visa melhorar a animais debilitados através de dietas contendo alimentos que irão fortalecer o sistema imune. A treonina é um dos aminoácidos limitantes em fontes proteicas de origem vegetal, além de ser um importante aminoácido precursor do sistema imune em mamíferos (Li *et al.*, 2007).

O efeito do aminoácido treonina sobre o sistema imune de peixes ainda não foi avaliado. Entretanto, a mucina, composto rico em treonina e sintetizada em grande quantidade pelos peixes no tubo digestivo e, principalmente, para as necessidades adicionais de recobrimento da pele, regulam a integridade das barreiras intestinal e epitelial dos peixes.

Com relação ao desafio sanitário, pesquisas com suínos têm demonstrado que as exigências dos aminoácidos utilizados em maior proporção para os processos de manutenção, como a treonina (mucina e imunoglobulinas), podem ser maiores em condições de desafio sanitário, em função de serem constituintes fundamentais dos compostos relacionados à resposta imunológica do animal (Obled, 2003; Ajinomoto, 2003; Machado & Fontes, 2005). Sugerindo assim que o conceito de proteína ideal não é estático mas sim dinâmico e depende de fatores ambientais.

São escassas as informações sobre as alterações nas exigências de aminoácidos essenciais devido a patologias e exigência de treonina em dietas para a tilápia do Nilo alimentadas com rações práticas.

O artigo a seguir foi editorado com base nas exigências da Revista Brasileira de Zootecnia, publicada pela Sociedade Brasileira de Zootecnia, com adaptação às normas para elaboração de teses da Universidade Federal de Viçosa - UFV.

## 2 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, N. Studies on the linkage of fungi with some fish disease in fish farms.1998. 103 f. thesis (Mestrado Medicina Veterinária) University of Egypt, Zagazig, 1998.
- AJINOMOTO. Exigências de treonina para suínos: benefícios da suplementação de L-treonina. **Informativo técnico**. v.10. São Paulo: Ajinomoto Biolatina, 2003
- ALY, S.; ASHRAM, A. E. Some factors contributing to the development of saprolegniosis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Alex. J. Vet. Science**. v.16, n.1, p. 165-174, 2010.
- BOMFIM, M.A.D. et al. Exigência de treonina, com base no conceito de proteína ideal, de alevinos de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, MG, v.37, n.12, p.2077-2084, 2008.
- BOMFIM, M.A.D. et al. Níveis de lisina, com base no conceito de proteína ideal, em rações para alevinos de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, MG, v.39, n.1, p.1-8, 2010.
- BOSCARDIN, N.R. A produção aquícola brasileira. In: OSTRENSKY, A. et al. **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca/FAO, 2008. p.27-72.
- BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama: Alabama Agricultural Experimental. Station Auburn University, 1995. 482 p.
- CAMARGO, S.G.O.; POUEY, L.O.F. Aqüicultura – Um mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas, v.11, n.4, p.393-396, 2005.
- CODEVASF. Manual de criação de peixes em tanques-rede / coordenação de Paulo Sandoval Jr.; elaboração de texto de Thiago Dias Trombeta e Bruno Olivetti de Mattos; revisão técnica de Willibaldo Brás Sallum. Brasília: 2010.69 p.
- COOKE, R. The biology of symbiotic fungi. **J Wiley**. New York: 1977. 282 p.
- DELGADO CL, WADA N, ROSEGRANT MW, MEIJER S, AHMED M, 2003.Outlook for Fish to 2020: Meeting Global Demand. Report by the International Food Policy Research Institute.
- ELDAR, A. et al. Restriction fragment length polymorphisms of 16S rDNA and of wholer RNA genes (ribotyping) of *Streptococcus iniae* strains from the United States and Israel. **FEMS Microbiology Letters**, v.151, n.2, p.155-162, 1997.
- PINTO, A. R. et al. Manual de normalização de trabalhos acadêmicos. Viçosa, MG, 2011. 70 p. Disponível em:<<http://www.bbt.ufv.br/>>. Acesso em: 18/07/2012
- ESCORVO, J. D. 2004. O agronegócio da aquíicultura: perspectivas e tendências. (Zootecnia e o Agronegócio – Zootec. Brasília, 28-31 maio 2004). Disponível em: [ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/agronegocio\\_aquicultura.pdf](ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/agronegocio_aquicultura.pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2012

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS –  
FAO. **Database on Introductions of Aquatic species**. FAO Information Division.  
Rome. Italy, 2007
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS -  
FAO. **The State of World's Fisheries and Aquaculture 2010**. FAO Information  
Division. Rome. Italy, 2010
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS -  
FAO. **The State of World's Fisheries and Aquaculture 2008**. FAO Information  
Division. Rome. Italy, 2008
- FURUYA, W.M. et al. Exigências de lisina digestível para juvenis de tilápia-do-nilo.  
**Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, MG, v.35, n.3, p.937-942, 2006.
- FURUYA, W.N. et al. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos  
digestíveis de alguns ingredientes para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).  
**Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, MG, v.30, n.4, p.1143-1149, 2001.
- HART, P., REYNOLDS, J., Handbook of Fish Biology and Fisheries. Blackwell Pub.  
2002.p.856.
- LI, P., YIN, Y.L., LI, D.F., KIM, S.W., WU, G. Amino acids and immune function. **Br.  
J. Nutr.** v. 98, pg. 237–252. 2007.
- MACHADO, G.S; FONTES, D.O. Relação entre as exigências nutricionais e o sistema  
imune em suínos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE EXIGÊNCIAS  
NUTRICIONAIS DE AVES E SUÍNOS, 2., Viçosa. **Anais...** Viçosa, 2005. p.293-  
314.
- MISHRA S . Fish Disease Management in Integrated Farming System . Webmed  
Central PARASITOLOGY 2011
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of fish**.  
Washington: National Academy of Science, 1993. 105p.
- NOGA, E. E DUKSTRA, M. Ommycetes fungi associated with ulcerative mycosis in  
menhaden. Brevoorin Tyrannus. **J. of Fish Diseases**. v 9, n.1, p. 47–53, 1986.
- OBLED, C. Necessidades de aminoácidos en estados inflamatorios. In: CURSO DE  
ESPECIALIZACION FEDNA, 19., 2003, Madrid. **Proceedings...** Madrid: INRA,  
Uniti de Nutrition et Metabolisme Proteique, 2003. p.73-88.
- OLIVEIRA, R.C. O panorama da aquícultura no Brasil: a prática com foco na  
sustentabilidade **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**,  
v.2, n.1, fev. 2009.
- PERERA, R. P.; JOHNSON, S. K. Streptococcus iniae associated with mortality of  
Tilapia nilotica x Tilapia aurea hybrids. **Journal of Aquatic Animal Health**.  
Bethesda, v.6, p.335-340, 1994.

- PEZZATO, L.E. et al. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, MG, v.31, n.4, p.1595-1604, 2002.
- PILLAY, T. V. R. Aquaculture and the Environment, Blackwell Publishing. London, 2004. 208 p.
- SANTIAGO, C.B.; LOVELL, R.T. Amino acid requirements for growth of Nile tilapia. **Journal of Nutrition**. v.118, p.1540-1546, 1988.
- SCORVO FILHO, J. D.; FRASCA-SCORVO, C. M .D.; ALVES, J.M. C. e SOUZA, F. R. A.. A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. **R. Bras. Zootec.** Viçosa, MG, v.39, supl., pp. 1595-1604, 2002.
- SURESH, A. V. Tilapia Update 1998. **World Aquacult.** Baton Rouge, v.30, n.4, p.8-68. 1998.

## **Efeito da suplementação de l-treonina sobre o desempenho e produção de muco de alevinos de tilápia desafiados por saprolégna (*saprolegnia infestans*)**

**RESUMO-** Doenças infecciosas, principalmente por bactérias são as principais causadoras de perdas em laboratórios de reprodução, mas fungos reduzir a produção de alevinos. Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação de L-treonina na resistência e recuperação de peixes desafiados pelo fungo *Saprolegnia infestans*. 378 peixes foram dispostos em 21 aquários e alimentados durante quatro semanas com dietas com diferentes níveis de suplementação de treonina, 0,00 e 0,111g kg<sup>-1</sup>. Após o período de alimentação com os tratamentos os peixes foram desafiados com *Saprolegnia infestans*. Os tratamentos não afetaram o desempenho, foi observado aumento na área da superfície corporal de peixes suplementados ( $p=0,0061$ ) dos peixes. O consumo de alimento foi maior para peixes com suplementação. Todos os aquários apresentaram peixes com sintomatologia clássica de lesões por saprolégna. A produção de muco em todos os tratamentos aumentou após a infecção mas somente no tratamento suplementado ela manteve-se alta até o final. Dessa forma recomenda-se a suplementação de treonina em condições de desafio por saprolégna.

Palavras-chave: *Saprolegnia infestans*. Imunonutrição. Exigência nutricional. Nutrição de peixes. Comportamento. Desempenho.

**Effects of l- threonine supplementation of on performance and mucus production of tilapia fingerlings challenged by saprolegnia ( saprolegnia infestans )**

**ABSTRACT** - Infectious diseases, especially by bacteria are the main cause of losses in breeding laboratories, but fungi also reduce the production of fry. This study evaluated the effects of L-threonine supplementation on growth performance, behavior and mucus production in tilapia fingerlings challenged by *Saprolegnia infestans*. 378 fish were randomly distributed in 21 aquariums and fed for four weeks with diets containing different levels of supplementation of threonine, 0,00 kg and 0,111g<sup>-1</sup>After the feeding period with treatments fish were challenged with *Saprolegnia infestans*. The treatments did not affect the performance, there was an increase in body surface area of fish supplemented (p = 0.0061). All fish aquariums presented with classic symptoms of injuries *Saprolegnia*. The mucus production in all treatments increased after infection but only supplemented the treatment she remained high until the end. These results reveal is recommended to threonine supplementation in conditions challenge by *Saprolegnia*.

Key-words: *Saprolegnia infestans*. Immununutrition. Nutritional requirement. Fish nutrition. Fish performance.

## Introdução

O gênero *Saprolegnia* é caracterizado por um grupo de fungos parasíticos oportunistas facultativos para meios vivos ou em decomposição. Fungos do gênero *Saprolegnia* causam elevadas mortalidades todos os anos entre peixes de água doce e na maioria dos casos os surtos estão relacionados a alterações ambientais, estresses de manejo causados por superpopulação, manuseamento constante, como biometrias e classificações, transporte, baixo oxigênio dissolvido na água, variações abruptas de temperatura, choque osmótico e água poluída. Embora seja discutível para muitos autores que *Saprolegnia* seja agente primário de surtos de mortalidade em pisciculturas é conhecido sua presença como agente secundário em surtos bacterianos e viróticos que em conjunto com a *Saprolegnia* elevam a mortalidade (van West et al., 2010).

Tratamentos para prevenção e controle de surtos de saprolégna, existem e normalmente se dão pelo uso de substâncias em como verde malaquita, formol, azul de metileno, permanganato de potássio, sulfato de cobre e antibióticos.

Zaki, Fawazi e El-Jackey (2008) estudaram o efeito de banho com permanganato de potássio sobre a cura de alevinos de tilápia experimentalmente infectados com *Saprolegnia parasitica*, e observaram que após sete dias de infecção a sintomatologia clássica era observada com tufo filamentosos de coloração branca a cinza em várias regiões do corpo do animal. Após o período foi realizada o tratamento dos peixes com solução 2,5mg/L de permanganato de potássio durante dez dias. Ao final do período experimental houve mudança significativa dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, demonstrando que os peixes contaminados estavam recuperando do surto.

Alevinos de carpa capim contaminados com *Saprolegnia parasitica*, foram submetidos a diferentes concentrações de banhos com sulfato de cobre, foi observado que após 24h já ocorria inibição do crescimento e efetividade no controle de

crescimento do oomiceto e que a utilização de sulfato de cobre pode ser realizada com dosagens a partir de 0,5mg/L após situações de estresse de manejo e quedas de temperatura (Sun et al 2013)

Em laboratórios de reprodução perdas nas taxas de eclosão ocorrem constantemente por ovos fungados. Chambel et al 2012, estudaram o uso de banhos com peróxido de hidrogênio, iodo e azul de metileno em ovos recém fecundados de peixes ornamentais. Sendo as maiores taxas de eclosão obtidas com peróxido de hidrogênio e azul de metileno.

A maior parte das formas de tratamento encontradas na literatura citam banhos e tratamentos tópicos como a forma mais efetiva de combater ou prevenir surtos de saprolégna. No entanto, a grande maioria das pisciculturas que realizam larvicultura, utilizam sistemas de elevada biomassa, constante manejo e dificuldade para o isolamento de alevinos, uma vez que estão em viveiros de terra. Além do fato que tratamentos com banhos geram água residual que necessita de tratamento.

Uma alternativa, seria uma forma não evasiva de tratamento, aonde os peixes ficariam no próprio ambiente e aliado a manejo eficiente de trocas de água, garantem a recuperação ou prevenção de doenças. A utilização de rações com ingredientes aditivos imunes estimulantes têm sido recorrentes na literatura como alternativa ao uso de antibióticos e promotores de crescimento. Várias substancias como óleos essenciais, probióticos, simbióticos, peptídeos e aminoácidos podem ser usados para prevenir e tratar peixes infectados (Clark, E. S., & Wedekind, C., 2011; de Bruijn et al., 2012 Tampierre et al., 2003).

A imunonutrição visa melhorar animais desafiados por patógenos com dietas contendo alimentos com compostos estimulantes do sistema imune (Collet, 2012; El-Mahmoud e Ibrahim, 2012).

O sistema imune de peixes teleósteos e de mamíferos apresenta respostas inata e adaptativa, com peixes dependendo quase, exclusivamente, do sistema imune inato e mamíferos do imune adaptativo (Workenhe et al., 2010). Imunidade inata inclui inflamação, fagocitose, produção de citocinas, atividade de células assassinas, ativação dos complementos, liberação de proteínas de fase aguda e produção de um amplo espectro de substâncias antimicrobianas, peptídeos antimicrobianos, lectina e lisozimas (van Muiswinkel e Nakao, 2012), frequentemente mediadas por leucócitos do sangue periférico (Collet, 2012). A treonina é um dos aminoácidos limitantes em fontes proteicas de origem vegetal, além de precursor de substâncias como citocinas do sistema imune (Li et al. 2007) e pode estar diretamente relacionada a maior produção de muco por peixes quando desafiados.

As exigências dos aminoácidos, como lisina, metionina e treonina, em condições de desafio podem ser maiores devido a maior produção de moléculas como mucina e imunoglobulinas, constituintes da resposta imunológica do animal (Li et al. 2007, Ellis, 2001). O conceito de proteína ideal pode não ser estático e depende de fatores ambientais. Dessa forma, a suplementação de treonina (aminoácido industrial) pode afetar a resistência e a recuperação de peixes desafiados pelo fungo *Saprolegnia infestans*.

## **Materiais e Métodos**

### Protocolo de Ética e Bem-Estar animal

O experimento foi conduzido de acordo com as normas de bem-estar e ética na experimentação animal aprovadas pela CEUAP - Comissão de Ética no Uso de

Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (Protocolo 025/2012).

#### Peixes

Os peixes utilizados foram tilápia do Nilo, linhagem GIFT, obtidos da fazenda experimental da EPAMIG em Leopoldina, Minas Gerais, Brasil. Os animais tinham idade de 25 dias e peso de  $0,31 \pm 0,01$  g, eram todos macho devido ao processo de reversão sexual por hormônio.

#### Instalações experimentais e água

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição e Produção de Organismos Aquáticos (LabNUT) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) em Viçosa, Minas Gerais em um sistema de recirculação de água com 21 aquários. O volume útil de cada aquário foi 1 de 20 L com taxa de renovação de 120 litros por hora. A circulação era feita com bomba Atman 8000L/h conectada a filtro mecânico e biológico pressurizado com luz UV 9 W.

#### Dietas

Os ingredientes da dieta foram adquiridos da fábrica de ração da UFV moídos em moinho de martelo a 3200 rpm e peneirados em peneira de diâmetro de 0,1mm. As dietas foram peletizadas em extrusora/peletizadora MX-40 (Imbramaq, Ribeirão Preto, SP, Brasil) com as configurações: velocidade de abastecimento 15kg/h; umidade 10ccH<sub>2</sub>O/cm<sup>3</sup>; frequência de corte de 32,5 Hz; matriz de 1 mm de diâmetro, temperatura de 75°C (Tabela 1).As rações após a peletização foram colocadas em bandejas e secas em estufa de circulação de ar forçada a 50° C por 12h. Após secagem as rações foram identificadas, embaladas e estocadas em geladeira a 4°C.

**Tabela 1** - Composição percentual e química (calculada) das rações experimentais do tratamento controle (Cont.) e suplementado com treonina (Supl.)

Ingredientes %	Composição percentual		Composição calculada <sup>3</sup>	
	Cont.	Supl.	Cont.	Supl.
Farelo de soja	55,86	55,86	Proteína Bruta (%)	30,91 30,9
Fubá de milho	31,21	31,21	Energia Digestível (kcal/kg)	3000,00 300
Glúten 60	4,57	4,57	Fibra Bruta (%)	3,26 3,26
Amido de milho	1,38	1,38	Ca Total (%)	0,90 0,90
Óleo de soja	2,54	2,51	P disponível (%)	0,60 0,60
Lisina-HCl	0,020	0,020	Lisina (%) digestível	1,53 1,53
DL-Metionina	0,193	0,193	Met. + Cist (%) digestível	1,07 1,07
L-Treonina	0,000	0,111	Treonina Digestível (%)	1,07 1,17
L-Triptofano	0,045	0,045	Triptofano digestível (%)	0,39 0,39
L-Alanina	0,111	0,000	Relação Lis. Dig. /ED	0,56 0,56
Fosfato Bicálcico	3,03	3,03	Relações entre aminoácidos digestíveis	
Suplemento vit. +	0,50	0,50	Met+Cist /Lisina	70,00 70,0
Vitamina C	0,05	0,05	Treonina/Lisina	70,00 77,0
Sal	0,50	0,50	Triptofano/Lisina	26,00 26,0
Antioxidante (BHT)	0,02	0,02		
<b>Total</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>		

<sup>1</sup> Vit. C: sal cálcica 2-monofosfato de ácido ascórbico, 42% de princípio ativo

<sup>2</sup> Suplemento vitamínico mineral: Conteúdo por quilograma do produto: 1.200.000 UI de Vit. A; 200.000 UI de Vit. D<sub>3</sub>; 1.200 mg de Vit. E; 2.400 mg de Vit. K<sub>3</sub>; 4.800 mg de Vit. B<sub>1</sub>; 4.800 mg de Vit. B<sub>2</sub>; 4.800 mg de Vit. B<sub>6</sub>; 4.800 mg de Vit. B<sub>12</sub>; 48 g de Vit. C; 1.200 mg de ác. Fólico; 12.000 mg de pantotenato de Ca; 48 mg de biotina; 108 g de cloreto de colina; 24.000 mg de niacina; 50.000 mg de Fe; 3.000 mg de Cu; 20.000 mg de Mn; 30.000 mg de Zn; 100 mg de I; 10 mg de Co; 100 mg de Se. <sup>3</sup> Valores estimados com base nos coeficientes de digestibilidade dos ingredientes para os aminoácidos e fósforo, de acordo com Rostagno et al. (2005) e Furuya (2010), e de energia, de acordo com Boscolo et al. (2002), Boscolo et al. (2006) e Pezzato et al. (2002).

#### Cepa do fungo utilizada

A cepa de fungo, utilizada na inoculação, foi isolada de exemplares de platy, *Xiphophorus maculatus*, de criatório comercial. Os peixes selecionados apresentavam doença ulcerativa dérmica. Após anestesiados em eugenol regiões lesionadas foram cirurgicamente extraídas, lavadas em solução fisiológica em colocadas em placa petri com meio de cultura contendo ágar-glicose-levedura, então permaneceram em temperatura ambiente (23,0±1,3°C) durante 5 dias. Foram feitas repicagens a fim de isolar e purificar a cultura de Saprolegnia. Após obter-se culturas puras foram retiradas

regiões de micélio e colocados em placas petri contendo sementes de cânhamo esmagadas. Após 3 dias as sementes apresentavam aspecto cotonoso. As sementes apresentando aspecto cotonoso foram colocadas em tubo de Falcon de 15ml com 10mL de solução salina e então centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a fim de se obter os esporos no fundo do tubo. O procedimento utilizado foi conforme descrito por Hussein et al 2010. Do isolado cultivado foi feita lamina e visualizada em microscópio ótico a fim de se obter a classificação quanto ao gênero e espécie segundo Johnson et al 2002.

#### Desenho experimental

Trezentos e setenta e oito peixes foram dispostos em três grupos, distribuído em 7 aquários por grupo em um total de vinte e um aquários. A biometria dos peixes foi feita no início do experimento para se padronizar indivíduos por aquário. Durante 21 dias os peixes foram alimentados com dieta sem suplementação de treonina quatro vezes ao dia (8:00, 11:00, 14:00 e 17:00). Os aquários no sistema de recirculação foram mantidos com taxa de recirculação de 120L/h e temperatura de  $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e foto período de 12 horas de luz. No vigésimo primeiro dia os peixes foram retirados dos aquários e foi feita biometria da mesma forma como no início do experimento e após o manuseamento dos peixes foi feita a inoculação dos esporos de fungo na concentração de  $2,0 \cdot 10^6$  UFC/mL por imersão dos peixes. Um grupo de 7 caixas foram isentas da inoculação, constituindo-se assim o tratamento controle para comparações com os tratamentos inoculados. Os peixes após o estresse de manejo foram devolvidos suas caixas. O sistema de recirculação foi religado e a temperatura configurada para  $23,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , todas as caixas exceto as caixas que estavam com os peixes que não sofreram inoculação ficaram no sistema de recirculação

Uma suspensão do meio de cultura com a cepa do fungo isolado com concentração de  $2,0 \cdot 10^6$  UFC/mL foi inoculada por grupo de peixes durante a distribuição dos mesmos nos aquários. Dessa forma constituíram os tratamentos, um grupo sem inoculação (CONT.), outro inoculado sem suplementação (TRAT 0) e o terceiro grupo inoculado e recebeu dieta contendo nível de treonina duas vezes superior a exigida por peixes (TREQ). Um peixe foi retirado de cada aquário aos dias 1, 3, 5, 7 e 14 após a infecção, esses peixes foram anestesiados com óleo de cravo em solução aquosa na concentração de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  e utilizados para quantificação de muco.

#### Parâmetros de desempenho

O ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, taxa de crescimento específico e taxa de eficiência proteica foram avaliados para o período de 21 dias.

#### Parâmetros comportamentais e mortalidade

Diariamente, a resposta dos animais à alimentação foi avaliada e os parâmetros natação errática, letargia, exoftalmia e mortalidade receberam foi atribuída a pontuação 1 em caso de presença e 0 na ausência entre os peixes presentes no aquário. Dessa forma pode-se criar uma frequência para a ocorrência de sintomas de infecção. Para a mortalidade foi registrada diariamente e após o término do período de avaliação foi feita a frequência de mortalidade relativa ao tratamento controle.

#### Produção de muco

O peixe foi retirado aleatoriamente do aquário com o auxílio de uma rede, através de movimentos gentil da peneira foi retirado o excesso de água e então o animal foi diretamente pesado. Com auxílio de toalhas de papel de gramatura  $0,0667 \text{ g/cm}^2$  todo o muco superficial do peixe foi raspado e então o peixe foi pesado novamente em balança de precisão este método foi adaptado de Flik et al. 1984. Com posse do peso do

peixe e o peso do muco retirado foi feita a divisão do muco retirado pelo peso do peixe e colocado em base de porcentagem para comparações.

#### Análise estatística

Os resultados dos parâmetros foram submetidos ao teste de normalidade e, em caso positivo, à ANOVA a 5% de probabilidade e ao teste de comparação múltipla: Dunnett com 5% de probabilidade testando-se os possíveis contrastes, para os parâmetros de desempenho e produção de muco, já para avaliação de incidência da doença foi feita apenas análise descritiva dos dados e apresentado em forma de gráficos.

### **Resultados**

Os parâmetros de qualidade de água durante o período experimental mantiveram-se em: temperatura de  $28,2 \pm 0,5$  °C até o vigésimo primeiro dia e após manteve-se em  $23,1 \pm 0,4$  °C, pH de  $6,5 \pm 1,3$ , oxigênio dissolvido igual a  $7,4 \pm 0,4$  mg.L<sup>-1</sup> e nitrogênio amoniacal de  $0,9 \pm 0,06$  mg.L<sup>-1</sup>. Esses parâmetros não foram causa de alterações no comportamento ou desempenho dos peixes, uma vez, que estão dentro da faixa de conforto para tilápia do Nilo.

Durante o período de vinte e um dias que antecederam ao desafio os peixes apresentaram grande voracidade durante as alimentações e em alguns momentos comportamento agressivo entre os membros do grupo experimental, formando uma hierarquia de acordo com o desenvolvimento dos indivíduos, não a ponto de comprometer a resposta de desempenho, pode-se inferir isso com base nos valores dos desvios encontrados entre os parâmetros avaliados, ganho de peso 0,03, e taxa de crescimento específico 0,03. (Tabela 2).

Os parâmetros de desempenho da tilápia do Nilo, exceto a área superficial ( $p=0,0061$ ) não diferiram entre tratamentos (Tabela 2).

**Tabela 2** - Peso inicial, ganho de peso, taxa de crescimento específico (TCE), consumo de ração, conversão alimentar aparente (CAA), eficiência proteica e área superficial (área) de alevinos de tilápia do Nilo sem inoculação do fungo (Controle e Trat 0) ou inoculado com fungo *Saprolegnia infestans* e suplementação de treonina (Trat 1) no período de 21 dias antes da inoculação do fungo. Médias  $\pm$  Erro padrão da média.

Parâmetro	Controle	Trat 0	Trat 1	<i>p</i> -valor
Peso inicial (g)	0,31 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,010	0,31 $\pm$ 0,010	0,6589
Ganho de peso (g)	0,55 $\pm$ 0,03	0,55 $\pm$ 0,033	0,57 $\pm$ 0,018	0,82927
TCE (%/dia)	2,51 $\pm$ 0,23	2,55 $\pm$ 0,292	2,75 $\pm$ 0,157	0,1054
Consumo de ração (g)	3,38 $\pm$ 0,26	3,34 $\pm$ 0,167	3,35 $\pm$ 0,110	0,5714
CAA (g/g)	1,62 $\pm$ 0,18	1,72 $\pm$ 0,085	1,70 $\pm$ 0,091	0,1580
Eficiência proteica (%)	5,35 $\pm$ 0,59	5,55 $\pm$ 0,276	6,27 $\pm$ 0,295	0,2912
Área superficial (mm <sup>2</sup> )	170,4 $\pm$ 0,56ab	154,14 $\pm$ 0,495b	175,57 $\pm$ 0,512a	0,0061

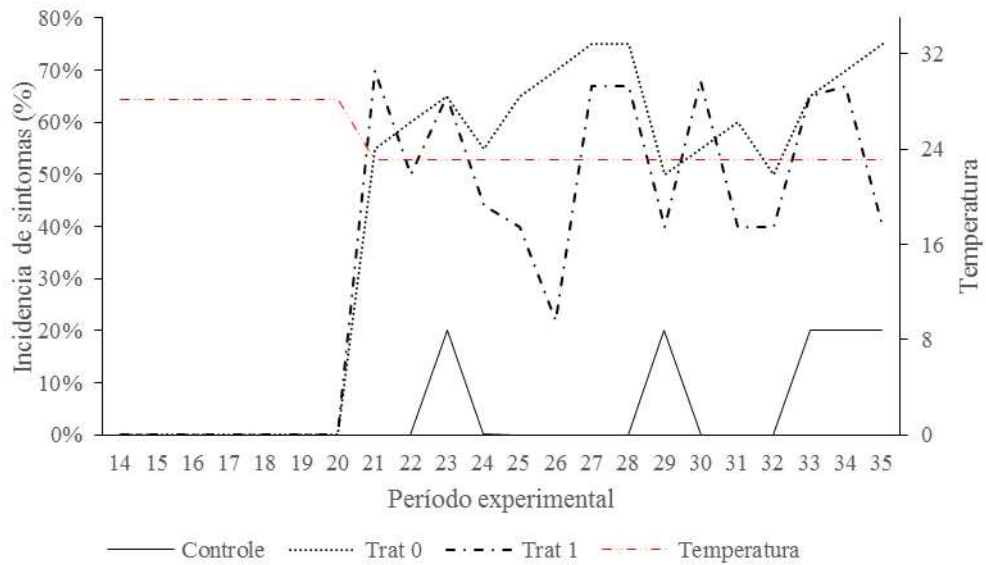
Médias seguidas de mesma letra não diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Dunnett.

Após a etapa de coleta de dados de desempenho, foi realizada a infecção dos peixes com inoculo de cultura de *Saprolegnia infestans*. As condições de estresse de manejo e queda de temperatura proporcionaram condições para incidência de saprolegniose, em tendência similar a encontrada em pisciculturas. Os primeiros sintomas começaram a aparecer 24 horas contato dos peixes com o inoculo (Figura 1). Dos sintomas avaliados, peixes com letargia foram observados em todos os aquários, mas com menor frequência para aqueles do tratamento controle comparado aos tratamentos com o fungo. Essa letargia foi menor no tratamento infectado com dieta suplementada, no entanto manteve-se alta no tratamento sem suplementação. Também foram observados alguns casos isolados de exoftalmia no Trat 1 nos dias um e 4 após infecção, esses peixes. Esse quadro evolui a óbito no sexto dia, não foram registradas ocorrências de exoftalmia em Trat 1. A natação errática foi mais frequente nos

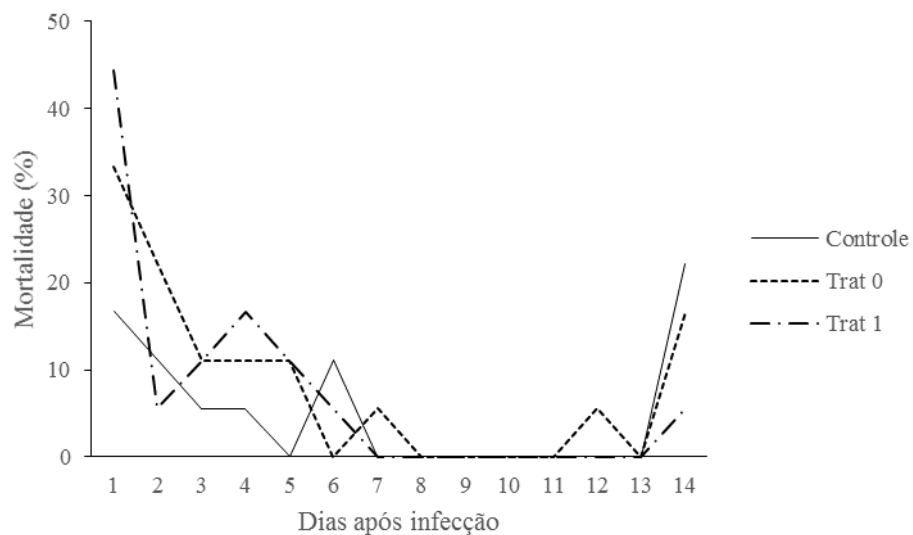
tratamentos com infecção. O Trat 0 apresentou maior ocorrência com picos de até 20% nos dias 4, 9 e 14 após a inoculação do fungo (Figura 1).

A mortalidade durante as primeiras 24 horas após a infecção foi de 16% para o tratamento controle, 33% para o trat0 e 44% para o Trat 1 (Figura 2). Até o sexto dia as mortalidades apresentaram picos distintos sendo o tratamento controle com maior pico de 11,10% no sexto dia, Trat0 com 22,22% no segundo dia e Trat 1 com 16,67% no quarto dia. O Trat 0 apresentou uma persistência quanto as mortalidades (Figura 2). Em um total de mortalidades relativo ao tratamento controle obteve-se que Trat 0 apresentou 61,53% de mortalidade e o Trat 1 apresentou 38,46%. Na maior parte dos óbitos recolhidos os peixes apresentavam-se sem manchas pelo corpo, mas principalmente ulcerações e fungos sobre as brânquias e boca.

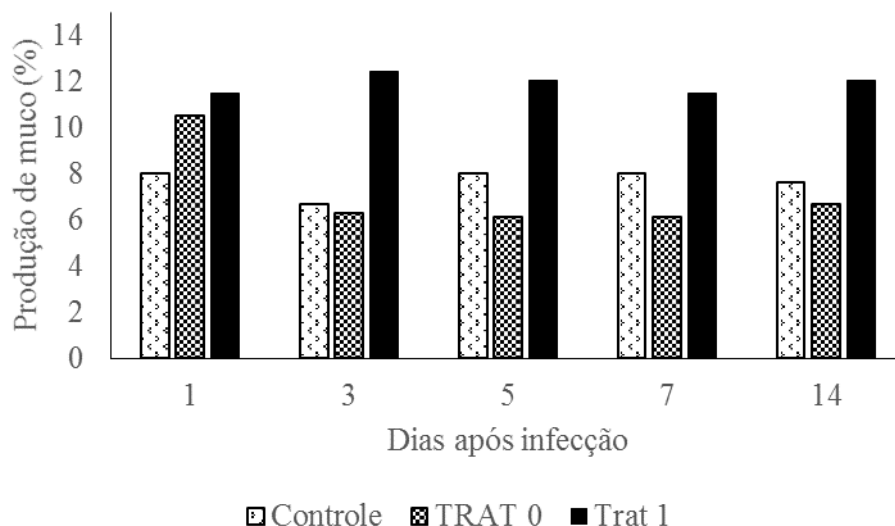
A produção de muco relativa ao peso corporal do tratamento controle foi no primeiro dia 8,02 seguidas por Trat 0 com 10,51% e 11,46% para o Trat 1. A produção de muco para os tratamentos controle e Trat 0 manteve-se baixas comparadas ao tratamento Trat 1 que a produção de muco ficou estável próxima a 12,0%. A produção de muco foi alta nos dois tratamentos infectados no primeiro dia após a infecção, mas a manutenção de alta produção de muco foi registrada, apenas, no tratamento com suplementação de treonina, sugerido o efeito da treonina sobre a produção de muco (Figura 3).



**Figura 2** – Variação da temperatura durante o período experimental e incidência de sintomatologia nos tratamentos sem suplementação de treonina e sem inoculação de *Saprolegnia infestans* (controle), sem suplementação de treonina e com inoculação do fungo (Trat 0) e com suplementação e inoculação, em alevinos de tilápia do Nilo.  $n=18$



**Figura 3** – Mortalidade observada após infecção com fungo *Saprolegnia infestans* nos tratamentos sem suplementação de treonina e sem inoculação de *Saprolegnia infestans* (controle), sem suplementação de treonina e com inoculação do fungo (Trat 0) e com suplementação e inoculação, em alevinos de tilápia do Nilo.



**Figura 4** – Produção média de muco ( $n=7$ ) nos dias seguintes a infecção dos tratamentos sem suplementação de treonina e sem inoculação de *Saprolegnia infestans* (controle), sem suplementação de treonina e com inoculação do fungo (Trat 0) e com suplementação e inoculação, em alevinos de tilápia do Nilo.

### Discussão

Com os resultados obtidos no presente trabalho demonstra-se o potencial uso preventivo de níveis mais altos de aminoácidos na ração como forma de minimizar o impacto de infecções por fungos.

A montagem do experimento em duas etapas proporcionou a avaliação do efeito da suplementação de treonina em duas ocasiões distintas. A primeira onde obteve-se os parâmetros de desempenho e após a inoculação do fungo, onde pode-se estudar o efeito da suplementação nas manifestações da infecção por *Saprolegnia*.

Os parâmetros de desempenho dos tratamentos controle Trat 0 e Trat 1 não apresentaram diferenças com suplementação de treonina industrial

O ganho de peso, conversão alimentar aparente, taxa de eficiência proteica e área superficial embora não apresentaram diferenças do Trat 1 para os demais tratamentos. No entanto observou-se tendência de melhora com a suplementação de treonina para com os tratamentos Controle e Trat 0.

Devido ao consumo de ração não ter sido significativo e as rações possuírem a mesma composição variando apenas o nível de treonina digestível, é possível atribuir a melhora no comportamento a inclusão de treonina. Furuya et al., (2011) revisando a literatura sobre exigência de aminoácidos para tilápia acharam que a relação treonina: lisina, em dietas formuladas com base no conceito de proteína ideal é de 70. Observou-se durante o experimento que a ração sem suplementação contendo relação treonina: lisina de 70 ou  $1,07 \text{ g. kg}^{-1}$  de treonina digestível obteve pior resultado quando comparada ao tratamento com suplementação com relação 77 ou  $1,17 \text{ g. kg}^{-1}$ .

A taxa de crescimento observada durante o experimento está abaixo das taxas encontradas por Furuya et al., (2005) e Bomfim et al., (2008), avaliando a exigência de treonina para alevinos de tilápia do Nilo em sistema de recirculação de água, as quais foram entre 8,7 e 8.47 respectivamente. A variação pode ter sido diferente devido ao período avaliado ter sido menor ao utilizados nos outros trabalhos. Fatores como genética e cuidados com as larvas durante o período de incubação são críticos para o desempenho posterior dos animais e dessa forma podem comprometer drasticamente o desempenho (Tuan et al., 1998; Rodgers et al., 2003), o que possivelmente alterou a performance dos animais.

O consumo de ração não apresentou diferença ( $p=0,5714$ ). O consumo de ração pode ser alterado devido ao balanceamento de nutrientes da ração (Kaushik et al., 1998). Foi observado em experimentos prévios (Bomfim et al., 2008, Takishita, 2012) que a exigência de treonina pode aumentar devido a condições ambientais e genéticas dos animais. Dessa forma é plausível que ocorra a constante avaliação das exigências nutricionais dos animais. Foi encontrado ligeiro aumento do consumo e melhoria da conversão alimentar taxa de eficiência proteica e área da superfície corporal, o que poderia ser um indicativo da melhora no desempenho e por consequência uma exigência

nutricional de treonina maior do que a preconizada anteriormente por Furuya et al.,(2005), Bomfim et al., (2008 )e Takishita et al., (2012).

Todos os tratamentos apresentaram anorexia após a inoculação do fungo, o tratamento com suplementação obteve aumento do consumo da alimentação mais rápido que o tratamento sem suplementação. Quanto à letargia em todos os aquários os peixes apresentaram letargia em algum grau durante o período experimental. A letargia é a ausência de reação a estímulos externos, incluindo a alimentação. Observou-se que os peixes dos tratamentos com suplementação de treonina apresentaram menores ocorrências de letargia se comparado ao tratamento sem suplementação. O tratamento com suplementação de treonina industrial a partir do dia décimo quinto dia após a infecção apresentou aumento da atividade. A exoftalmia é a protrusão de um ou dois dos globos oculares, este sintoma normalmente está relacionado com a presença de infecção bacteriana, também pode ser causada pelo alojamento do fungo no globo ocular. Durante o período experimental foram encontrados apenas alguns casos isolados de ocorrência da protrusão ocular. Estes se concentraram logo ao início do experimento, os peixes que apresentavam o sintoma, foram a óbito no dia seguinte ou alguns dias depois. A natação errática é a perda de equilíbrio do peixe principalmente causada por problemas neurais ou inflamação da bexiga natatória. A ocorrência desse sintoma foi registrada diariamente. O grupo controle não apresentou sintoma nenhum de natação errática. Foram apenas registrados casos isolados desse sintoma nos tratamentos suplementados com treonina. A maior frequência para este sintoma foi presente no tratamento sem suplementação e infectado.

Foi observada ocorrência de 61,53% de mortalidade no Trat 0 e o Trat 1 apresentou 38,46%.Os registros de mortalidade foram feitos diariamente e durante o

experimento observou-se que a maior mortalidade ocorreu até o oitavo dia após a infecção.

A mortalidade dentro do tratamento controle pode ser atribuída principalmente a baixa temperatura.

Observou-se maior produção de muco nos peixes que estavam recebendo a suplementação de treonina. A produção de muco manteve-se alta em todos os tratamentos a partir do primeiro dia após a infecção, no entanto ocorreu persistência da produção alta de muco apenas no tratamento onde aconteceu a suplementação de treonina. Esse aumento na produção de muco pode ser considerado como uma resposta inespecífica ao estresse ambiental e a persistência da alta produção devido ao maior aporte de treonina digestível que os peixes do tratamento suplementado receberam cerca de 59,6 mg de treonina em contraste ao tratamento não suplementado com 38,7 mg. Esta comparação evidencia que após a adaptação ao ambiente infectado a prioridade metabólica do peixe passa a ser o crescimento de tecido muscular, mesmo que a integridade de sua camada protetora de muco seja comprometida

Segundo Ellis (2001) os mecanismos de defesa inata proporcionam um sistema pré-existente e de ação rápida de proteção não específica e relativamente independente da temperatura, portanto, tem várias vantagens sobre a ação lenta e dependente da temperatura de respostas imune específica. A pele fornece uma barreira física e química para a fixação e penetração de patógenos. Além da ligação e descamação de agentes patogênicos ao muco, este contém diversas substâncias bactericidas, incluindo péptidos antimicrobianos, lisozima, lectinas. Ficou evidenciado que a produção de muco teve de ser aumentada devido ao desafio sanitário existente. A treonina é o primeiro aminoácido requerido para a produção de muco e também é o aminoácido que apresenta maior quantidade na estrutura da mucina (Obled, 2003).

Desta forma, os peixes que receberam suplementação com treonina industrial obtiveram melhor condição para superar a infestação pelo fungo.

### **Conclusão**

Conclui-se que a exigência por aminoácidos é dinâmica e não dependente só de fatores intrínsecos ao animal, mas também do desafio ambiental no qual o animal está inserido. A suplementação de treonina embora não altere as variáveis de desempenho melhora a produção de muco e condição de animais submetidos a desafio por saprolégna (*Saprolegnia infestans*)

## Referências Bibliográficas

- Bomfim, M. A. D., Lanna, E. A. T., Donzele, J. L., Abreu, M. L. T. D., Ribeiro, F. B., & Quadros, M. (2008). Redução de proteína bruta com suplementação de aminoácidos, com base no conceito de proteína ideal, em rações para alevinos de tilápia-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37(10), 1713-1720.
- Chambel, J., Costa, R., Gomes, M., Mendes, S., Baptista, T., & Pedrosa, R. (2012). Hydrogen peroxide, iodine solution and methylene solution highly enhance the hatching rate of freshwater ornamental fish species. *Aquaculture International*, 22(6), 1743-1751.
- Clark, E. S., & Wedekind, C. (2011). Additive genetic effects on embryo viability in a whitefish (Salmonidae) influenced by the water mould *Saprolegnia ferax*. *J Bacteriol Parasitol S4-001. doi, 10, 2155-9597*.
- Collet B. 2012. Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. *Developmental & Comparative Immunology* 43: 160-173
- de Bruijn, I., Belmonte, R., Anderson, V. L., Saraiva, M., Wang, T., van West, P., & Secombes, C. J. (2012). Immune gene expression in trout cell lines infected with the fish pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica*. *Developmental & Comparative Immunology*, 38(1), 44-54.
- Ellis A. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology* 25: 827-839.
- El-Mahmoud R, Ibrahim D. 2012. The effect of aloe gel and dried Camphora leaves on growth performance, body composition, immunity, some blood parameters and economic efficiency in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Pages 149-164. Proceedings of the 6th Global Fisheries and Aquaculture Research Conference, Hurgada, Egypt, 27-30 September 2013.: Massive Conferences and Trade Fairs.
- Flik G, Rijs JH, Wendelaar Bonga SE. 1984. Evidence for the presence of calmodulin in fish mucus. *European journal of biochemistry* 138: 651-654.
- Furuya, W. M., Botaro, D., MACEDO, R. D., SANTOS, V. D., Silva, L. C. R., SILVA, T. D. C., ... & Sales, P. J. P. (2005). Aplicação do conceito de proteína ideal para redução dos níveis de proteína em dietas para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 34(5), 1433-1441.
- Furuya, W. M., Furuya, V. R. B., Nagae, M. Y., Graciano, T. S., Michelato, M., Xavier, T. O., & Vidal, L. V. (2012). Nutrição de tilápias no Brasil. *Revista Varia Scientia Agrárias*, 3(01), 133-150.
- Hussien, A. M., Ahmed, I. E., Waled, S. E., & Omima, A. (2010). A trial for Induction of saprolegniosis in *Mugel cephalus* with special reference to biological control. *Journal of American Science*, 6(6), 6.
- Johnson, T. W., Seymour, R. L., & Padgett, D. E. (2002). Biology and systematics of the Saprolegniaceae.

- Kaushik, S. J. (1998). Nutritional bioenergetics and estimation of waste production in non-salmonids. *Aquatic Living Resources*, 11(04), 211-217.
- Li P, Yin Y-L, Li D, Woo Kim S, Wu G. 2007. Amino acids and immune function. *British Journal of Nutrition* 98: 237-252.
- Obled, C. (2003). Amino acid requirements in inflammatory states. *Canadian journal of animal science*, 83(3), 365-373.
- Rodgers, B. D., Weber, G. M., Kelley, K. M., & Levine, M. A. (2003). Prolonged fasting and cortisol reduce myostatin mRNA levels in tilapia larvae; short-term fasting elevates. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284(5), R1277-R1286.
- Sun, Q., Hu, K., & Yang, X. L. (2014). The efficacy of copper sulfate in controlling infection of *Saprolegnia parasitica*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(2), 220-225.
- Takishita, S. S. Relações de treonina e triptofano, com lisina digestível em rações para alevinos de tilápia do Nilo 2012. 43f.(Tese Doutorado).- Viçosa, MG
- Tampieri, M. P., Galuppi, R., Carelle, M. S., Macchioni, F., Cioni, P. L., & Morelli, I. (2003). Effect of selected essential oils and pure compounds on *Saprolegnia parasitica*. *Pharmaceutical biology*, 41(8), 584-591.
- Tuan, P. A., Little, D. C., & Mair, G. C. (1998). Genotypic effects on comparative growth performance of all-male tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 159(3), 293-302.
- Van Muiswinkel WB, Nakao M. 2012. A short history of research on immunity to infectious diseases in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 43: 130-150.
- van West P, de Bruijn I, Minor KL, Phillips AJ, Robertson EJ, Wawra S, Bain J, Anderson VL, Secombes CJ. 2010. The putative RxLR effector protein SpHtp1 from the fish pathogenic oomycete *Saprolegnia parasitica* is translocated into fish cells. *Fems Microbiology Letters* 310: 127-137
- Workenhe ST, Rise ML, Kibenge MJ, Kibenge FS. 2010. The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses. *Molecular Immunology* 47: 2525-2536.
- Zaki, M. S., Fawzi, O. M., & Jackey, J. E. (2008). Pathological and biochemical studies in *Tilapia nilotica* infected with *Saprolegnia parasitica* and treated with potassium permanganate. *J. Agric. Environ. Sci*, 3, 677-680.