

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

**SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO EM DIETAS: DESEMPENHO
PRODUTIVO E RESPOSTA HEMÁTICA E IMUNOLÓGICA DA
TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDA A DESAFIO BACTERIANO**

CAROLINE PELEGRINA TEIXEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutora

BOTUCATU – SP

Julho – 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

**SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO EM DIETAS: DESEMPENHO
PRODUTIVO E RESPOSTA HEMÁTICA E IMUNOLÓGICA DA
TILÁPIA-DO-NILO SUBMETIDA A DESAFIO BACTERIANO**

CAROLINE PELEGRINA TEIXEIRA

Zootecnista

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARGARIDA MARIA BARROS

CO-ORIENTADORES: Profa. Dra. LUCIANA FRANCISCO FLEURI

Prof. Dr. RICARDO DE OLIVEIRA ORSI

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutora

BOTUCATU – SP

Julho – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

T355s Teixeira, Caroline Pelegrina, 1976-
Suplementação de zinco em dietas: desempenho produtivo e resposta hemática e imunológica da Tilápia-do-Nilo submetida a desafio bacteriano / Caroline Pelegrina Teixeira - Botucatu : [s.n.], 2013
xi , 94 f. : il., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2013

Orientador: Margarida Maria Barros
Coorientadora: Luciana Francisco Fleuri
Coorientadora: Ricardo de Oliveira Orsi
Inclui bibliografia

1. Tilápia (Peixe). 2. Hematologia. 3. Tilápia (Peixe) - Zinco - Efeito fisiológico. 4. Tilápia (Peixe) - Nutrição. I. Barros, Margarida Maria. II. Fleuri, Luciana Francisco. III. Orsi, Ricardo de Oliveira. IV. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. V. Título.

*“Quando o homem aprender a respeitar até
o menor ser da criação, seja animal ou vegetal,
ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante.”*

Albert Schweitzer

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

João Paulo Bernardes Teixeira e Mercedes Fátima Pelegrina Minharro,

agradeço todo amor, carinho, compreensão, ensinamentos, por fazerem de mim uma pessoa de princípios éticos e por me apoiarem esse tempo todo. EU AMO VOCÊS!!!!

Aos meus irmãos e prima,

João Paulo Pelegrina Teixeira, Cristiane Pelegrina Teixeira e

Ana Camila Pelegrina Pavanelli,

obrigada pela força, incentivo e carinho, eu amo vocês.

Ao meu noivo,

Vitor Barbosa Fascina,

eu diria imprescindível nessa fase da minha vida!!

Obrigada pela motivação, carinho, por aguentar minhas fases de angústias, desespero, sempre me apoiando e incentivando a ir em frente, de cabeça erguida. Obrigada por ter aparecido na minha vida, e torná-la mais feliz, madura e suave.

SEREI ETERNAMENTE APAIXONADA POR VOCÊ!!!!!!

AGRADECIMENTO AOS MEUS TUTORES CIENTÍFICOS

Depois de longos seis anos de formada, de muitas dúvidas e anseios, decidi dar um novo rumo à minha vida, profissional e pessoal. Ainda estava sem direção, mas tinha a convicção de que a área acadêmica era a minha diretriz, e que lutaria com todas as minhas forças para que isso acontecesse.

É claro que contei muito com o auxílio de amigos e fundamentalmente dos meus pais. Tive a sorte e felicidade de ser apresentada a pessoas que hoje considero como meus “pais” científicos, Profa. Margarida Maria Barros e Prof. Luiz Edivaldo Pezzato.

Comecei fazendo estágio e tentava de todas as formas, absorver o máximo possível de conhecimento, eu precisava daquilo. Quando passei no mestrado a alegria e a certeza de que tudo começava a se encaixar na minha vida eram tão grandes, que eu parecia “explodir” de tanta felicidade. Eu sabia que o doutorado era só uma questão de tempo.

*Profa. Margarida Maria Barros, ou **Teacher**, além de ser minha orientadora, ao longo desses quase sete anos, você se tornou uma grande amiga e parceira. Sou muito grata por tudo que fez, faz e tenho certeza que ainda fará por mim. Agradeço cada ensinamento, “puxão de orelha”, “rezas” antes de enviar cada artigo, risadas, confidências, preocupações, cumplicidade, afinal, tudo o que uma amizade sincera pode ter. Eu a admiro e respeito muito. Jamais esquecerei tudo isso, para onde quer que eu vá, isso tudo estará impresso nas minhas atitudes para com meus futuros orientados e guardado no meu coração. **VOCÊ É UMA FOFA!!!!***

Prof. Pezzato, serei eternamente grata à sua generosidade, palavras de conforto, ensinamentos e pelo privilégio de ter convivido com você todos esses anos.

Confesso minha admiração por sua inteligência e oratória, e que adoro vê-lo falar em bancas de defesa... choro toda vez.

Agradeço também aos meus co-orientadores Prof. Ricardo de Oliveira Orsi e Profa. Luciana Francisco Fleuri por toda a ajuda, paciência, ensinamentos e momentos felizes, vocês estarão sempre no meu coração.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo: 2010/13053-7) e CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu, pela oportunidade e privilégio de realizar o experimento nesta instituição;

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da FMZV/UNESP, Botucatu, pela oportunidade e honra em cursar doutorado em uma instituição de excelência;

À Guabi por confeccionar e doar o premix mineral e vitamínico utilizado em nosso estudo;

Ao Prof^ª. Dr^ª. Maria Márcia Pereira Sartori pela atenção e auxílio na realização das análises estatísticas;

Aos professores membros da banca de qualificação, Dra. Margarida Maria Barros, Dr. Dirlei Antônio Berto e Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, pela arguição e sugestões feitas, que foram muito importantes;

Aos professores que compõem a banca de defesa, agradeço previamente a disponibilidade e sugestões que, com certeza, enaltecem a versão final deste trabalho;

Aos professores e funcionários dos Departamentos de Melhoramento e Nutrição Animal e Produção Animal pelo auxílio e amizade;

Aos meus amigos, irmãos e camaradas, Xuxa, João, Pedrão e Felipe, que sempre me apoiaram em todos os momentos, principalmente quando o laboratório “quase pegou fogo” durante meu experimento, por me incentivarem, pelas longas conversas agradáveis, momentos de descontração e muitas gargalhadas. Tenho certeza que seremos sempre uma grande família, onde quer que estejamos;

À toda a equipe do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos –

AquaNutri; Ademir Calvo Fernandes Junior, João Fernando Albers Koch, Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho, Felipe Tenório Cintra, Igo Gomes Guimarães, Vivian Gomes dos Santos, Graciela Pessoa Martins, Rosangela do Nascimento Fernandes, Altevir Signor, André Moreira Bordinhon, Fernando Kojima Nakagome, Daniel de Magalhães Araújo, Renan de Mattos Botelho, Flavia Mota Damasceno, Mariucha Karina Honório Ribeiro Rocha, Rafael Lopes da Silva , Jakeline Marcela Azambuja de Freitas , Eric Portilho de Araújo, Mariana Roedel Lopez Vieira Peixoto e Guilherme Eduardo Sassi, pela amizade, respeito, auxílio na realização desse trabalho e experiências compartilhadas;

Aos professores de graduação Dr. Carlo Rossi del Carratore e Dra. Jaqueline Haddad Machado pelo incentivo e amizade;

Aos amigos que fiz ao longo desses anos em Botucatu;

Aos funcionários e amigos da Seção de Pós-graduação da FMVZ, Posto de Serviço Lageado, Seila Cristina Cassineli Vieira, Carlos Pazini Junior e Aline Eliane Couto pela atenção e auxílios prestados;

A todos que de alguma maneira contribuíram com este trabalho, **MUITO OBRIGADA!!**

SUMÁRIO**CAPÍTULO I**

Considerações Iniciais	02
Referências Bibliográficas	22

CAPÍTULO II**ABSORÇÃO DE MINERAIS E DESEMPENHO DE TILÁPIAS-DO-NILO ALIMENTADAS COM DIETAS PRÁTICAS SUPLEMENTADAS COM ZINCO**

Resumo	40
Abstract	41
Introdução	42
Material e Métodos	43
Resultados	49
Discussão	50
Referências Bibliográficas	54

TABELAS

Tabela 1. Composição das dietas experimentais práticas	60
Tabela 2. Valores médios e desvio padrão de coeficientes de absorção de zinco (CAA Zn), ferro (CAA Fe), cobre (CAA Cu) e manganês (CAA Mn) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçados com dietas prática suplementadas com zinco	61
Tabela 3. valores médios e desvio padrão de ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), taxa de retenção proteica (TRP) e fosfatase alcalina (FA) e medianas de sobrevivência (SB), de juvenis de tilápia-do-nilo arraçados com dietas suplementadas com níveis de zinco durante 130 dias	62

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão de concentração de proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), cinzas, zinco (ZnCar) e cobre (CuCar) na carcaça e zinco nos ossos (ZnO) de juvenis de tilápia-do-nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis de zinco durante 130 dias (com base na matéria seca)	63
--	----

FIGURAS

Figura 1. Coeficiente de absorção de zinco de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis de zinco	64
Figura 2. Ganho de peso de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis de zinco	64
Figura 3. Conversão alimentar de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis de zinco	65
Figura 4. Taxa de retenção proteica de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis de zinco	65
Figura 5. Concentração de zinco óssea de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis de zinco	66

CAPÍTULO III

PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E HEMATOLÓGICOS DE TILÁPIAS-DO-NILO ALIMENTADAS COM DIETAS PRÁTICAS SUPLEMENTADAS COM ZINCO E DESAFIADAS POR *Aeromonas*

hydrophila

Resumo	68
Abstract	69
Introdução	70
Material e Métodos	71
Resultados	79
Discussão	80

Referências Bibliográficas	83
TABELAS	
Tabela 1. Composição das dietas experimentais	88
Tabela 2 Medianas de eritrócitos (Erit), porcentagem de hematócrito (Htc), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçados com dietas suplementadas com níveis de zinco, infectados ou não com <i>Aeromonas hydrophila</i>	89
Tabela 3. Medianas de proteína plasmática total (PPT), albumina (ALB), globulina (GLOB) e relação albumina/globulina (A:G) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçados com dietas suplementadas com níveis de zinco, e infectados ou não com <i>Aeromonas hydrophila</i>	80
Tabela 4. Medianas de número absoluto de leucócitos (LEUC), linfócitos (LF), neutrófilos (NT) e monócitos (MN) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçados com dietas suplementadas com zinco, e infectados ou não com <i>Aeromonas hydrophila</i>	91
Tabela 5. Medianas de valores de intermediários reativos de nitrogênio (NO), e oxigênio (H ₂ O ₂) produzidos por monócitos de juvenis de tilápia-do Nilo arraçados com dietas suplementadas com níveis de zinco infectados ou não com <i>Aeromonas hydrophila</i>	92
Tabela 6 Medianas de valores de atividade da superóxido dismutase (SOD) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçados com dietas suplementadas com níveis de zinco infectados ou não com <i>Aeromonas hydrophila</i>	92
Tabela 7 Número de unidades formadoras de colônias (UFC mL ⁻¹), logaritmo (Log ₁₀) e percentual de sobrevivência (%) de <i>Aeromonas hydrophila</i> incubada em meio contendo monócitos de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçados com dietas suplementadas com níveis de zinco infectados ou não com <i>Aeromonas hydrophila</i>	93
IMPLICAÇÕES	94

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Aspectos fisiológicos e metabólicos do zinco

Os minerais são importantes em diversos aspectos do metabolismo dos peixes, dentre os quais se destacam a rigidez dos ossos, manutenção do equilíbrio osmótico com o meio aquático e manutenção do sistema nervoso e endócrino, além de serem componentes de enzimas envolvidas nos processos metabólicos. São sete os minerais mais estudados na nutrição de peixes o cálcio, magnésio, manganês, ferro, zinco, iodo e selênio. Diferentemente dos demais animais, os peixes apresentam a particularidade de ter como fonte de minerais tanto a dieta como o meio em que vivem (PEZZATO et al., 2004).

Como componente ou cofator para alguns sistemas enzimáticos, o zinco é vital ao metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos. É ativo no metabolismo de ácidos nucleicos e proteínas, sendo ainda essencial para muitas metaloenzimas, tais como anidrase carbônica, fosfatase alcalina e carboxipeptidase pancreática. Esse mineral desempenha papel importante na ação da insulina, glucagon, hormônios corticotróficos, folículo estimulante e luteinizante (PEZZATO et al., 2004). Segundo Lovell (1998), este micromineral é absorvido pelos peixes através do trato gastrointestinal, brânquias, nadadeiras e pele. O zinco é essencial para a integridade do sistema imune, e a deficiência deste mineral resulta em efeitos negativos na imunocompetência dos animais, tais como, diminuição na produção e atividade do hormônio tímico, linfócitos, “natural killers”, anticorpos, neutrófilos e citocina (McDOWELL, 1989).

O zinco ocorre como cinco isótopos estáveis: ^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn e ^{70}Zn . Este mineral forma ligações com aminoácidos, peptídeos e nucleotídeos, diferindo dos outros metais de transição por conter o subnível “d” completo. Desta forma, não participa

diretamente de reações de oxidação, mas se comporta quimicamente como ácido de Lewis, aceitando um par de elétrons livres, o que determina sua passagem pelas membranas biológicas (McCALL et al., 2000; POWELL, 2000; SALGUEIRO et al., 2000).

O zinco é essencial para o funcionamento celular normal, participando do metabolismo, regulação da expressão gênica, manutenção estrutural de biomembranas, imunidade e proteção contra radicais livres (FAA et al., 2008), divisão celular, síntese de DNA e proteínas, e também é necessário para cicatrização, acuidade do paladar, crescimento e manutenção do tecido conjuntivo, produção de prostaglandinas, mineralização óssea, função tireoidiana adequada, produção de insulina, coagulação do sangue, funções cognitivas, crescimento fetal e produção de esperma (CHIRANJIB & KUMAR, 2010).

O zinco é particularmente importante nos processos de estoque, secreção e ação da insulina. Este micromineral é cofator da enzima carboxipeptidase pancreática, a qual catalisa a conversão de pró-insulina (inativa) em insulina (ativa). Além disso, o zinco favorece a fosforilação do receptor de insulina e, dessa forma potencializa o transporte de glicose para o interior das células (HAASE & MARET, 2003; DUNN, 2005).

As propriedades antioxidantes do zinco são explicadas pelo seu papel na regulação da síntese das metalotioneínas, na estrutura superóxido dismutase, e proteção de grupamentos sulfidrila de proteínas de membranas celulares, promovendo a inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por antagonismo com metais pró-oxidantes, como ferro e cobre. Estudos têm demonstrado que a fragilidade osmótica de eritrócitos está relacionada à função do mineral na membrana celular (POWELL, 2000; KOURY & DONANGELO, 2003).

Os micronutrientes sofrem interações por diversos mecanismos que podem afetar sua absorção e biodisponibilidade. Minerais, com similaridades químicas, podem competir pelos mecanismos de transporte, facilitando ou impedindo a absorção destes pelo epitélio (GLOVER et al., 2003). As consequências destas interações dependem das concentrações dos nutrientes na dieta, inter-relações destes com os nutrientes do meio aquático, espécie em estudo e disponibilidade do nutriente na dieta (SANDSTRÖM, 2001).

É vital para o organismo a manutenção do nível ótimo de zinco no fígado e no sangue e, portanto, quando a quantidade de zinco for aquém da exigida pelo animal, este pode recorrer a suas reservas ósseas (SÁ et al., 2005). Spinelli et al. (1983) fornecendo dietas purificadas suplementadas com fitato para truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) não observaram alterações nas concentrações de zinco no fígado e plasma. A ampla via metabólica governada pelo zinco ligado à proteínas e suas inter-relações regulam sua distribuição e homeostase. Os sistemas regulatórios são efetivos na sua absorção, distribuição e excreção protegendo o organismo contra deficiências e excessos de minerais (VALLEE & FALCHUK, 1993; HORN et al., 1995; GLOVER & HOGSTRAND, 2002).

Fatores que afetam a biodisponibilidade

O termo biodisponibilidade indica a fração de qualquer nutriente ingerido que tem potencial para suprir demandas fisiológicas do organismo, e diversos fatores podem influenciar o aproveitamento dos nutrientes pelo animal. Sendo assim, a determinação do teor total do metal ingerido pelo organismo não possibilita traçar perfil de eficácia de sua absorção, sendo importante considerar sempre as taxas de conversão e eficiência do

nutriente (ANDRADE et al., 2004; COZZOLINO, 2009).

A absorção do zinco ocorre, predominantemente, no jejuno. Esse micronutriente é absorvido pela superfície da borda em escova por meio do mecanismo de difusão passiva e por processos mediados por carreadores, os quais dependem da sua concentração na dieta. Em situação de baixa concentração de zinco dietético, predomina o mecanismo mediado por carreadores. Já a absorção por difusão passiva ocorre quando o consumo deste mineral é elevado (SALGUEIRO et al., 2000). No interior das células intestinais, sua concentração é regulada pelas metalotioneínas intestinais e pela proteína intestinal rica em cisteína (CRIP). Quando o teor de zinco nos enterócitos aumenta, esse mineral permanece ligado às metalotioneínas, sendo em seguida excretado nas fezes juntamente com células descamadas. Por outro lado, na presença de baixas concentrações do mineral, as metalotioneínas regulam a transferência do zinco para a CRIP, que funciona como carreador intracelular de zinco, aumentando assim sua velocidade de absorção, sendo em seguida transportado para a corrente sanguínea (MAFRA & COZZOLINO, 2004).

Após o processo de absorção, o zinco liberado dos enterócitos passa pelos capilares mesentéricos e sangue portal, sendo então captado pelo fígado e distribuído ao plasma e a sítios celulares para desempenhar funções específicas (Figura 1). No plasma, cerca de 90% do zinco é carreado ligado à albumina e 10% deste mineral está ligado à α 2-macroglobulina e aminoácidos, especialmente a histidina e cisteína. A excreção do mineral ocorre por meio do rim, pele e intestino (ISLAM & LOOTS, 2007; MOCHEGANI et al., 2008).

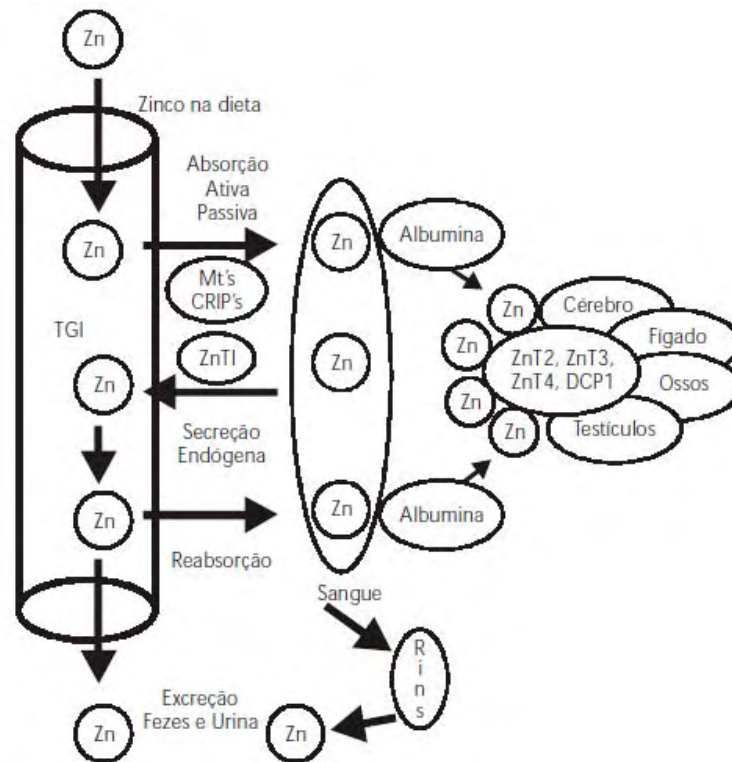


Figura 1. Esquema representativo dos mecanismos de digestão, absorção, aproveitamento por tecidos periféricos e excreção de zinco proveniente da dieta (HENRIQUES et al., 2003).

A regulação da homeostase do zinco intracelular é feita por duas principais proteínas: as metalotioneínas e as proteínas transportadoras de zinco. As metalotioneínas regulam a liberação de zinco e a expressão gênica destas é estimulada pelo consumo alimentar de zinco. Quando existe aumento da ingestão de zinco, ocorre indução da síntese de tioneína, por meio de sua ação sobre fatores de transcrição zinco-dependentes, formando as metalotioneínas ligadas a este mineral. Por outro lado, em situações de baixa disponibilidade, o zinco é liberado das metalotioneínas, sendo então incorporado a outras proteínas (DUFNER-BEATTIE et al., 2003; SEVE et al., 2004).

A quantidade desse mineral no lúmen intestinal aumenta de uma a três vezes devido à soma entre o mineral proveniente da dieta e aquele secretado nos sucos

digestivos. Não obstante, os mecanismos de absorção e excreção deste oligoelemento obedecem a sistemas de auto-regulação com alta sensibilidade, fazendo com que os reajustes nos estoques dependam da necessidade e biodisponibilidade do íon no organismo. Dessa forma, supõe-se que a absorção de zinco depende dos estoques corporais, sendo menor se houver quantidades razoáveis no organismo, e maior nas deficiências (KREBS, 2000).

Os fatores que afetam a biodisponibilidade de um mineral em uma dada fonte, natural ou suplementar, podem ser classificados em duas categorias: fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos ou fisiológicos que interferem na biodisponibilidade dos minerais são: idade do indivíduo, pH do trato digestório e nível nutricional orgânico. Já os fatores extrínsecos ou dietéticos são: nível de ingestão de mineral, forma química do elemento, inter-relações com outros minerais, tipo da dieta, teor de fibra da dieta e complexação com ligantes positivos e negativos, como o ácido fítico (Figura 2). Além desses fatores, períodos experimentais abaixo de 90 dias podem mascarar possíveis deficiências de minerais em estudos de desempenho produtivo e saúde de peixes (SÁ et al., 2005).

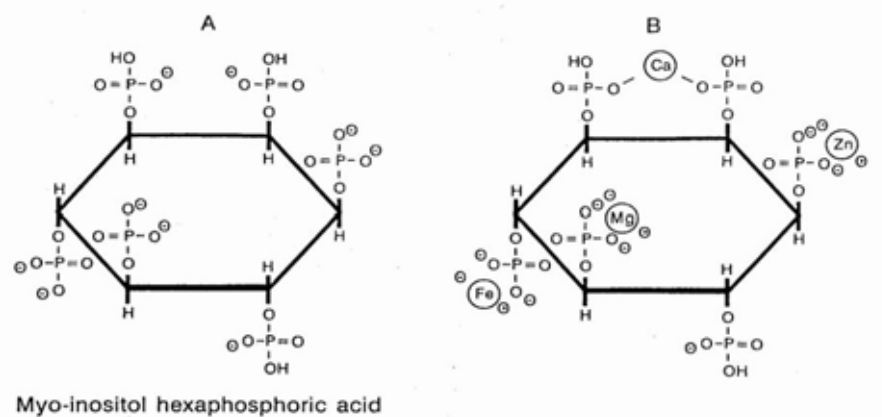


Figura 2. Estrutura do ácido fítico e ácido fítico quelatado à íons metálicos (THOMPSON, 1988)

De maneira geral, o zinco presente em fontes inorgânicas, como sulfato de zinco ou óxido de zinco, por exemplo, está mais disponível ao organismo que o zinco de fontes de vegetais, sendo que o da fonte inorgânica também não apresenta 100% de biodisponibilidade (LO et al., 1981). A complexação do íon metálico a um aminoácido ou peptídeo pode aumentar a absorção do mineral no trato digestório, por evitar que o mesmo forme compostos insolúveis com fatores antinutricionais presentes na dieta e por facilitar seu transporte através das membranas absorptivas do organismo (BARROS et al., 2006). Desta forma, a utilização de fontes que apresentem boa biodisponibilidade de zinco é de fundamental importância, melhorando o aporte do organismo. O monitoramento dos indicadores de níveis de outros nutrientes que apresentem interações com o zinco, como ferro, cobre, cálcio e manganês também são importantes. Eid & Ghonim (1994) observaram que as concentrações corporais de ferro em alevinos de tilápia-do-Nilo apresentaram correlação negativa com os níveis de suplementação de zinco. Efeitos similares foram observados em trutas arco-íris alimentadas com dietas suplementadas com níveis crescentes de zinco (OGINO & YANG, 1978). Em outro experimento, trutas arco-íris alimentadas com dietas suplementadas com 500 a 1000 mg Zn kg⁻¹ apresentaram redução na concentração de cobre no fígado (KNOX et al., 1984).

Exigência e sinais clínicos de deficiência de zinco

A disponibilidade dos minerais na dieta é marcada pela eficiência com que o animal os utiliza, variando em função dos ingredientes utilizados e da composição da dieta. Diversos fatores influenciam a disponibilidade, tais como: níveis de inclusão e forma dos nutrientes; tamanho da partícula; digestibilidade e interação dos nutrientes, as quais podem ser sinérgicas ou antagônicas; condições fisiológicas e/ou patológicas dos

peixes e concentração dos minerais na água (SANDSTRÖM, 2001; GLOVER & HOGSTRAND, 2002; LIAO et al., 2006; ZHAO et al., 2009).

Sá et al. (2005) determinaram a suplementação nutricional de zinco para tilápia-do-Nilo em $79,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de dietas práticas utilizando o sulfato de zinco, e observaram que a quantidade do mineral dietético tem relação direta com sua absorção e dos demais minerais bivalentes da dieta. Sugere-se, portanto, que ocorra competição do zinco nos sítios de ligação das proteínas transportadoras, com outros minerais que apresentam caráter químico bivalente, tais como cálcio, ferro, manganês e cobre (SANDSTRÖM, 2001). A maior disponibilidade de zinco proporciona a multiplicação intensa da microbiota intestinal, exercendo ação positiva sobre a morfologia e funcionamento epitelial absorptivo do duodeno, de forma a aumentar a espessura da mucosa intestinal e sua área absorptiva (LI et al., 2001).

Há variação da exigência dietética de zinco nos animais monogástricos, sendo maior em dietas à base de ingredientes vegetais em relação aos ingredientes de origem animal, devido à presença de fitato nas dietas vegetais, que ao se complexar com o zinco no lúmen intestinal, o indisponibiliza (OBERLEAS & PRASAD, 1969; SÁ et al., 2004). Portanto, a exigência dietética desse mineral por peixes alimentados com dietas práticas é maior, quando comparadas às dietas purificadas (SATO et al., 1987; Sá et al., 2005). Desta forma, o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) que apresenta exigência de $20,0 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ em dietas purificadas (GATLIN III & WILSON, 1982), necessita de $150,0$ a $200,0 \text{ mg kg}^{-1}$ em dietas práticas (GATLIN III & PHILLIPS, 1989). Maage & Julshamn (1993) encontraram no conteúdo corporal do salmão do Atlântico (*Salmo salar*) níveis de $30,0$ a $50,0 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ de peso e determinaram que a exigência de zinco para a espécie está próximo ao seu conteúdo corporal, variando de $37,0$ a $67,0 \text{ mg}$

de Zn kg⁻¹ de dieta.

Juvenis de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) alimentados com dieta prática isenta de zinco apresentaram menor consumo de ração e retenção proteica (LIANG et al., 2012). Resultados similares foram observados para carpa (OGINO & YANG, 1979) e tilápia-do-Nilo (EID & GHONIM, 1994). Tan et al. (2010) avaliando juvenis de carpa Jian (*Cyprinus carpio*) deficientes em zinco, observaram que quando esses animais consumiram dietas com níveis adequados de zinco, os sinais clínicos de deficiência desapareceram, gradativamente, e o crescimento aumentou rapidamente. Fountoulaki et al. (2010) observaram que juvenis de robalo (*Dicentrarchus labrax*) que sofreram injúrias na pele, necessitaram de 148 mg de Zn orgânico kg⁻¹ de dieta prática para que apresentassem boa cicatrização. Os sinais clínicos de deficiência nutricional são a redução do apetite, o retardo no crescimento, a baixa concentração de zinco nos ossos e no sangue, ocorrência de cataratas e erosão das nadadeiras e da pele (SATOH et al., 1987). Bagres do canal alimentados com dieta isenta de zinco apresentaram menor crescimento, sobrevivência, catarata e baixa concentração do mineral na carcaça (LALL, 1989).

Estresse em peixes

O sistema fisiológico dos peixes pode ser desafiado ou estressado por vários fatores. O termo estressor pode ser utilizado para descrever esses fatores se o desafio for suficientemente severo para determinar a resposta fisiológica compensatória. Essa resposta é considerada reação adaptativa que melhora a chance de sobrevivência diante de situação nociva ou desafiadora (JOBLING, 1994).

Em resposta ao agente estressor o organismo promove cascata de eventos na

tentativa de manter a homeostase. Segundo Pickering (1981), as respostas ao estresse podem ser classificadas em primária (aguda), secundária (crônica) e terciária (crônica prolongada). A resposta primária envolve a ativação do sistema neuroendócrino, com a liberação das catecolaminas e o aumento da liberação, pelo eixo hipotálamo-hipofise-interrenal (HPI), do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e dos hormônios corticóides. A resposta secundária inclui mudanças comportamentais e fisiológicas, em decorrência da liberação dos hormônios, como aumento da pressão sanguínea, maior oxigenação e mobilização das reservas energéticas. Em decorrência desses fatores, a resposta terciária ou exaustão envolve todo o organismo animal, sendo que o crescimento, a reprodução e o sistema imune são comprometidos (WEDEMEYER, 1969).

A intensificação dos sistemas de produção de peixes, visando maior produção e lucro por área, propicia o aparecimento de doenças. Isso ocorre, principalmente, em função da deterioração da qualidade da água como consequência da alta densidade, comprometendo, diretamente, a saúde dos animais. Essa condição de criação exige, dos profissionais da aquicultura, maior conhecimento dos sistemas de defesa dos peixes, a fim de minimizar os efeitos nocivos, inerentes deste sistema de produção. Igualmente, tornou-se fundamental otimizar o sistema de defesa dos peixes, sendo que a melhora da resposta imune, via nutrição, se apresenta como alternativa atraente e possível (BARROS et al., 2006).

O uso de estratégias nutricionais que favoreçam os mecanismos de defesa dos peixes tem demonstrado importância para a obtenção de peixes saudáveis, tornando-os capazes de reagir ao impacto de alterações ambientais e ataque de agentes oportunistas, com maiores chances de sobrevivência (TORRECILLAS et al., 2007). Desta forma, é

preciso que os peixes estejam em condições nutricionais adequadas para bom desempenho do sistema de defesa e, assim, torná-los aptos a responder aos desafios impostos.

São consideradas estratégias nutricionais, o uso de nutrientes em quantidades adequadas, que possam permitir o crescimento desejado com melhores condições de higidez (BARROS et al., 2006). O uso de estratégias nutricionais exige conhecimento das exigências nutricionais, baseado na saúde e crescimento dos peixes. Evidências têm indicado que, a maioria, se não todos os nutrientes dietéticos essenciais, bem como, o manejo alimentar, influenciam a resistência dos organismos às doenças (WEBSTER, 2007).

Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido, classicamente, como “desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor do pró-oxidante” (SIES, 1985). No entanto, esse conceito vem se adaptando às recentes descobertas, as quais demonstram que as espécies reativas de oxigênio (EROs) podem atuar como segundos mensageiros de vias específicas na sinalização celular (JONES, 2006; FORMAN et al., 2004; ROSA et al., 2004). Dessa forma, surge nova definição que conceitua como “desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, causando desarranjo da sinalização e controle redox e/ou a dano molecular” (JONES, 2006).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas nas células por diversos estímulos fisiológicos e ambientais, tais como infecções, radiações UV e poluentes, os quais são coletivamente chamados de oxidantes. As EROs também são consideradas como fatores de risco e aceleradores de doenças autoimunes, visto que existe estreita

relação entre o estresse oxidativo e essas doenças (SURH, 2005; AVALOS et al., 2007).

A excessiva formação endógena de radicais livres pode ser causada pela ativação aumentada de fagócitos, interrupção dos processos normais de transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, aumento da concentração de íons metálicos de transição por escape do grupamento heme de proteínas em locais de lesão ou doenças metabólicas e por níveis diminuídos das defesas antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; DROGE, 2002; OKTYABRSKY & SMIRNOVA, 2007).

Por outro lado, as EROs são reconhecidas como importantes sinalizadoras intracelulares e estão envolvidas na regulação redox no interior das células do sistema imune (OKTYABRSKY & SMIRNOVA, 2007; GRIFFITHS, 2005; BARRY HALLIWELL, 2007). Sabe-se que células fagocitárias, como macrófagos e neutrófilos, são ativadas sob condições oxidativas. Essa ativação é mediada pelo sistema da NADPH oxidase que resulta em incremento no consumo de oxigênio e, conseqüente, produção de ânion superóxido, que é convertido em peróxido de hidrogênio espontaneamente e pode ser catalisado pela enzima superóxido dismutase (Figura 3). Essa enzima possui duas isoformas denominadas cobre-zinco-SOD e manganês-SOD, uma constitutiva e outra induzível, respectivamente (HITCHON & El GABALAWY, 2004).

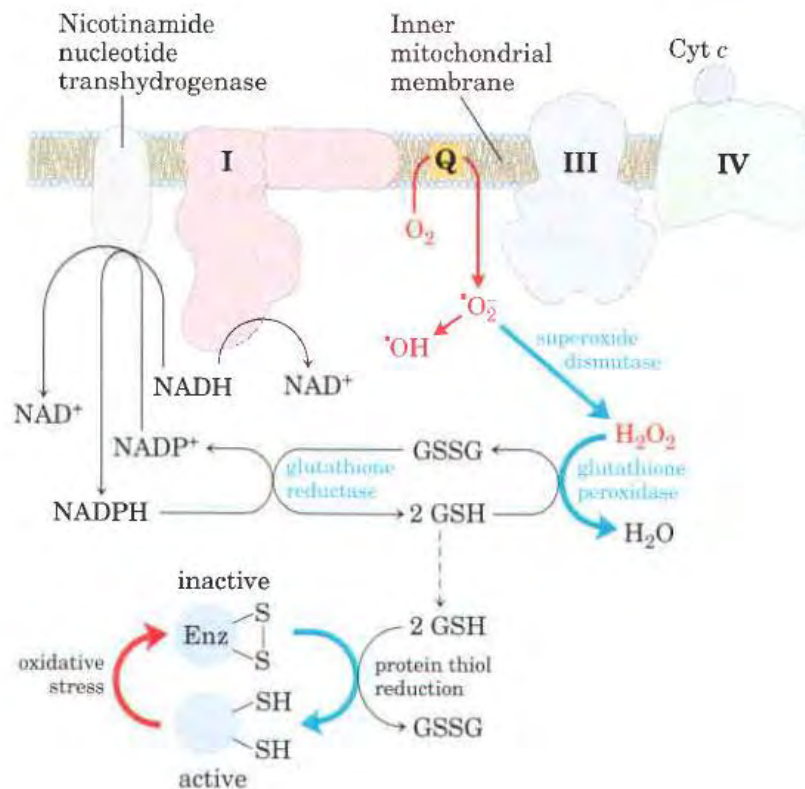


Figura 3. Formação de EROs mitocondrial e ação de enzimas antioxidantes (NELSON & COX, 2005)

Em reação ao estresse oxidativo leve, os tecidos, geralmente, respondem produzindo mais antioxidantes, porém o estresse oxidativo grave persistente promove esgotamento desses recursos. Portanto, para melhor interpretação da concentração de antioxidantes o ideal seria conhecer a quantidade de espécies reativas e o curso da doença nos organismos (REZAIE et al., 2007).

Os antioxidantes de defesa celular neutralizam a proliferação ou protegem a membrana celular da ação lesiva das espécies reativas de oxigênio, podendo ser intra ou extracelulares, enzimáticos ou não enzimáticos. Vários nutrientes da dieta são importantes para o funcionamento adequado dos sistemas antioxidantes. Entre eles destacam-se o α -tocoferol, protetor de membranas celulares, e os minerais zinco e

cobre, componentes de metaloproteínas, tais como superóxido dismutase, ceruloplasmina e metalotioneínas (ATALAY et al., 2000). Trutas arco-íris (HIDALGO et al., 2002) e trutas (*Salmo trutta*) (LÓPEZ-TORRES et al., 1993) deficientes em zinco apresentaram maior peroxidação lipídica tecidual.

Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)

Os superóxidos e hidróxidos são os principais agentes envolvidos no combate ao estresse oxidativo (NORDBERG & ARNER, 2001; KOHEN & NYSKA, 2002). Os ânions superóxidos são tóxicos aos produtos da respiração e, com meia-vida relativamente longa, podem causar vários danos oxidativos intracelulares, implicando em maior toxicidade dos compostos (BAI & CEDERBAUM, 2001). Cerca de 75 a 85% do zinco presente no sangue encontra-se no interior dos eritrócitos (UNDERWOOD, 1962) atuando, principalmente, como cofator das enzimas anidrase carbônica e superóxido dismutase (HAMBIDGE et al., 1986). A superóxido dismutase desempenha função importante na ação antioxidante (Figura 4), protegendo desta forma, a membrana eritrocitária da ação de radicais livres (O'DELL et al., 1987). Sá et al. (2004) observaram que a deficiência de zinco diminuiu a quantidade de eritrócitos, taxa de hemoglobina e porcentagem de hematócrito de tilápias-do-Nilo, inferindo que a diminuição da ação antioxidante destas enzimas zinco-dependentes gerou menor prevenção da peroxidação das membranas eritrocitárias, provocando, possivelmente, a lise destas células. Trutas arco-íris e carpas Jian deficientes em zinco apresentaram aumento do estresse oxidativo e diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase (LÓPEZ-TORRES et al., 1993; HIDALGO et al., 2002; FENG et al., 2011). Desta forma, distúrbios no crescimento e nas funções fisiológicas anormais induzidas

pela deficiência de zinco podem estar relacionados ao sistema de defesa antioxidante (SALAMUNIC'et al., 2003).

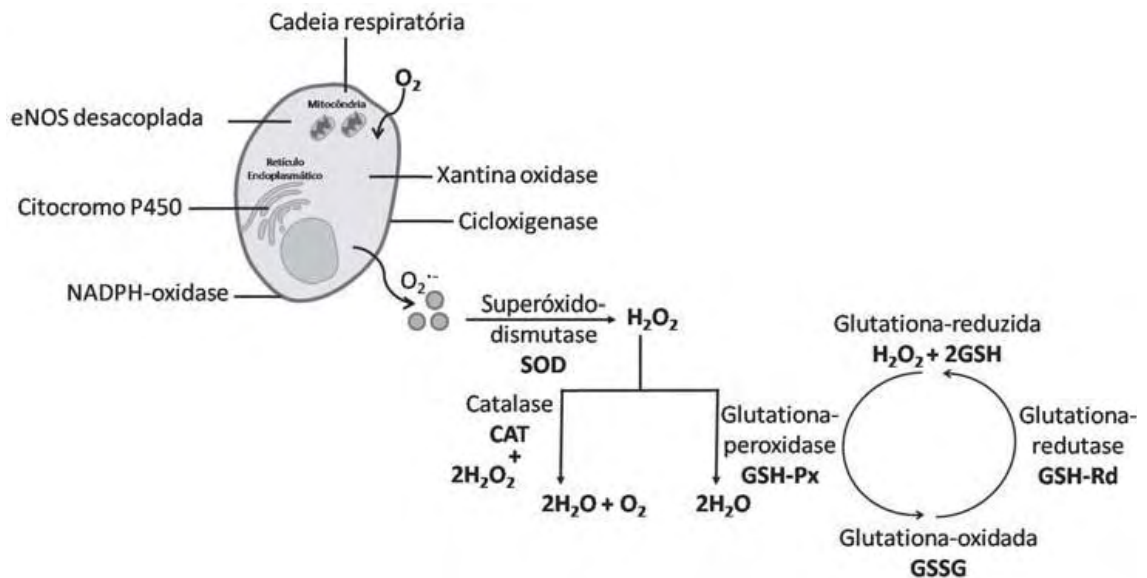


Figura 4. Ação antioxidante da superóxido dismutase. Adaptado de Fortuño et al. (2005).

Fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1)

A fosfatase alcalina é uma fosfomonohidrolase inespecífica, capaz de hidrolisar, em pH alcalino, monoésteres e diésteres de fosfato, pirofosfato, bem como catalisar reações de transfosforilação (McCOMB et al., 1979). Esta enzima é homodimérica e cada sítio catalítico contém três íons metálicos (dois íons zinco e um íon magnésio) necessários para a atividade da enzima (MILLÁN, 2006). Esta enzima é sintetizada nos ossos, fígado e intestino e, posteriormente, transportada para o sangue. Por agir como intermediária em uma série de reações na disponibilidade e/ou na retenção do zinco nos diferentes órgãos, a atividade cinética da fosfatase alcalina se tornou importante ferramenta para determinação do aporte do mineral em questão nos animais e humanos

(ROTH & KIRCHGESSNER, 1980). Dessa forma, a deficiência nutricional que promova inadequado balanço bioquímico para esse mineral, prejudicará o normal funcionamento das enzimas Zn-dependentes, afetando o equilíbrio orgânico e a saúde animal (HAMBIDGE et al., 1986; APINES-AMAR et al., 2004; WANG et al., 2002; LIAO et al., 2006), reduzindo, desta forma, os níveis de IGF-I, hormônio de crescimento e o hormônio de crescimento ligado à proteína no mRNA (ONER et al., 1984; CLEGG et al., 1995; McNALL et al., 1995).

Sistema imune de peixes

Em termos gerais o sistema imune de peixes é similar ao dos vertebrados superiores, com algumas particularidades importantes. Nos últimos anos, pesquisas sobre fisiologia, filogenia e ontogenia do sistema imune de peixes vêm aumentando, consideravelmente, dentre as espécies destinadas à produção. Contudo, esse conhecimento ainda é escasso se comparado ao dos vertebrados superiores (ENANE et al., 1993).

A resposta imune dos peixes pode ser dividida em dois tipos: resposta inata ou não específica, que consiste em impedir que os agentes patogênicos tenham acesso ao organismo hospedeiro, podendo eliminar os patógenos e bloquear sua entrada, e resposta imune específica, caracterizada pela especificidade e memória imunológica, induzida por substâncias denominadas imunógenas (BERNSTEIN et al., 1998; SHOEMAKER et al., 2007).

Segundo Bly & Clem (1994), o sistema imunitário inato ou não específico em peixes possui grande versatilidade, desempenhando papel importante na resposta imune, visto que o sistema específico responde lentamente quando comparado ao de

mamíferos, principalmente em faixas de temperatura da água abaixo da ideal para a espécie.

Igualmente às outras espécies, os peixes são suscetíveis à doenças causadas por parasitas, vírus, bactérias e fungos, sendo a sobrevivência ou a morte destes, determinados pela eficácia do sistema imune em prevenir a infecção inicial e/ou prevenir a multiplicação do agente patógeno após a infecção iniciada (BALFRY & HIGGS, 2001). Segundo Iwama & Nakanishi (1996), fatores celulares e humorais de ambos os sistemas, específico e não específico, promovem nos peixes proteção externa e interna contra agentes infecciosos. Apesar da distinção na classificação desses dois sistemas de defesa, deve-se entender que sempre que um agente patogênico ataca o organismo, este se defende mediante a interação da maioria dos elementos que compõem o sistema imune, sendo que vários fatores de cada sistema podem agir separadamente ou em combinação (FERNANDEZ et al., 2002).

Estudos com animais homeotérmicos têm sugerido relação entre a deficiência de zinco, resposta imune deficiente e suscetibilidade a doenças infecciosas, sendo que as evidências sobre o papel do zinco nesses processos ainda são obscuros. Lim et al. (1996) demonstraram que a suplementação de zinco estimulou a resposta quimiotática de macrófagos peritoniais de bagres do canal (*Ictalurus punctatus*) desafiados por *Edwardsiella ictaluri*, porém apresentou efeito inibitório sobre a fagocitose. Paripatananont & Lovell (1995) demonstraram que a suplementação de zinco aumentou a resistência do bagre do canal desafiado por *E. ictaluri*, porém Lim et al. (1996) observaram que a suplementação de zinco não influenciou a imunidade dos peixes.

Aeromonas hydrophila

O aumento da atividade aquícola nos corpos de água doce traz como consequência, o risco de epidemias causadas por bactérias patogênicas, o que tende a ser cada vez maior, já que se modifica o ambiente natural para a realização de produções semi-intensivas e intensivas de organismos aquáticos.

As doenças em peixes são importantes por limitar o desenvolvimento de sistemas aquícolas e, as bactérias, dentre os vários patógenos, provavelmente, constituem o grupo de agentes etiológicos que causam maiores prejuízos na aquicultura mundial (FRERICHS & MILLAR, 1993). Isto ocorre porque os peixes são suscetíveis às infecções bacterianas e não é possível evitar sua propagação, uma vez que estes microorganismos ocorrem naturalmente no ambiente aquático (COSTA, 1998).

As espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas* que causam problemas em peixes de água doce são: *Aeromonas hydrophila*, *A. sóbria* e *A. caviae*. Surtos causados por estas bactérias normalmente estão associados ao estresse, o qual pode ser causado por temperaturas elevadas, oscilações térmicas bruscas e grande intensidade de parasitos (PAVANELLI et al., 2002). A maioria desses microorganismos são naturalmente saprófitas, isto é, utilizam a matéria orgânica e mineral do ecossistema aquático para seu crescimento e multiplicação, além de fazer parte da microbiota da pele, brânquias e intestino dos peixes (SWANN & WHITE, 1989).

A bactéria *A. hydrophila* é bacilo gram-negativo, e móvel por meio de flagelo. É considerada aeróbia, citocromoxidase positiva, fermentadora de glicose. Cresce em meios simples e as colônias são redondas, brilhantes e de coloração creme. As colônias crescem de um a três milímetros de diâmetro a 25°C em 48 horas, podendo crescer a temperaturas de até 37°C, em período mais prolongado (ALEXANDRINO et al., 2000).

Os sinais clínicos observados em peixes infectados com *A. hydrophila* são perda de apetite, apatia, perda de equilíbrio, hemorragias ao longo do corpo, lesões epidérmicas como despigmentação, necroses da pele, úlceras com exposição da musculatura e alterações no comportamento. Por meio da necropsia observa-se órgãos friáveis e esbranquiçados, com necroses do tecido hematopoiético, como rins e baço, cavidade peritoneal com exsudado, intestino flácido com muco amarelo e sem alimento (PLUMB, 1983; AOKI, 1999). Boijink & Brandão (2001) em experimento com jundiás (*Rhamdia quelen*) inoculados por injeção intramuscular com bactéria *A. hydrophila*, observaram exoftalmia, comportamento alterado, com perda de equilíbrio e movimentos respiratórios lentos nas horas que antecederam a morte, sendo que, após a necrópsia foram observados ascite contendo fluido mucoso amarelado, coloração anormal e erosão nas nadadeiras, além de apresentarem úlceras com bordas avermelhadas no local da inoculação e brânquias e demais órgãos internos pálidos e flácidos. Garcia et al. (2007) observaram que pacus (*Piaractus mesopotamicus*) inoculados intraperitonealmente com *A. hydrophila* apresentaram aumento do número de neutrófilos e monócitos e redução de trombócitos e linfócitos sanguíneos 24 horas após a inoculação da bactéria, o que sugere a migração dessas últimas células para o foco da inflamação.

Com base no exposto, o estudo propõe avaliar o efeito do zinco sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e imunológicos que indicam saúde do animal, tanto em condições normais como quando desafiados pela bactéria *Aeromonas hydrophila*, assim como sua influência sobre o desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo.

O Capítulo 2, intitulado “**Desempenho produtivo de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas práticas suplementadas com zinco**” está apresentado de acordo com as normas para publicação na revista *Aquaculture Research*. Esta pesquisa teve por objetivo avaliar a disponibilidade e exigência de zinco para tilápia do Nilo utilizando dietas práticas extrudadas.

O Capítulo 3, intitulado “**Parâmetros imunológicos e hematológicos de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas práticas suplementadas com zinco e desafiadas com bactéria *Aeromonas hydrophila***”, está redigido de acordo com as normas para publicação na revista *Aquaculture Nutrition*. O objetivo específico deste estudo foi determinar os efeitos fisiológicos de níveis crescentes de zinco na dieta da tilápia do Nilo em condição de estresse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, E.C.B.; ALVES, S.P.; TAKASE, I. Avaliação do uso de ervas medicinais como suplemento nutricional de ferro, cobre, e zinco. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.3, p.591-596, jul./set. 2004.

ALEXANDRINO, A.C.; OKUMURA, M.P.M.; BALDASSI, L.; ARAUJO, A.P.; KURODA, C.K.; WAKASA, Y.S. Ocorrência de *Aeromonas hydrophila* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em cultivo intensivo – relato de caso. **Boletim Instituto de Pesca**, v.26, n.1, p.117-119, 2000.

AOKI, T. Motile Aeromonads (*Aeromonas hydrophila*). In: WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W. **Fish Diseases**, v.3, p.427-453, 1999.

APINES-AMAR, M.J.S.; SATOH, S.; CAIPANG, C.M.A.; KIRON, V.; WATANABE, T.; AOKI, T. Amino acid-chelate: a better source of Zn, Mn and Cu for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v.240, p.345-358, 2004.

ATALAY, M.; LAAKSONEN, D.E.; KALISTE-KORHONEN, E.; HÄNNINEN, O.; SEN, C.K. Vitamin E regulates changes in tissue antioxidants induced by fish oil and acute exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 32, n.3, p. 601-607, 2000.

AVALOS, I.; CHUNG, C.P.; OESER, A.; MILNE, G.L.; MORROW, J.D.;

GEBRETSADIK, T.; SHINTANI, A.; YU, C.; STEIN, C.M. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity and symptoms. **Lupus**, v.16, n.3, p.195-200, 2007.

BAI, J.; CEDERBAUM, A.I. Mitochondrial catalase and oxidative injury. **Biological Signals and Receptors**, 10, 189–199, 2001.

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

BARRY HALLIWELL J.G. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4.ed. New York, Oxford University Press, 2007.

BARROS, M. M. et al. Nutrição e saúde de peixes. In: **CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL**, 2., 2006, São Paulo. Palestras técnicas... São Paulo: CBNA - AMENA, p. 1-15.

BERNSTEIN, R.M.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. Immunity. In: EVANS, D.H. **The physiology of fishes**. 2ed. Boca Raton: CRC Press, 1998. p.215-242.

BLY, J.E.; CLEM, L.W. Temperature adaptation of lymphocyte function in fish. In: COSSINS, A.R. (Ed.). **Temperature adaptation of biological membranes**, London: Portland Press, 1994. p.169-184.

BOIJINK, C.L.; BRANDÃO, D.A. Inoculação bacteriana de *Aeromonas hydrophila* e a sobrevivência de juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.31, n.3, 2001.

CHIRANJIB, D.B.; KUMAR, K.P.S. A potential medicinal importance of zinc in human health and chronic disease. **International Journal of Pharmacy and Biomedical Sciences**, v.1,n.1, p.5-11, 2010.

CLEGG, M.S.; KEEN, C.L.; DONOVAN, S.M. Zinc deficiency-induced anorexia influences the distribution of serum insulin-like growth factor-binding proteins in the rat. **Metabolism**, v.44, 1495-1501, 1995.

COSTA, A.B. 1998 Ictiopatologia e manejo sanitário em piscicultura intensiva. In: **SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES**, 2., Campinas, 1998. Anais... Campinas: CBNA. p.73-96.

COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 3.ed. atual. e ampl., São Paulo: Manole, 2009, 1172p.

DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUFNER-BEATIE, J.; LANGMADE, S.J.; WANG, F.; EIDE, D.; ANDREWS, G.K.

Structure, function, and regulation of a subfamily of mouse zinc transporter genes. **The Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 278, n.50, p. 50142-50150, 2003.

DUNN, M.F. Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer-a review. **BioMetals**, Oxford, v. 18, n.4, p. 295-303, 2005.

EID, A.; GHONIM, S.I. Dietary zinc requirement of fingerling *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v.119, p.259–264, 1994.

ENANE, N.A.; FRENKEL, K.; O'CONNOR, J.M.; SQUIBB, K.S.; ZELIKOFF, J.T. Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes. **Immunology**, v.80, p.68-72, 1993.

FAA, G.; NURCHI, V.M.; RAVARINO, A.; FANNI, D.; NEMOLATO, S.; GEROSA, C.; EYKEN, P.V.; GEBOES, K. Zinc in gastrointestinal and liver disease. **Coordination Chemistry Reviews**. v.252, p.1257-1269, 2008.

FENG, L.; TAN, L.; LIU, Y.; JIANG, J.; JIANG, W.D.; HU, K.; LI, S.H., ZHOU, X.Q. Influence of dietary zinc on lipid peroxidation, protein oxidation and antioxidant defence of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Aquaculture Nutrition**, v.17, p.875-882, 2011.

FERNANDEZ, A.B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. **Revista AquaTic**, v.16, 2002.

FORMAN, H.J.; FUKUTO, J.M.; TORRES M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v.287, n.2, p. 246-256, 2004.

FORTUÑO, A.; SAN JOSÉ, G.; MORENO, M.U.; DÍEZ, J.; ZALBA, G. Oxidative stress and vascular remodelling. **Experimental Physiology**; v.90, n.4, p.457-462, 2005.

FOUNTOULAKI, E., MORGANE, H., RIGOS, G., ANTIGONI, V., MENTE, E., SWEETMAN, J., NENGAS, I. Evaluation of zinc supplementation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile diets. **Aquaculture Research**, no. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02503.x, 2010.

FRERICHS, G.N.; MILLAR, S.D. **Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens**. Stirling: Pisces Press, 1993, 60p.

GARCIA, F.; PILARSKI, F.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.271, p.39-46, 2007.

GATLIN III, D.M.; WILSON, R.P. Dietary zinc requirement of fingerling channel catfish. **Journal of Nutrition**, v.113, p.630-635, 1982.

GATLIN III, D.M.; PHILLIPS, H.F. Dietary calcium, phytate and zinc interactions in

channel catfish. **Aquaculture**, v.79, p.259-266, 1989.

GLOVER, C.N.; HOGSTRAND, C. In vivo characterisation of intestinal zinc uptake in freshwater rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**, v.205, p.141-150, 2002.

GLOVER, C. N.; BURY, N.R.; HOGSTRAND, C. Zinc uptake across the apical membrane of freshwater rainbow trout intestine is mediated by high affinity, low affinity, and histidine-facilitated pathways. **Biochemic et Biophysica Acta**, v.1614, p.211-219, 2003.

GRIFFITHS H.R. ROS as signalling molecules in T cells – evidence for abnormal redox signalling in the autoimmune disease, rheumatoid arthritis. **Redox Report**, v.10, n.6, p. 273-280, 2005.

HAASE, H. & MARET, W. Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. **Experimental Cell Research**, New York, v.291, n.2, p.289-298, 2003.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.C.M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, New York, 1999.

HAMBIDGE, K.M.; CASEY, C.E.; KREBS, N.F. Zinc. in W. Mertz. Trace elements in human and animal nutrition. Academic Press, San Diego, EUA, p.1-137, 1986.

HENRIQUES, G.S.; HIRATA, M.H.; COZZOLINO, S.M.F. Aspectos recentes da absorção e biodisponibilidade do zinco e suas correlações com a fisiologia da isoforma testicular da enzima conversora de angiotensina. **Revista de Nutrição**, v.16, p.333-345, 2003.

HIDALGO, M.C.; EXPÓSITO, A.; PALMA, J.M.; HIGUERA, M. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.34, 183–193, 2002.

HITCHON, C.A.; EL-GABALAWY, H.S. Oxidation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v.6, n.6, p. 265-78, 2004.

HORN, N.M.; THOMAS, A.L.; TOMPKINS, J.D. The effect of histidine and cystine on zinc influx into rat and human erythrocytes. **Journal of Physiology**, v.489, p.73-80, 1995.

ISLAM, M.S.; LOOTS, D.T. Diabetes, metallothionein, and zinc interactions: a review. **Biofactors**, Oxford, v.29, n.4, p.203-212, 2007.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. **The fish Immune System**. **Fish Physiology**, v.15, 1996.

JOBLING, M. **Fish bioenergetics**. London: Chapman & Hall, 1994. 307p

JONES D.P. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. **Chemico-biological Interactions**, v.163, n.1-2, p.38-53, 2006.

KOURY, J.C; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

KNOX, D.; COWEY, C.B.; ADRON, J.W. Effects of dietary zinc intake upon copper metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquaculture**, v.40, p.199-207, 1984.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicological Pathology**, 30, 620–650, 2002.

KREBS N.F. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. **The Journal of Nutrition**, v.130, n. 5, p.1374-1377, 2000.

LALL, S.P. **The minerals. In: Fish Nutrition**, 2nd edn, Vol. 1 (Halver, J.E. & Hardy, R.W. eds), pp. 219–257. Academic Press Inc., San Diego, CA. USA, 1989.

LI, B.T.; VAN KESSEL, A.G.; CAINE, W.R. HUANG, S.X.; KIRKWOOD, R.N. Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and feces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. **Canadian Journal of Animal Science**, v.81, p. 511-516, 2001.

LIANG, J.J.; YANG, H.J.; LIU, Y.J.; TIAN, L.X.; LIANG, G.Y. Dietary zinc requirement of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on growth and mineralization. **Aquaculture Nutrition**, v.18, p.380-387, 2012.

LIAO, H.J.; CHEN, Y.H.; JENG, S.S. Association of zinc with connective tissue in the digestive tract of common carp. **Fisheries Science**, v.72, p.893-902, 2006.

LIM, C.; KLESIUS, P.H.; DUNCAN, P.L. immune response and resistance of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri* challenge when fed various dietary levels of zinc methionine and zinc sulfate. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.08, p.302-307, 1996.

LO, G.S.; SETTLE, S.L.; STEINKE, F.H. HOPKINS, D.T. Effect of phytate: zinc molar ratio and isolated soybean protein on zinc bioavailability. **Journal of Nutrition**, v.111, p.2223-2235, 1981.

LÓPEZ-TORRES, M.; PÉREZ-CAMPOS, R.; CADENAS, S.; C. ROJAS, C.; BARJA, G. A comparative study of free radicals in vertebrates-II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress, **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.105, 757– 763, 1993.

LOVELL, T. **Nutrition and feeding of fish**. 2. ed. Norwell: Kluwer Academic, 1998. 267 p.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S.M.F. Importância do zinco na nutrição humana. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n.1, p.79-87, 2004.

MAAGE, A.; JULSHAMN, K. Assessment of zinc status in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) by measurement of whole body and tissue levels of zinc. **Aquaculture**, v.117, p. 179-191, 1993.

McCALL, K. A.; HUANG, C.; FIERKE, C. A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1437-1446, 2000.

McCOMB, R.B., BOWERS, G.N. & POSEN, S. **Alkaline phosphatase**. New York: Plenum Press, 986p, 1979.

McDOWELL. L.R. **Vitamins in animal nutrition: comparative aspects to human nutrition**. New York: Academic, 1989. 486 p.

McNALL, A.D.; ETHERTON, T.D., FOSMIRE, G.J. The impaired growth induced by zinc deficiency in rats is associated with decreased expression of the hepatic insulin-like growth factor I and growth hormone receptor genes. **Journal Nutrition**, v.125, p.874-879, 1995.

MILLÁN, J.L. **Mammalian alkaline phosphatases: from biology to applications in Medicine and Biotechnology**. Wiley – VCH Verlag GmbH & Co KGaA, 2006.

MOCCHEGIANI, E.; GIACCONI, R.; MALAVOLTA, M. Zinc signaling and subcellular distribution: emerging targets in type 2 diabetes. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v.14, n.10, p.419-428, 2008.

NELSON, D.L. & COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4a. Ed.; W.H. Freeman and Company, New York, USA, 2005.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, p.1287–1312, 2001.

OBERLEAS, D.; PRASAD, A.S. Growth as affected by zinc and protein nutrition. **Animal Journal Clinical Nutrition**, v.22, p.1304-1314, 1969.

O'DELL, B.L.; BROWNING, J.D.; REEVES, P.G. Zinc deficiency increases the osmotic fragility of rat erythrocytes. **Journal of Nutrition**, v.117, p.1883–1889, 1987.

OGINO, C. & YANG, G.Y. Requirement of rainbow trout for dietary zinc. **Bulletin of the Japanese Society Science of Fish**, v.44, p.1015–1018, 1978.

OGINO, C.; YANG, G.Y. Requirement of carp for dietary zinc. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v.45, p.967–969, 1979.

OKTYABRSKY, O.N.; SMIRNOVA, G.V. Redox regulation of cellular functions. **Biochemistry**, v.72, n.2, p.132-145, 2007.

ONER, G.; BHAUMICK, B.; BALA, R.M. Effect of zinc deficiency on serum somatomedin levels and skeletal growth in young rats. **Endocrinology**, v.114, p.1860-1863, 1984.

PARIPATANANONT, T.; LOVELL, R.T. Chelated zinc reduces the dietary zinc requirement of channel catfish, *Ictalurus pinctatiis*. **Aquaculture**, v.133. p.73, 1995.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, manejo e tratamento**, 2.ed. Maringá: EDUEM, 2002. 246p.

PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; FRACALOSSO, D.M.; CYRINO, J.E.P. Nutrição de Peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p.74-169.

PICKERING, A.D. Introduction: the concept of biological stress. In: PICKERING, A.D. **Stress and fish**. London: Academic Press, 1981. p.1-9.

PLUMB, J.A.; BOWSER, P.R. **Microbial fish disease laboratory manual**. Alabama: Auburn University, Alabama Agriculture Experiment Station, 1983. 95p.

POWELL, J.J. The antioxidant properties of zinc. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1447-1545, 2000.

REZAIE, A.; PARKER, R. D.; ABDOLLAHI, M. Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause? **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 9, p. 2015-2021, 2007.

ROSA R.M.; ROEHRS R.; SAFFI J.; HENRIQUES J.A.P. O papel da reparação de lesões oxidativas induzidas no DNA na redução do risco de desenvolvimento de câncer. In: SALVADOR, M., HENRIQUES, J.A.P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: Editora da Ulbra, 2004.

ROTH, H.P.; KIRCHGESSNER, M. Zn metalloenzyme activities. **Revista Nutrition Diet**, v.34, p.144-160, 1980.

SÁ, M.V.C.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; PADILHA, P.M. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. **Aquaculture**, v.238, p.385-401, 2004.

SÁ, M.V.C; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; PADILHA, P.M. Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v.11, p.273-281, 2005.

SALAMUNIC', I.; JURETIC', D.; LIUTIC', D. Effect of different dialysis membranes

on erythrocyte antioxidant enzyme levels and scavenger systems related to free hemoglobin in serum of hemodialysis patients. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.41, p.904–907, 2003.

SALGUEIRO, M. J. et al. Zinc as an essential micronutrient: a review. **Nutrition Research**, v. 20, n. 5, p. 737-755, 2000.

SANDSTRÖM, B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. **British Journal of Nutrition**, v.85, p. 181-185, sup.2, 2001.

SATOH, S.; TABATA, K.; ISUME, K. et al. Effect of dietary tri-calcium phosphate on availability of zinc to rainbow trout. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v.53, p.1199-1205, 1987.

SEVE, M.; CHIMIENTI, F.; SÉVERINE, D.; FAVIER, A. In silico identification and expression of SLC30 family genes: Na expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters tissue expression. **BMC Genomics**, London, v. 5, n.1, p.32, 2004.

SHOEMAKER, C.; KLESIOUS, P.; LIM, C. Immunity in Fish. In: **II Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes**, 2007, Botucatu. II Simpósio Internacional de Nutrição e Saúde de Peixes, 2007.

SIES H., **Oxidative Stress: Introductory remarks**. v.1. London, Academic Press, 1985.

p. 1-8.

SPINELLI, J.; HOULE, C.R.; WEKELL, J.C. Effect of phytates on the growth of rainbow trout fed purified diets containing varying quantities of calcium and magnesium. **Aquaculture**, v.30, p. 71-83, 1983.

SURH Y.J. **Oxidative Stress, Inflammation, and Health**. Packer L. Londres: Taylor & Francis, 2005.

SWANN, L.; WHITE, D.V.M. Diagnosis and treatment of *Aeromonas hydrophila* infection of fish. In: **A Guide to Approved Chemical in Fish Production and Fishery Resource Management**, University of Arkansas Cooperative Extension Service, 1989.

TAN, L.N.; FENG, L.; LIU, Y.; JIANG, J.; JIANG, W.D.; HU, K.; LI, S.H.; ZHOU, X.Q. Growth, body composition and intestinal enzyme activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) fed graded levels of dietary zinc. **Aquaculture Nutrition**, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2095.2010.00793.x.

THOMPSON, L. U. Antinutrients and blood glucose. **Food Technology**, v.42, p.123–132,1988.

TORRECILLAS, S.; CABALLERO, M.J.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; SWEETMAN, J.; OTRT, L.; IZQUIERDO, M.S. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan

oligosaccharides. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 5, p. 969-981, 2007.

UNDERWOOD, E.J. **Trace Elements in Human and Animal Nutrition**, 2nd ed. Academic Press, New York, 1962.

VALLEE, B.L.; FALCHUK KH. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiology Research**, v.73, p.79–118, 1993.

WANG, M.S.; CHUANG, P.C.; SUN, L.T.; JENG, S.S. Localization of Zn-binding protein in the digestive tract tissue of common carp. **Fisheries Science**, v.68, p.484-493, 2002.

WEBSTER, C. Minerals and fish health. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 2., 2007, Botucatu, SP. 2º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes (Anais) Botucatu: **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade Estadual Paulista, 2007. p. 21-34.

WEDEMEYER, G. Stress induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.29, p.1247-1251, 1969.

ZHAO, H.X., CAO, J.M., LIU, X.H., ZHU, X, CHEN, S.C., LAN, H.B., WANG, A.L. Effect supplemental dietary zinc sources on the growth and carbohydrate utilization of tilapia Smith 1840, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. **Aquaculture**

Nutrition, no. doi: 10.1111/j.1365-2095.2009.00707.x, 2009.

CAPÍTULO II

Absorção de minerais e desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas práticas suplementadas com zinco

Resumo - O presente trabalho compõe-se de dois estudos. No primeiro, avaliou-se os efeitos da suplementação de zinco (0, 20, 40, 80, 160 e 320 mg kg⁻¹) na absorção de zinco (Zn), cobre, ferro e manganês de 60 peixes. No segundo estudo, foram avaliados os efeitos do zinco nos parâmetros produtivos de tilápias-do-Nilo. Foram utilizados 288 peixes, com peso de 7,67 ± 0,23 g, distribuídos ao acaso em 36 aquários de 250 L e alimentados com dietas práticas contendo níveis crescentes de zinco suplementar. A fonte de zinco utilizada foi o sulfato de zinco monohidratado. Ao final de 130 dias experimentais, foram avaliados ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, taxa de retenção proteica, sobrevivência, atividade da fosfatase alcalina, retenção de zinco nos ossos e carcaça. A suplementação de Zn não influenciou a absorção de ferro. O excesso de zinco suplementar prejudicou a absorção de cobre pelo epitélio intestinal dos peixes. A absorção de manganês foi prejudicada quando os animais foram alimentados com dietas suplementadas com 320 mg Zn kg⁻¹. A concentração de zinco na carcaça e atividade da fosfatase alcalina responderam positivamente ao aumento de nível de suplementação dietética de zinco. As análises de regressão segmentada demonstraram que maior ganho de peso, retenção proteica e melhor conversão alimentar dos peixes foram estimados em 59,84; 80,00 e 82,62 mg Zn kg⁻¹ da dieta, respectivamente. Com base na retenção óssea de zinco, a exigência deste mineral em dietas práticas para juvenis de tilápia-do-Nilo é de 82,71 mg kg⁻¹.

Palavras chave: absorção, *Oreochromis niloticus*, sulfato de zinco monohidratado

Growth performance of Nile tilapia fed practical diets containing levels of zinc

Abstract – This study was divided in two trials. *First*: the trial evaluated the effects of zinc supplementation (0, 20, 40, 80, 160, 320 mg kg⁻¹ diet) on zinc (Zn), copper (Cu), iron (Fe) and manganese (Mn) availability. *Second*: a 130-day feeding trial was undertaken to evaluate the effect of zinc on growth performance of Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*). 288 Nile tilapia fingerlings with 7.67 ± 0.23 g weight (mean±SD) were randomly stocked into 36 250 L-aquaria and fed practical diets containing graded levels of zinc. Zinc source was zinc sulfate monohydrate (ZnSO₄.H₂O). Excess of zinc supplement has damaged the absorption of copper by intestinal epithelium. The absorption of manganese was injured when the animals were fed diets supplemented with 320 mg Zn kg⁻¹. Concentration of zinc in carcass and alkaline phosphatase activity increased with the increasing zinc levels. At the end of the experimental period fish were weighed to evaluate weight gain, feed intake, feed conversion ratio, protein retention, survival, alkaline phosphatase activity and zinc tissues saturation. The broken-line analysis showed that the greater weight gain, protein retention and better feed of fish were estimated at 59.84, 80.00 and 82.62 mg Zn kg⁻¹, respectively. Based on bone absorption of zinc, the requirement of this mineral in practical diets for juvenile of Nile tilapia is 82.71 mg kg⁻¹.

Key words: absorption, *Oreochromis niloticus*, zinc sulfate monohydrate

Introdução

A tilápia-do-Nilo pertence à classe dos ciclídios africanos e tem sido utilizada em pisciculturas por possuir características como rusticidade, resistência ao manejo, adaptação a vários tipos de climas e ótima aceitação no mercado, sendo, por esta razão, uma das espécies mais cultivadas no Brasil. Em virtude da importância da tilápia para a aquicultura, muitos aspectos de sua nutrição são estudados (Boscolo, Signor, Feiden, Bombardelli, Signor & Reidel 2005).

Os minerais são nutrientes essenciais à vida, e apesar de serem exigidos em pequenas quantidades, são necessários para o metabolismo e homeostase dos organismos (Nelson & Cox 2005). O zinco participa de várias funções específicas, tendo importância estrutural e/ou funcional em mais de 300 enzimas e proteínas (Vallee & Falchuk 1993), denominadas metaloenzimas de zinco. Enzimas como anidrase carbônica, fosfatase alcalina, carboxipeptidase, álcool desidrogenase, superóxido dismutase, collagenase e RNA-polimerase, são exemplos de enzimas que possuem o zinco como componente estrutural. Assim, o nível orgânico inadequado causado pela deficiência de zinco prejudica todo o funcionamento destas enzimas, o equilíbrio orgânico e, conseqüentemente, a saúde do animal (Hambidge, Casey & Krebs 1986), podendo causar prejuízos ao crescimento, reprodução, visão e sistema imune (Watanabe, Kiron & Satoh 1997).

A absorção do zinco pode ser afetada pelo tipo da dieta, fonte proteica e forma química do elemento, nível de ingestão de mineral, inter-relações com outros minerais, tipo e teor de fibra da dieta e complexação com ligantes positivos e negativos (Sá, Pezzato, Barros & Padilha 2005). A exigência de peixes por zinco em dietas práticas é

maior quando comparada com dietas purificadas (Gatlin III & Wilson 1984, Satoh et al. 1987). Desta forma, quando os peixes são alimentados com dietas purificadas, apresentam exigência em zinco de 15 a 70 mg kg⁻¹ (Ogino & Yang 1978, Gatlin III & Wilson 1983, Maage & Julshamn 1993, NRC 2011). Dietas de salmões produzidos comercialmente, normalmente, são suplementadas com 80 a 119 mg Zn kg⁻¹ (Tacon & De Silva 1983).

A fosfatase alcalina é importante metaloenzima que possui como elemento constituinte o zinco (Hambidge et al. 1986). A atividade desta enzima e as concentrações de zinco corporal e plasmática aumentaram em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com dietas suplementadas com zinco (Kucukbay, Yazlak, Sahin, Tuzcu, Cakmake, Gurdogan, Juturu & Sahin 2006).

Com base no exposto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da suplementação de zinco em dietas práticas na absorção de minerais bivalentes, crescimento, concentração do zinco em tecidos e atividade da fosfatase alcalina em juvenis de tilápia-do-Nilo.

Material e Métodos

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Câmpus de Botucatu.

Dietas Experimentais

Foram avaliadas dietas práticas suplementadas com níveis crescentes de zinco.

Considerando-se que a fonte inorgânica utilizada, sulfato de zinco monohidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), possui em sua composição 37,4% de zinco (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), as dietas que constituíram os tratamentos foram:

0Zn (controle) = dieta ausente da suplementação de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;

20Zn = dieta suplementada com 53,48 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kg^{-1} da dieta;

40Zn = dieta suplementada com 106,95 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kg^{-1} da dieta;

80Zn = dieta suplementada com 213,90 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kg^{-1} da dieta;

160Zn = dieta suplementada com 427,81 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kg^{-1} da dieta;

320Zn = dieta suplementada com 855,61 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kg^{-1} da dieta.

As dietas foram balanceadas de acordo com os valores de proteína e aminoácidos digestíveis das matérias primas determinados por Furuya, Pezzato, Pezzato, Barros & Miranda (2001) e Guimarães, Pezzato & Barros (2008), sendo os demais valores utilizados de acordo com os coeficientes de digestibilidade da energia e nutrientes dos alimentos determinados por Pezzato, Miranda & Barros (2002). O suplemento vitamínico-mineral não apresentava zinco na sua composição (Tabela 1).

As dietas foram elaboradas, e após moagem e homogeneização dos ingredientes, a mistura foi processada em extrusora de rosca e desidratada em estufa de ventilação forçada a 55°C, durante 12h. Os peixes foram adaptados às dietas experimentais durante 15 dias. Posteriormente, foram pesados e alimentados quatro vezes ao dia, até saciedade aparente, nos horários de 8h30min, 11h30min, 14h30min e 17h30min.

Determinação dos coeficientes de absorção aparente de minerais

Para determinar os coeficientes de absorção aparente (CAA) dos minerais zinco (Zn), cobre (Cu), ferro (Fe) e manganês (Mn), às rações experimentais foram acrescentadas

de 0,10 % de óxido de cromo-III (Cr_2O_3). Foram utilizados 60 peixes com peso médio de $101,3 \pm 1,5$ g distribuídos em seis tratamentos (n=10) para coleta de fezes, por meio da metodologia descrita por Pezzato et al. (2002).

Os peixes foram distribuídos em seis tanques-rede (200 L), alocados em aquários circulares de 250 L com sistema de recirculação de água e temperatura controlada (26°C). Os peixes receberam ração até a saciedade aparente durante o período das 8 às 17h, com maior frequência durante o período vespertino. Às 18h os peixes foram transferidos para os aquários de digestibilidade (300 L), com o terço inferior em formato cônico para coleta das fezes. Os aquários de digestibilidade eram providos de sistema individual de aeração e controle de temperatura. Os peixes permaneceram nos aquários de digestibilidade até a manhã do dia seguinte, quando retornaram aos tanques de alimentação, para novo ciclo de coleta.

As fezes foram coletadas diariamente e armazenadas a -20°C . Após serem moídas e homogeneizadas, foram determinadas as concentrações dos minerais nas rações e fezes por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS), no Laboratório de Química do Instituto de Biociências de Botucatu, de acordo com Bremer-Neto, Graner & Pezzato (2005).

Os coeficientes de absorção aparente dos minerais (CAA) foram calculados com base nos teores de óxido de cromo e dos minerais das rações e fezes (Cho & Kaushik, 1990), de acordo com a seguinte equação:

$$CAA (\%) = 100 - [100 * (\%Cr_2O_3 \text{ dieta} / \%Cr_2O_3 \text{ fezes}) * (\%nutriente \text{ fezes} / \%nutriente \text{ dieta})]$$

Desempenho Produtivo

Foram utilizados 288 alevinos de tilápia-do-Nilo, masculinizados, com peso médio inicial de $7,67 \pm 0,23$ g distribuídos em 36 aquários de 250 L (n=8). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Cada aquário foi dotado de sistema recirculação e filtragem de água por meio de biofiltro e sistema de aquecimento, controlado por termostato mantendo temperatura de conforto para a espécie (25°C).

Diariamente foi medida a temperatura da água e, semanalmente, o pH, o teor de oxigênio dissolvido, saturação de oxigênio dissolvido, sólidos totais dissolvidos e a amônia total utilizando-se sonda YSI 556[®]. Os valores médios observados para esses parâmetros foram: $24,8 \pm 0,8$ °C; $7,0 \pm 0,2$; $5,0 \pm 0,4$ mg L⁻¹; 61 ± 5 %; $0,15 \pm 0,6$ g L⁻¹; $0,25 \pm 0,07$, respectivamente, demonstrando que estão dentro do conforto para a espécie estudada (Boyd 1992). Os aquários foram sifonados, semanalmente, para manutenção da qualidade da água.

Após o período experimental de 130 dias, foram avaliados os índices de desempenho produtivo :

- ganho de peso (GP) = (peso final – peso inicial) (g);
- consumo de ração (CR) = (ração fornecida / peixe) (g);
- conversão alimentar = (consumo de ração / ganho em peso) (g g⁻¹);
- taxa de retenção proteica = $\{[(\text{PB\% da carcaça final na matéria natural} * \text{peso final}) - (\text{PB\% da carcaça inicial na matéria natural} * \text{peso inicial})] / \text{proteína consumida}\} * 100$ (%);
- taxa de sobrevivência = $[(\text{n}^\circ \text{ de peixes vivos} / \text{n}^\circ \text{ de peixes mortos}) * 100$ (%).

Fosfatase Alcalina

Após as pesagens para determinação do desempenho produtivo, seis peixes por tratamento foram anestesiados (benzocaína, 1g em 10 L de água) e, após completa sedação, foi realizada a coleta de sangue por punção do vaso caudal com seringa de 1,0 mL. Após a coleta, o sangue foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 5000rpm por 15 min para obtenção do soro. A atividade cinética da fosfatase alcalina foi mensurada utilizando-se kit de determinação por método cinético de tempo fixo (Labtest®). O método baseia-se na hidrólise da timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína, que apresenta cor azul em meio alcalino. A cor formada, que é diretamente proporcional à atividade enzimática, a qual foi medida a 590 nm. Essa análise foi feita no Laboratório de Bioprocessos, do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu.

Determinação de zinco nos ossos

Os peixes foram colocados em solução anestésica (benzocaína, 1g em 10 L de água) até completa dessensibilização e óbito. Depois foram coletadas as colunas vertebrais de seis peixes por tratamento. As colunas foram autoclavadas para melhor remoção de músculos. As vértebras ficaram imersas em éter de petróleo por 24 horas, e em seguida, submersas em solução de ácido clorídrico (5%, m/v) por duas horas, e secas por 24 horas a 55°C em estufa de ar forçado. Posteriormente, as amostras foram moídas e armazenadas a -20°C até serem analisadas, segundo AOAC (1995). Para a determinação da concentração de zinco nos ossos foi feita digestão nítrico/perclórica e, posteriormente, a quantificação foi feita por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS).

Determinação de zinco na carcaça

Seis peixes por tratamento foram anestesiados (benzocaína, 1g em 10 L de água) e, após o óbito os animais foram congelados e, posteriormente, moídos, secos e armazenados a -20°C até serem analisados. Para a determinação da concentração de zinco nas carcaças foi feita digestão nítrico/perclórica e, posteriormente, a quantificação foi feita por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS).

Análises químico-bromatológicas

O conteúdo de proteína bruta, matéria seca, extrato etéreo e cinzas das dietas e carcaças foram determinados de acordo com os protocolos da AOAC (1995).

Análises estatísticas

As análises foram feitas utilizando-se o pacote estatístico Minitab[®] 16.1.0 (Minitab Inc. 2010). Os dados de coeficiente de absorção de minerais (Zn, Fe, Cu e Mn), ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, taxa de retenção proteica, atividade da fosfatase alcalina, concentração de zinco nos ossos e carcaça foram submetidos à técnica de análise de variância para o modelo com um fator ($p < 0,05$) e complementado pelo teste de comparações múltiplas de Fisher. Não foram feitas análises de regressão nos casos em que o modelo não foi significativo ou o ajuste mostrou a impossibilidade de obtenção de resultados biológicos adequados ($R^2 < 0,70$). Os dados de sobrevivência foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, e complementados com o teste de comparações de Mann-Whitney. Os efeitos dos níveis de Zn no coeficiente de absorção de minerais, ganho de peso, conversão alimentar, taxa de retenção de proteína e concentração de zinco nos ossos foram

analisados pelo modelo de regressão segmentada “broken-line” (Portz, Dias & Cyrino 2000), utilizando-se o pacote estatístico SAS[®] (SAS 2004).

Resultados

Os resultados de coeficientes de absorção aparente de zinco (CAA_{Zn}), ferro (CAA_{Fe}), cobre (CAA_{Cu}) e manganês (CAA_{Mn}) de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas isenta e suplementadas com zinco estão apresentados na Tabela 2. O maior CAA_{Zn} ocorreu nos peixes alimentados com dieta isenta de suplementação. A suplementação dietética de zinco acima de 40 mg kg^{-1} diminuiu o CAA_{Cu} dos peixes. Os peixes apresentaram menor CAA_{Mn} quando alimentados com dietas isenta e suplementada com $320 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ da dieta. O CAA_{Fe} não foi influenciado pela suplementação de zinco. Com base na regressão segmentada, o ponto em que ocorre mudança no comportamento de absorção de zinco foi de $36,29 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ da dieta (Figura 1).

Na Tabela 3 estão apresentados os valores médios de ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), taxa de retenção proteica (TRP) e atividade da fosfatase alcalina (FA) e as medianas de taxa de sobrevivência (SOB) dos peixes alimentados com as dietas experimentais por 130 dias. O menor nível de suplementação de Zn que determinou maior TRP e melhor CA foi de 80 mg Zn kg^{-1} . Os pontos de quebra derivados do modelo de regressão segmentada foram de 59,84; 82,62 e $80,00 \text{ mg Zn kg}^{-1}$, para GP, CA e TRP, respectivamente (Figuras 2, 3 e 4). O consumo de ração e a sobrevivência dos animais não foram afetados pela suplementação de zinco. A atividade da enzima fosfatase alcalina foi maior em animais arraçoados com dietas

suplementadas com 320 mg Zn kg⁻¹ (Tabela 3).

Observou-se maior concentração de zinco na nos ossos e nas carcaça de peixes ($p < 0,001$) alimentados com dieta suplementada com 320 mg kg⁻¹ (Tabelas 3 e 4). Estimando-se a suplementação dietética ótima de zinco, para juvenis de tilápia-do-Nilo, por meio da regressão segmentada, obteve-se o valor de 82,71 mg Zn kg⁻¹ (Figura 5). Os teores de proteína bruta, extrato etéreo e cinzas não foram influenciados pela crescente suplementação dietética de zinco (Tabela 4).

Discussão

A absorção de zinco pelos enterócitos intestinais ocorre por meio de dois mecanismos de transporte: processo mediado por transportadores e por difusão simples, que varia conforme a concentração desse mineral presente na dieta. O mecanismo mediado por carreador predomina em situação de baixa concentração de zinco na dieta, enquanto que a absorção por difusão simples é predominante quando a concentração desse mineral é elevada (Cousins & McMahon 2000).

Após absorção pelas células epiteliais, o zinco liga-se às metalotioneínas, proteínas responsáveis pela regulação homeostática de sua absorção. A expressão gênica dessas proteínas é estimulada por hormônios e pela alta ingestão alimentar de zinco. Quando o organismo apresenta elevada concentração de zinco, as metalotioneínas ligam-se ao mineral, e em seguida, é excretado nas fezes, juntamente com as células intestinais descamadas (Hempe & Cousins 1992).

Neste estudo, os resultados de coeficiente de absorção de zinco, sugerem que os peixes alimentados com dietas isenta zinco e suplementadas com 20 e 40 mg kg⁻¹, apresentavam maior necessidade do mineral. O zinco presente em fontes inorgânicas

está mais disponível ao organismo que o zinco de fontes vegetais, sendo que os de fontes inorgânicas também não apresentam 100% de biodisponibilidade (Lo, Settle, Steinke & Hopkins 1981). O zinco proveniente dos ingredientes da dieta ($46,53 \text{ mg kg}^{-1}$), na sua totalidade de origem vegetal, provavelmente estava complexado ao ácido fítico, diminuindo assim, sua absorção pelo intestino (O'Dell, Yohe & Savage 1964). A análise de regressão segmentada determinou o ponto de quebra em $36,29 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ de suplementação dietética, indicando que a partir deste ponto a absorção do mineral pelo organismo ficou mais lenta, em relação à inclusão de zinco na dieta. Apresentando, desta forma, relação inversa à suplementação dietética do mineral. Os animais alimentados com dieta suplementada com $320 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ apresentaram queda de 50% na absorção. Dessa forma, supõe-se que a absorção de zinco depende dos estoques corporais, sendo menor se houver quantidades razoáveis no organismo, e maior nas deficiências (Krebs, 2000).

As interações entre minerais podem ser diretas quando estes competem pelo mesmo sítio de absorção, possuem propriedades físicas e químicas semelhantes e, portanto, o excesso de um prejudica a utilização do outro. A interação indireta ocorre quando o mineral depende de outro para estar em sua forma ativa, causando prejuízo ao organismo por perda de funções essenciais à homeostase (Couzy, Gershwin & Mareschi 1993).

A absorção de Fe não foi alterada pelos níveis de inclusão de Zn, sendo possível inferir que a quantidade máxima de suplementação de zinco não suprimiu a capacidade absorptiva do organismo por ferro. Notou-se, que a absorção de Cu diminuiu em 50% em tilápias alimentadas com dietas suplementadas com níveis acima de 40 mg Zn kg^{-1} . A absorção de Mn também foi prejudicada quando os animais foram alimentados com

dietas suplementadas com 320 mg Zn kg⁻¹. A absorção do Zn e Cu é regulada via hepática pela metalotioneína, que mantém a homeostasia desses minerais. No trato gastrointestinal, em ingestões elevadas de Zn, essa proteína apresenta menor afinidade pelo Cu, prejudicando, desta maneira, o transporte do Cu à corrente sanguínea (Cousins 1985). Desta forma, é possível sugerir que, por disputarem o mesmo sítio de absorção intestinal, o excesso de zinco suplementar prejudica a absorção de cátions bivalentes.

O zinco é micromineral essencial importante para o metabolismo e crescimento animal, pois desempenha funções estruturais, enzimáticas e reguladoras (Cousins; Luizzi & Lichten 2006, Sekler, Sensi & Hershinkel 2007). A diversidade das características físico-químicas do zinco constitui a base de sua extensa participação no metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Tudor, Zalewski & Ratnaik 2005). Neste estudo, o ganho de peso foi similar ao observado em outro estudo realizado mesmo laboratório com a mesma espécie de peixe (Sá, Pezzato, Barros & Padilha 2004), indicando que baixas doses de zinco dietético reduzem o crescimento de juvenis de tilápia-do-Nilo.

Os peixes deficientes em Zn apresentaram pior conversão alimentar e menor retenção proteica, porém, sem redução do consumo de ração. Resultados semelhantes foram observados em estudos com lebiste (*Poecilia reticulata*), carpa comum (*Cyprinus carpio*) e bagre amarelo (*Pelteobagrus fulvidraco*) indicando que o zinco é essencial a algumas espécies de peixes (Jeng & Sun 1981, Shim & Lee 1993, Luo, Tan, Zheng, Chen & Liu 2011). Já, Gatlin III & Wilson (1984) e Maage & Julshamn (1993) não observaram efeito da suplementação de zinco em dietas para o salmão do Atlântico e bagre do canal, respectivamente. Níveis de suplementação de zinco acima da exigência não influenciaram o crescimento e a sobrevivência dos peixes, corroborando resultados

observados em estudos com turbot (*Scophthalmus maximus*) (Overnell, Fletcher & McIntoch 1988), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Kjoss, Wood & McDonald 2006) e bagre amarelo (Luo et al. 2011).

Assim, como observado por Sá et al. (2004), a concentração de zinco na carcaça respondeu significativamente ao aumento do nível de suplementação dietética de zinco. O mesmo foi verificado por Maage & Julsham (1993), com juvenis de salmão do Atlântico. Neste estudo não foi observada influência da suplementação de zinco na concentração de proteína bruta, extrato etéreo e cinzas. Ao contrário de Luo et al. (2011), que observaram influência do zinco suplementar sobre a concentração de cobre na carcaça de bagre amarelo, neste estudo a suplementação de zinco não causou diferença de concentração do mineral nos peixes.

O zinco é elemento constituinte da enzima fosfatase alcalina, sintetizada nos ossos, fígado e intestino e, posteriormente, liberada na corrente sanguínea (Kaplan 1972, Hambidge et al. 1986). Essa enzima promove a mineralização óssea (Yamaguchi 1998), sendo sua atividade considerada indicador sensível da reserva corporal de zinco em animais (Swinkels, Kornegay, Zhou, Lindermann, Webb & Verstegen 1996).

A atividade da fosfatase alcalina respondeu significativamente ao aumento do nível de suplementação dietética de zinco. Estes resultados corroboram os observados para juvenis de abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) (Tan & Mai 2001) e alevinos de truta arco-íris (Apines, Satoh, Kiron, Watanabe, Nasu & Fujita 2001). Em bagres do canal, a atividade dessa enzima foi maior em animais alimentados com dieta suplementada com zinco (Gatlin III & Wilson 1983). Portanto, é possível inferir que a deficiência de zinco afeta a estabilidade da fosfatase alcalina, resultando na inativação da enzima e prejuízo à higidez dos peixes.

O zinco é importante na síntese, armazenamento e secreção de hormônios. É constituinte da metaloenzima anidrase carbônica e atua no equilíbrio ácido-base do organismo e na calcificação óssea (Leeson & Summers, 2001). Os tecidos muscular e ósseo são as principais reservas desse mineral e possuem capacidade de liberar possíveis excedentes em condições de deficiência na dieta, estando diretamente associado ao desenvolvimento do tecido ósseo, crescimento e ganho de peso (Underwood, 1999).

Uma vez que os ossos estejam saturados em zinco, todos os processos fisiológicos zinco-dependentes do organismo, já foram supridos pelo mineral para seu normal funcionamento (Gatlin III & Wilson 1984). Neste estudo o valor estimado para concentração de zinco óssea foi de 82,71 mg kg⁻¹ da dieta. O valor estimado está próximo aos 79,51 mg Zn kg⁻¹ apontados por Sá et al. (2004), como suplementação ótima em dietas vegetais para juvenis de tilápia-do-Nilo e abaixo dos 150 mg kg⁻¹, apontados por Gatlin III & Wilson (1984), como sendo o nível ótimo para o bagre do canal. Desta forma, a concentração de zinco nos ossos é o critério mais adequado para avaliação da reserva do mineral no organismo.

O zinco dietético influencia a absorção de cobre, o ganho de peso e a atividade da fosfatase alcalina em juvenis de tilápia-do-Nilo, e com base na retenção óssea, a exigência deste mineral em dietas práticas é de 82,71 mg kg⁻¹.

Referências

- Apines M.J., Satoh S., Kiron V., Watanabe T., Nasu N. & Fujita S. (2001) Bioavailability of amino acids chelated and glass embedded zinc to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fingerlings. *Aquaculture Nutrition* 7, 221-228.
- AOAC (1995) *Official Methods of Analysis*. 16 ed. Arlington: Association of Official

Analytical Chemists.

Boyd C.E. (1992) Water quality in pond soil analysis for Aquaculture. Shrimp Mart, Songkhla, Thailand, 188p.

Boscolo W.R., Signor A., Feiden A., Bombardelli R.A., Signor A.A. & Reidel A. (2005) Energia digestível para larvas de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticu*) na fase de reversão sexual. *Revista Brasileira de Zootecnia* **34**, 1813-1818.

Bremer-Neto H., Graner C.A.F. & Pezzato L.E. (2005) The spectrophotometric method on the routine of 1,5- diphenylcarbazide was adjusted on chromium determination in feces, alter its utilization as a biological marker as chromium (III) oxide. *Ciência Rural* **25**, 691-697.

Cho C.Y. & Kaushik S.J. (1990) Nutritional energetics in fish: energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World Review Nutrition Diet* **61**, 132-172.

Cousins, R.J. (1985) Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiological Review* **65**, 238-309.

Cousins R.J., McMahon R.J. (2000) Integrative aspects of zinc transporters. *Journal of Nutrition* **130**, 1384-1387.

Cousins R.J., Liuzzi J.P. & Lichten L.A. (2006) Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 24085-24089.

Couzy F., Keen C., Gershwin M.E., Mareschi J.P. (1993) Nutritional implications of the interactions between minerals. *Progress in Food and Nutrition Science* **17**, 65-87.

Furuya W.M., Pezzato L.E., Pezzato A.C., Barros M.M. & Miranda E.C. (2001) Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns

- ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* **30**, 1125-1131.
- Gatlin III D.M. & Wilson R.P. (1983) Dietary zinc requirement of fingerling channel catfish. *The Journal of Nutrition* **113**, 630-635.
- Gatlin III D.M. & Wilson R.P. (1984) Zinc supplementation of practical channel catfish diets. *Aquaculture* **41**, 31-36.
- Guimarães I.G., Pezzato L.E. & Barros M.M. (2008) Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition* **14**, 396-404.
- Hambidge K.M., Casey C.E., Krebs N.F. (1986) Zinc. In: Mertz, W. (Ed.), Trace Elements in Human and Animal Nutrition. Academic Press, Orlando, pp. 1 – 137.
- Hempe J.M. & Cousins R.J. (1992) Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: an inverse relationship as a conceptual model for zinc absorption in rats. *Journal of Nutrition* **122**, 89-95.
- Jeng S.S. & Sun, L.T. (1981) Effects of dietary Zinc levels on zinc concentrations in tissues of common carp. *Journal of Nutrition* **111**, 134–140.
- Kaplan M.M. (1972) Alkaline phosphatase. *The New England Journal of Medicine* **286**, 200–202.
- Kjoss V.A., Wood C.M. & McDonald D.G. (2006) Effects of different ligands on the bioaccumulation and subsequent depuration of dietary Cu and Zn in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **63**, 412–422.
- Krebs N.F. (2000) Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *The Journal of Nutrition* **130**, 1374-1377.

- Kucukbay Z., Yazlak H., Sahin N., Tuzcu M., Cakmake M.N., Gurdogan F., Juturu V. & Sahin K. (2006) Zinc picolinate supplementation decreases oxidative stress in rainbow trout (*Orcorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **257**, 465-469.
- Leeson S., Summers J.D. **Nutrition of the chickens**. 4.ed. Guelph: University Books, 2001. p.591.
- Lo G.S., Settle S.L., Steinke F.H. & Hopkins D.T. (1981) Effect of phytate: zinc molar ratio and isolated soybean protein on zinc bioavailability. *Journal of Nutrition* **111**, 2223-2235.
- Luo Z., Tan X., Zheng J., Chen Q. & Liu C. (2011) Quantitative dietary zinc requirement of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*, and effects on hepatic intermediary metabolism and antioxidant responses. *Aquaculture* **319**, 150-155.
- Maage A., Julshamn K. (1993) Assessment of zinc status in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) by measurement of whole body and tissue levels of zinc. *Aquaculture* **117**, 179-191.
- Minitab, Inc: *Minitab: Data Analysis Software*, release 16.1.1.0. State College, Pa, Minitab Inc, 2010.
- National Research Council – NRC. (2011) *Nutrient requirements of fish and shrimp*. Washington, D.C.: National Academy Press, 360p.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4a. Ed.; W.H. Freeman and Company, New York, USA, 2005.
- O'Dell B.L., Yohe J.M. & Savage J.E. (1964) Zinc availability in the chicken as affected by phytate, calcium and ethylenediaminetetraacetate. *Poultry Science* **43**, 45-119.
- Ogino, C. & Yang, G.Y. (1978) Requirement of rainbow trout for dietary zinc. *Bulletin*

- of the Japanese Society Science of Fish* **44**, 1015–1018.
- Overnell J., Fletcher T.C., McIntosh R. (1988) The apparent lack of effect of supplementary dietary zinc on zinc metabolism and metallothionein concentrations in the turbot, *Scophthalmus maximus* (Linnaeus). *Journal of Fish. Biology* **33**, 563–570.
- Pezzato L.E., Miranda E.C. & Barros M.M. (2002) Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* **31**, 1595-1604.
- Portz L., Dias C.T.S & Cyrino J.E.P. (2000) Regressão segmentada como modelo na determinação de exigências nutricionais de peixes. *Scientia Agricola* **57**, 601-607.
- Sá M.V.C., Pezzato L.E., Barros M.M., Padilha P.M (2004). Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. *Aquaculture* **238**, 385-401.
- Sá M.V.C., Pezzato L.E., Barros M.M. & Padilha P.M. (2005) Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Aquaculture Nutrition* **11**, 273-281.
- SAS Institute. *SAS OnlineDoc 9.1.3*. Cary, 2004.
- Satoh S., Tabata K., Izume K., Takeuchi T. & Watanabe T. (1987) Effect of dietary tricalcium phosphate on availability of zinc to rainbow trout (*Orcorhynchus mykiss*). *Nippon Suisan Gakk* **53**, 1199-1205.
- Sekler I., Sensi S.L., Hershinkel M., Silverman W. (2007) Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Molecular Medicine*, **13**, 337-343.
- Shim K.F., Lee T.L. (1993) Zinc requirement of the guppy (*Poecilia reticulata* Peters). *Journal of Aquaculture in Tropics* **8**, 81–90.
- Swinkels J.W., Kornegay, E.T., Zhou W., Lindermann, M.D. Webb Jr. K.E. &

- Verstegen M.W. (1996) Effectiveness of a zinc amino acid chelate and ZnSO₄ in restoring serum and soft tissue zinc concentration when fed to zinc-depleted pigs. *Journal of Animal Science* **74**, 2420–2430.
- Tacon A.G.J. & De Silva S.S. (1983) Mineral composition of some commercial feeds available in Europe. *Aquaculture* **31**, 11-20.
- Tan B. & Mai K. (2001) Zinc methionine and zinc sulfate as sources of dietary zinc for juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture* **192**, 67-84.
- Tudor R., Zalewski P.D. & Ratnaike R.N. (2005) Zinc in health and chronic disease. *Journal of Nutrition and Health Aging*, **9**, 45-51.
- Underwood E.J. *The mineral nutrition of livestock*. 3.ed. Wallingford: CABI, 1999. 614p.
- Vallee B.L. & Falchuk KH. (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiology Research* **73**, 79–118.
- Watanabe T., Kiron V. & Satoh S. (1997) Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* **151**, 185-207.
- Yamaguchi M. (1998) Role of zinc in bone formation and bone resorption. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* **11**, 119-135.

Tabela 1 Composição das dietas experimentais

Ingrediente (%)	0Zn	20Zn	40Zn	80Zn	160Zn	320Zn
Farelo soja	46,74	46,74	46,74	46,74	46,74	46,74
Glúten de milho	5,78	5,78	5,78	5,78	5,79	5,80
Fubá de miho	37,20	37,18	37,17	37,15	37,10	37,01
Farelo de trigo	6,75	6,76	6,76	6,77	6,78	6,80
Óleo de soja	0,63	0,63	0,64	0,64	0,65	0,68
DL-Metionina	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
L-Treonina	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
L-Triptofano	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Fosfato bicálcico	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05
BHT*	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Premix Vit/Min†	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Vitamina C (35,0%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
NaCl	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Sulfato de Zinco Monoidratado‡	0,0	0,005	0,011	0,021	0,043	0,086
Óxido de Crômio III (Cr ₂ O ₃)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<i>Composição química calculada</i>						
Energia digestível (kcal kg ⁻¹)	3035	3035	3035	3035	3035	3035
Proteína digestível (%)	26,81	26,81	26,81	26,81	26,81	26,81
Fibra bruta (%)	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Extrato etéreo (%)	2,88	2,88	2,88	2,89	2,90	2,92
Lisina (%)	1,53	1,53	1,53	1,53	1,53	1,53
Metionina (%)	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52
Metionina + Cistina (%)	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85
Treonina (%)	1,18	1,18	1,18	1,18	1,18	1,18
Arginina (%)	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75
Ca total (%)	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66
Fósforo disponível (%)	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52
Zn (mg kg ⁻¹) <i>analisado</i>	46,53	61,00	76,84	133,48	198,96	339,74
Zn disponível (%) <i>analisado</i>	38,85	43,19	45,90	75,07	109,05	138,85

*antioxidante Butil hidroxitolueno. †Premix vitamínico mineral (isento de Zn), níveis de garantia por kg da dieta: vitamina A, 16000 UI; vitamina D3, 4500 UI; vitamina E, 250 UI; vitamina C, 350 mg; vitamina B₁, 32 mg; vitamina B₂, 32 mg; vitamina B₆, 32 mg; pantotenato de cálcio, 80 mg; niacina, 170 mg; biotina, 10 mg; ácido fólico, 10 mg; vitamina B12, 32 µg; Na₂SeO₃, 0,7 mg; MnO, 50mg; FeSO₄, 150 mg; CuSO₄, 20 mg; CoSO₄, 0,5 mg; I₂Ca, 350 mg. ‡Sulfato de zinco monoidratado com 37,4% de zinco.

Tabela 2 Valores médios e desvio padrão de coeficientes de absorção de zinco (CAA Zn), ferro (CAA Fe), cobre (CAA Cu) e manganês (CAA Mn) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas prática suplementadas com zinco

Zinco (mg kg ⁻¹)	CAA Zn* (%)	CAA Fe (%)	CAA Cu (%)	CAA Mn (%)
0	83,50 ± 1,78 a	33,96 (± 24,13) a	70,34 (± 10,96) a	20,79 (± 3,95) c
20	70,82 (± 1,17) b	27,17 (± 2,55) a	72,58 (± 14,74) a	55,39 (± 2,89) a
40	59,74 (± 2,30) c	27,05 (± 15,51) a	83,53 (± 4,84) a	50,61 (± 3,99) a
80	56,24 (± 4,11) cd	24,69 (± 11,61) a	42,14 (± 16,53) b	51,36 (± 8,98) a
160	54,81 (± 1,95) d	34,89 (± 10,74) a	41,58 (± 10,07) b	50,43 (± 4,26) a
320	40,87 (± 2,09) d	36,51 (± 18,48) a	40,66 (± 12,61) b	33,39 (± 12,09) b
P	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001

ns = não significativo

Letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Fisher (P<0,05)

Tabela 3 Valores médios e desvio padrão de ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), taxa de retenção proteica (TRP) e fosfatase alcalina (FA) e medianas de sobrevivência (SB), de juvenis de tilápia-do-Nilo arraoados com dietas suplementadas com níveis de zinco durante 130 dias

Zinco (mg kg ⁻¹)	GP (g)	CR (g)	CA (g g ⁻¹)	TRP (%)	FA UL ⁻¹	SB (%)
0	123,51 (± 8,50) b	202,27 (± 14,51) a	1,61 (± 0,09) b	31,03 (± 2,01) b	33,86 (± 7,27) b	100,00
20	136,03 (± 12,51) ab	208,25 (± 17,42) a	1,52 (± 0,04) b	31,99 (± 1,17) b	37,77 (± 29,55) b	100,00
40	139,85 (± 8,65) ab	216,38 (± 11,69) a	1,53 (± 0,06) b	31,97 (± 1,21) b	40,08 (± 1,95) b	93,75
80	152,73 (± 10,36) a	212,80 (± 12,49) a	1,39 (± 0,05) a	35,28 (± 1,07) a	46,07 (± 14,90) b	93,75
160	147,13 (± 5,85) a	204,30 (± 12,28) a	1,37 (± 0,08) a	35,44 (± 1,00) a	48,83 (± 1,60) ab	100,00
320	148,37 (± 11,76) a	199,81 (± 19,18) a	1,33 (± 0,08) a	37,11 (± 2,54) a	63,11 (± 8,81) a	87,50
P	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001	0,017	ns

ns = não significativo

Letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Fisher (P<0,05)

Tabela 4 Valores médios e desvio padrão de concentração de proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), cinzas, zinco (ZnCar) e cobre (CuCar) na carcaça e zinco nos ossos (ZnO) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis de zinco durante 130 dias (com base na matéria seca)

Zinco (mg kg ⁻¹)	PB (%)	EE (%)	Cinzas (%)	ZnCar (µg g ⁻¹)	CuCar (µg g ⁻¹)	ZnO (µg g ⁻¹)
0	49,99 (± 3,91) a	18,29 (± 1,18) a	10,72 (± 0,43) a	154,66 (± 18,56) c	19,08 (± 6,36) a	138,96 (± 46,83) b
20	47,82 (± 3,60) a	19,21 (± 2,34) a	9,77 (± 1,64) a	162,56 (± 9,11) bc	21,45 (± 4,08) a	167,78 (± 5,15) b
40	50,82 (± 1,79) a	17,94 (± 1,13) a	9,46 (± 1,37) a	168,45 (± 6,37) bc	25,54 (± 3,37) a	270,73 (± 36,62) a
80	49,33 (± 4,39) a	18,81 (± 3,06) a	9,55 (± 1,34) a	169,02 (± 12,20) bc	23,60 (± 6,02) a	274,99 (± 44,15) a
160	48,31 (± 2,43) a	20,24 (± 2,06) a	9,11 (± 1,05) a	178,80 (± 18,98) b	17,82 (± 4,11) a	272,47 (± 41,25) a
320	52,57 (± 3,17) a	17,74 (± 2,30) a	9,49 (± 1,25) a	216,35 (± 19,41) a	19,46 (± 4,45) a	319,74 (± 27,34) a
P	ns	ns	ns	0,001	ns	<0,0001

ns = não significativo

Letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Fisher (P<0,05)

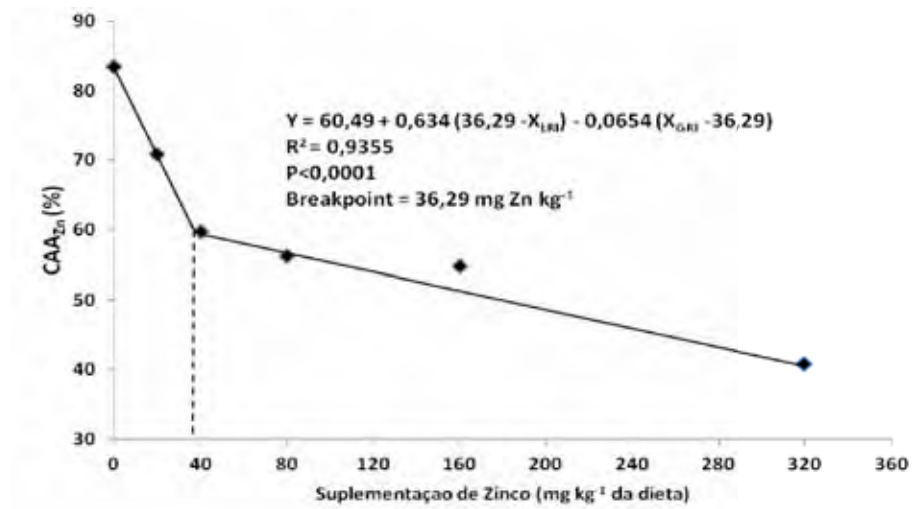


Figura 1 Coeficiente de absorção de zinco de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis de zinco

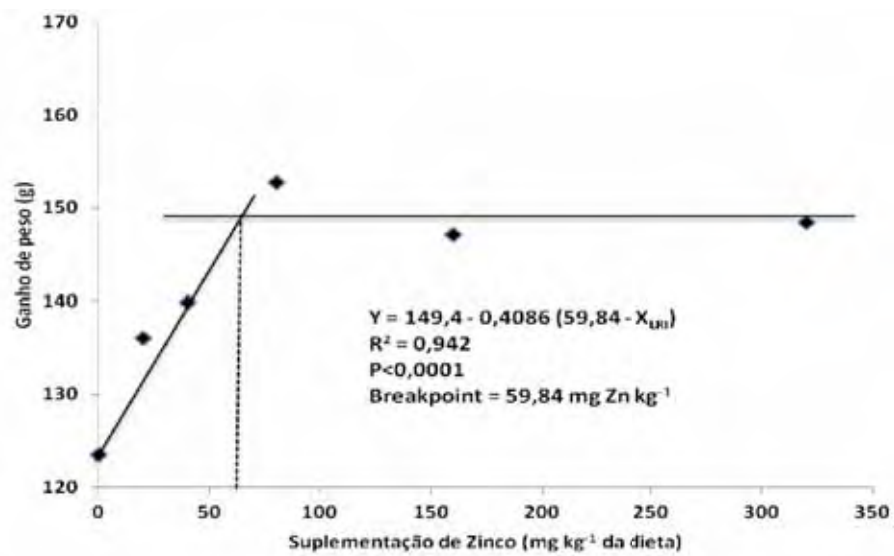


Figura 2 Ganho de peso corporal de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis de zinco

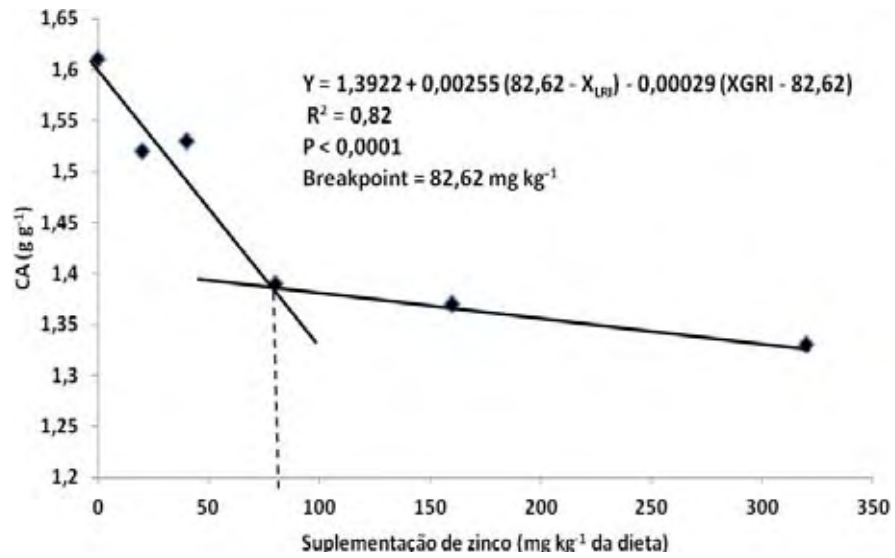


Figura 3 Conversão alimentar de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis de zinco

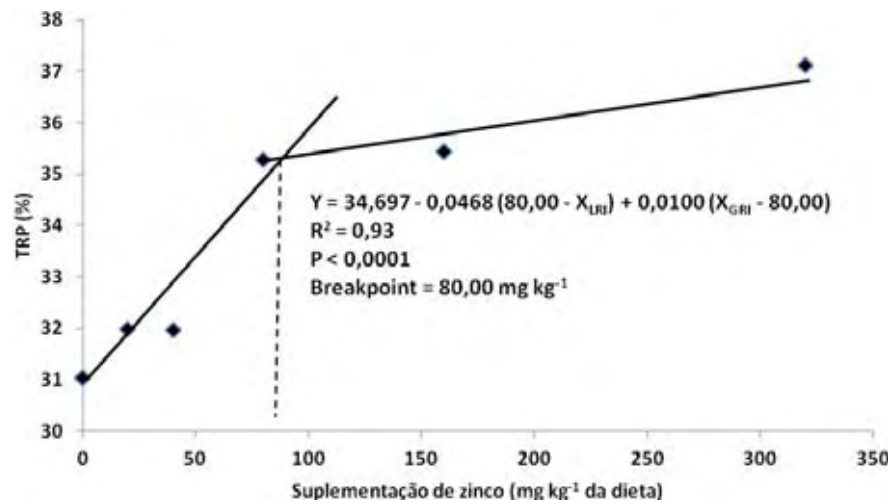


Figura 4 Taxa de retenção proteica de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis de zinco

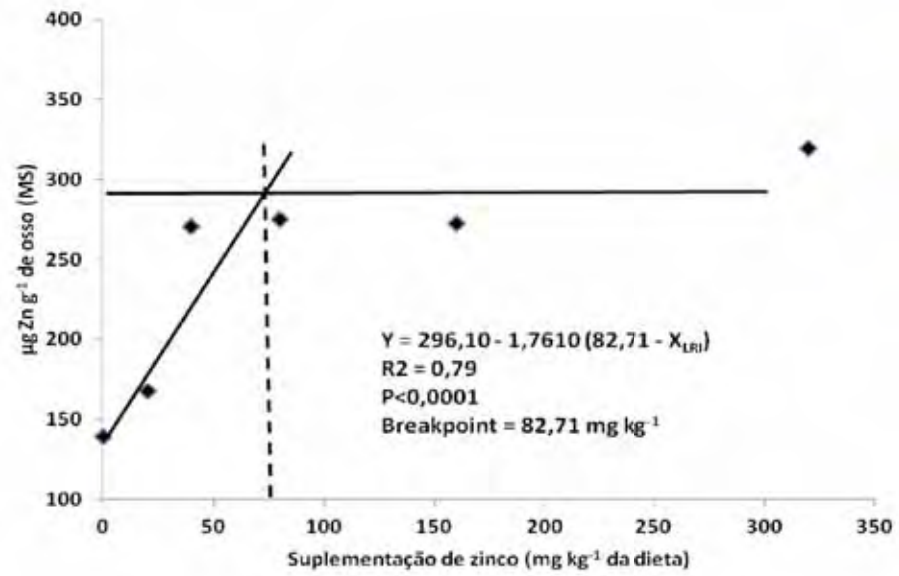


Figura 5 Concentração de zinco óssea de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis de zinco

CAPÍTULO III

Parâmetros imunológicos e hematológicos da tilápia-do-Nilo alimentada com dietas práticas suplementadas com zinco e desafiada com *Aeromonas hydrophila*

Resumo – Os efeitos do zinco sobre o perfil hematológico, parâmetros do sistema imune e atividade da enzima superóxido dismutase de juvenis de tilápia-do-Nilo foram avaliados em peixes infectados ou não com *Aeromonas hydrophila*. 288 alevinos de tilápia ($7,67 \pm 0,23$ g) foram aleatoriamente distribuídos em 36 aquários (n=8) com volume total de 250 L e alimentados com dietas práticas suplementadas com zinco (0, 20, 40, 80, 160, 320 mg kg⁻¹ dieta). A fonte de zinco utilizada foi o sulfato de zinco monoidratado. Ao final de 130 dias, foi coletado sangue para avaliar a atividade respiratória e bactericida de monócitos, perfil hematológico e proteínas do soro. Foi ainda coletado o fígado para avaliar a atividade da enzima superóxido dismutase. Posteriormente, 60 peixes foram inoculados com *A. hydrophila*, e mortalidade observada durante 15 dias, sendo que, ao final foram realizadas as análises descritas anteriormente. Os peixes infectados pela bactéria apresentaram menores valores de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, proteína plasmática total, e das frações albumina e globulina, caracterizando anemia em função do quadro infeccioso pela ação bacteriana. A atividade bactericida, produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos e atividade da superóxido dismutase responderam, significativamente, ao aumento da suplementação dietética de zinco. O zinco influenciou a atividade respiratória dos monócitos de juvenis de tilápia-do-Nilo. Com base na atividade bactericida e da superóxido dismutase, a exigência deste mineral em dietas práticas para juvenis de tilápia-do-Nilo é de 80 mg Zn kg⁻¹.

Palavras-chave: desafio bacteriano, higidez, *Oreochromis niloticus*

Immune and hematological parameters of Nile tilapia fed practical diets containing levels of zinc and submitted to *Aeromonas hydrophila* challenge

Abstract – A 130-day trial was undertaken to evaluate the effect of zinc on hematological and immune parameters, superoxide dismutase activity of Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*). 288 Nile tilapia fingerlings with 7.67 ± 0.23 g weight (mean \pm SD) were randomly stocked into 36 250 L-aquaria and fed practical diets supplemented with zinc (0, 20, 40, 80, 160, 320 mg kg⁻¹ diet). Zinc source was zinc sulfate monohydrate. At the end of the experimental period fish were bled and samples collected to evaluate peripheral blood monocytes respiratory activity (H₂O₂ and NO production) and bactericidal activity, plasma protein, hematological parameters and superoxide dismutase activity. Results indicated that hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, total plasmatic protein, albumin and globulin were the lowest in infected fish, that characterized anemia due to bacterial action. Blood respiratory and bactericidal activity monocytes and superoxide dismutase activity increased with the increasing zinc levels. Zinc influenced monocyte respiratory activity in Nile tilapia juveniles. Based on bactericidal and superoxide dismutase activity, the requirement of this mineral in practical diets for Nile tilapia juveniles 80.00 mg kg⁻¹.

Key-words: bacterial challenge, health, *Oreochromis niloticus*

Introdução

O aumento da atividade aquícola nos corpos de água doce traz o risco de epidemias por bactérias patogênicas. As doenças de peixes limitam o desenvolvimento dos sistemas de produção e as bactérias, provavelmente, constituem o grupo de agentes etiológicos, economicamente mais significante. Isto ocorre porque todas as espécies de peixes são suscetíveis à infecções bacterianas, sendo difícil evitar sua propagação, uma vez que estão naturalmente no ambiente (Frerichs & Millar 1993, Costa 1998). Portanto, se torna imprescindível a formulação de dietas que atendam às exigências nutricionais de cada espécie de forma a otimizar o crescimento e a higidez dos peixes.

O zinco atua como componente catalítico em mais de 300 metaloenzimas nos tecidos animais e em mais 2000 fatores de transcrição zinco-dependentes. Entre as enzimas que esse mineral compõe estão a anidrase carbônica, proteína C quinase, fosfatase alcalina, carboxipeptidases, álcool desidrogenase, superóxido dismutase e transcriptase reversa (Cai et al. 2005, Marques & Marreiro 2006).

A deficiência de zinco provoca em peixes retardo no crescimento, lesões cutâneas, mortalidade, além de danos oxidativos pela ação de radicais livres (Ogino & Yang 1978, Powell et al. 1994, Salgueiro et al. 2000). A participação do zinco no sistema de defesa antioxidante tem sido amplamente investigada e pesquisas destacam o seu papel em mecanismos como a regulação da síntese de metalotioneínas, atividade da superóxido dismutase e proteção de grupamentos sulfidrila de proteínas das membranas celulares, reforçando o seu papel como estabilizador de membranas e organelas encapsuladas. Dessa forma, esse micronutriente atua prevenindo a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo (Powell 2000).

Juvenis de tilápia-do-Nilo deficientes em zinco apresentaram diminuição do número de eritrócitos, taxa de hemoglobina e porcentagem de hematócrito. Desta forma, a diminuição da ação antioxidante de enzimas zinco-dependentes gerou menor prevenção da peroxidação das membranas eritrocitárias, provocando a lise de eritrócitos (Sá et al. 2004). Trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e carpas var Jian (*Cyprinus carpio* var. Jian) deficientes em zinco apresentaram aumento do estresse oxidativo e diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase (Hidalgo et al. 2002; Feng et al. 2011).

Com base no exposto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de níveis de suplementação de zinco em dietas práticas no perfil hematológico, sistema imune e antioxidante de juvenis de tilápia-do-Nilo desafiados com *Aeromonas hydrophila*.

Material e métodos

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Câmpus de Botucatu, SP, Brasil.

Dietas Experimentais

Foram avaliadas dietas práticas suplementadas com níveis crescentes de zinco. Considerando-se que a fonte inorgânica utilizada, sulfato de zinco monoidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), possui em sua composição 37,4% de zinco (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), as dietas que constituíram os tratamentos foram:

0Zn (controle) = dieta ausente da suplementação de $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$;

20Zn = dieta suplementada com 53,48 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kg^{-1} da dieta;

40Zn = dieta suplementada com 106,95 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kg^{-1} da dieta;

80Zn = dieta suplementada com 213,90 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kg^{-1} da dieta;

160Zn = dieta suplementada com 427,81 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kg^{-1} da dieta;

320Zn = dieta suplementada com 855,61 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ kg^{-1} da dieta.

As dietas foram balanceadas de acordo com os valores de proteína e aminoácidos digestíveis determinados por Furuya et al. (2001) e Guimarães et al. (2008), sendo os demais valores utilizados de acordo com os coeficientes de digestibilidade da energia e nutrientes dos alimentos determinados por Pezzato et al. (2002). As rações foram formuladas para atender a exigência em 28,0% de proteína digestível e 3000 kcal kg^{-1} de ração em energia digestível, sendo que o suplemento vitamínico-mineral não apresentava zinco na sua composição. As inclusões dos níveis de sulfato de zinco monoidratado foram feitas em substituição ao milho nas dietas (Tabela 1).

As dietas elaboradas, após a moagem e homogeneização dos ingredientes, tiveram o acréscimo de água a 55,0°C, na proporção de 25% do peso total da mistura, sendo processada em extrusora de rosca simples de forma a se obter grânulos com diâmetro geométrico médio aproximado de 4,0 mm (DGM), sendo após desidratada em estufa de ventilação forçada à 55,0°C, durante 12h.

Os peixes receberam, previamente, durante duas semanas, a dieta controle com a finalidade de adaptação. Posteriormente, foram pesados e alimentados com as dietas experimentais, quatro vezes ao dia, até saciedade aparente, nos horários de 8h30min, 11h30min, 14h30min e 17h30min, durante 130 dias. Ao final do período experimental, foi determinado o perfil hematológico, produção de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio, atividade da superóxido dismutase e atividade fagocítica em juvenis de

tilápia-do-Nilo.

Desafio Bacteriano

A cepa de *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966) utilizada no experimento foi fornecida pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do CAUNEP - Centro de Aquicultura da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, mantida em meio de estoque e congelada a -80°C no Laboratório de Anatomia do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu, até o seu uso.

A bactéria foi semeada em meio de cultura BHI (Brain-heart infusion), sendo incubada em estufa a 28°C por 24 horas. Após a diluição, foi ajustada por meio da escala 0,5 Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL^{-1}) para obtenção das concentrações de 10^2 , 10^4 , 10^6 e 10^8 UFC mL^{-1} .

Quatro grupos, de 25 peixes cada, foram infectados com as diferentes concentrações da bactéria, para a determinação da dose letal ($DL_{50\%}$), sendo avaliada a mortalidade por 15 dias. A $DL_{50\%}$ foi obtida por meio da análise de PROBIT[®], chegando-se ao valor de 10^6 UFC mL^{-1} , concentração utilizada no desafio experimental.

Desta forma, 60 peixes com peso médio de 150 g foram inoculados intraperitonealmente, com a concentração determinada do agente patógeno contido em 1,0 mL de solução salina (0,85%, m/v), e transferidos para a sala experimental de desafio contendo 30 aquários de 40 litros cada, dotados de filtro, aquecedores e aeração individual, na densidade de dois peixes por aquário, perfazendo cinco repetições por tratamento, em delineamento inteiramente casualizado. Os animais permaneceram nesta estrutura por 15 dias, e foram alimentados com as dietas experimentais. Ao final deste período, foi determinado o perfil hematológico, produção de intermediários reativos do

oxigênio e nitrogênio, atividade da superóxido dismutase e atividade fagocítica.

Análises hematológicas

Para as análises hematológicas os peixes foram anestesiados (benzocaína, 1 g diluído em 10 L de água) e, a coleta de sangue realizada por punção do vaso caudal, com seringa de 1,0 mL com anticoagulante EDTA a 3,0% (m/v).

As análises foram realizadas de acordo com Hrubec & Smith (2010). A contagem de eritrócitos (Erit) foi feita pelo método do hemocítmetro em câmara de Neubauer, utilizando-se Azul de Toluidina Merck® a 0,01% (m/v) em pipeta automática, na proporção 1:200 (sangue:corante). A taxa de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se kit comercial Hemoglobina Labtest Diagnóstica® para determinação colorimétrica. A porcentagem de hematócrito (Htc) foi obtida utilizando-se o método do microhematócrito. Foram calculados os índices hematimétricos volume corpuscular médio ($VCM = (Htc \times 10)/Erit$) e concentração de hemoglobina corpuscular média ($CHCM = (Hb \times 100)/Htc$). Foram confeccionadas extensões sanguíneas para contagem total e diferenciação de leucócitos. A proteína plasmática total (PPT) foi quantificada por meio do uso de refratômetro manual de Goldberg. Para a análise de albumina (ALB) foram coletadas amostras de sangue sem anticoagulante. Estas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 3000 rpm durante 10 minutos para obtenção do soro. A concentração de albumina foi determinada pelo método do verde de bromocresol utilizando-se kit comercial Albumina Labtest Diagnóstica® para determinação colorimétrica. De posse dos resultados de albumina e proteína plasmática total foi então calculada a concentração de globulina (GLOB) no soro e a relação entre albumina e globulina (A:G).

Intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio

Para a determinação da produção de intermediários reativos do oxigênio (IRO) e nitrogênio (IRN), foi coletado sangue de cinco peixes por tratamento, conforme procedimento descrito para as análises hematológicas de peixes infectados ou não pela bactéria. O sangue foi colocado em microtubos (1,5 mL) e mantido em câmara asséptica de fluxo laminar, modelo PCR 2.5 – Pachane[®]. Posteriormente, foi transferido para tubos Falcon estéreis contendo 7,0 mL de meio completo para cultura de células (meio Leibowitz L-15 suplementado com 2,0% de soro bovino fetal, 2,0 mM de glutamina e gentamicina) e homogeneizado. Em outro tubo Falcon foram colocados 3,0 mL de Percoll 51,0% (v/v) e 3,0 mL de Percoll 34,0% (v/v). O sangue foi lentamente transferido para o gradiente de Percoll e centrifugado a 1200 rpm, por 20 minutos, a 10,0° C.

Decorrido este período, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 15,0 mL de L-15, sendo centrifugado a 1000 rpm, por 10 minutos, a 10,0°C. Este procedimento foi repetido por mais uma vez. Em seguida, as células foram ressuspensas para 1,0 mL de meio L-15 contendo 0,1% de soro bovino fetal, sendo a concentração celular ajustada para $2,0 \times 10^6$ células mL⁻¹, após contagem em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico. Alíquotas de 100,0 µL destas suspensões foram distribuídas em placas de microcultura de 96 wells, com posterior incubação (18,0°C). Decorridas duas horas, as células não-aderentes foram removidas e a monocamada de monócitos incubada (18,0°C) por 24 horas. O protocolo adotado foi adaptado de Secombes (1990).

A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por monócitos sanguíneos dos peixes foi determinada por meio da microtécnica de oxidação do vermelho fenol (Pick

& Mizel 1980). Após a incubação das culturas celulares por 24 horas, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de óxido nítrico e a camada celular utilizada para a determinação de H₂O₂.

Para a determinação da produção de IRO, foi acrescido à camada celular solução vermelho fenol, e as culturas foram incubadas em estufa a 18,0°C, por 60 minutos. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 10,0 µL de NaOH 1 mol L⁻¹. A absorbância foi determinada em microleitor de Elisa automático, com filtro de 620 nm, sendo o branco constituído de vermelho fenol e NaOH.

A produção de óxido nítrico (NO) por monócitos sanguíneos foi determinada por método colorimétrico, baseado na reação de Griess (Green et al. 1981), combinando 100,0 µL do sobrenadante da amostra teste com 100,0 µL do reagente Griess (Need 0,1% (m/v) e sulfanilamida 1,0% (m/v) em H₃PO₄ 5,0%, v/v). As leituras foram feitas em microleitor de ELISA a 540nm.

Atividade Bactericida

Foram realizados testes prévios para determinar a melhor relação monócito/bactéria (1:1, 1:10 e 10:1), com dois períodos de incubação (30 e 60 minutos). Os resultados mostraram melhor resultado de recuperação bacteriana na relação 1:10, com tempo de incubação de 60 minutos. Estes resultados foram utilizados para a realização dos testes em peixes infectados ou não pela *A. hydrophila*.

Para a determinação da atividade bactericida (AB) dos monócitos, foi coletado sangue de cinco peixes de cada tratamento, conforme procedimento descrito anteriormente. Decorridas 24 horas da incubação das células, o sobrenadante das culturas foi retirado e as células aderentes desafiadas com *Aeromonas hydrophila*

(relação monócito/bactéria de 1:10 ou 2×10^5 células : 2×10^6 bactérias). Após 60 minutos, o sobrenadante da cultura foi coletado e as monocamadas de monócitos submetidas a lavagens com meio L-15 sem gentamicina. Ao término das lavagens, os monócitos lisados com deoxicolato de sódio (0,05%), processo que permitiu a completa remoção dos monócitos, bem como o material após a lise dos mesmos, com, conseqüente, liberação de bactérias fagocitadas (Vazquez-Torres et al. 2000).

Posteriormente, 100 μ L das suspensões foram semeados em placas contendo Mueller Hinton - Ágar, por meio do método de plaqueamento Pour Plate. Foram feitas placas contendo apenas o meio de cultura para avaliar possível contaminação ou com bactéria ($2,0 \times 10^6$ UFC mL^{-1}), para verificar a taxa de crescimento da *A. hydrophila*. Após 24 horas de incubação, a 37°C, as colônias desenvolvidas em cada placa foram contadas e calculadas as porcentagens de recuperação das bactérias viáveis, em comparação com o crescimento normal da bactéria.

Superóxido Dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada no fígado de peixes infectados ou não pela bactéria. Para obtenção do órgão, os peixes foram mortos com superdosagem de benzocaína (1g em 1L de água). Posteriormente foram realizadas aberturas dorsais com tesoura cirúrgica para retirada dos órgãos internos. Os fígados foram separados e cortados em quatro partes em cima de bandejas envoltas por gelo, prevenindo o desnaturação das enzimas. As partes dos fígados foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e congeladas em nitrogênio líquido. Para cada tubo contendo parte dos fígados foram adicionados 5,0 mL de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com pH 7,0 e homogeneizados com auxílio de Turrax. Em seguida, as amostras foram centrifugadas

a 5000 rpm, por 20 min a 4°C, retirando o sobrenadante. Esta operação foi repetida de por até quatro vezes até a retirada de todo sobrenadante. A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de Beauchamp & Fridovich (1971), modificado por Bor et al. (2002), tendo como base a capacidade da enzima converter radicais superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular.

No sistema reacional foi utilizado 1,0 mL de nitroblue tetrazolium (NBT) $33 \mu\text{mol L}^{-1}$, 0,25 mL de riboflavina $0,0033 \text{ mmol L}^{-1}$, 0,25 mL de metionina 10 mmol L^{-1} , 0,5 mL de EDTA $0,66 \text{ mmol L}^{-1}$, 0,95 mL de tampão fosfato de sódio 50 mmol L^{-1} pH 7,8 e 50 μL da amostra, totalizando volume de 3,0 mL. A mistura foi homogeneizada em Vortex e mantida sob iluminação fluorescente (15 W) por 15 minutos. A redução do NBT foi determinada por meio de leituras de absorvância em espectrofotômetro a 560 nm. Uma unidade enzimática (U) da atividade de SOD expressa em U mg^{-1} de proteína foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a redução do NBT. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Bioprocessos, do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu.

Análises estatísticas

As análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico Minitab[®] 16.1.1.0 (Minitab Inc. 2010). Os dados hematológicos (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina média, proteína plasmática total, albumina, globulina e relação albumina:globulina), imunológicos (leucócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio) e de atividade da enzima superóxido dismutase, por não seguirem distribuição normal,

foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, e complementados com o teste de comparações de Mann-Whitney. Os dados de atividade fagocítica foram transformados em Log_{10} e submetidos à técnica de análise de variância para o modelo com um fator, ao nível de 5% e complementada com teste de comparações múltiplas de Dunnett.

Resultados

A suplementação de zinco não influenciou o Erit, Hb, Htc, VCM e CHCM dos peixes infectados ou não pela *Aeromonas hydrophila*. Os peixes infectados demonstraram menores valores de Hb, Htc, VCM e maior valor de CHCM, quando comparados, dentro do mesmo nível de zinco, aos peixes não infectados (Tabela 2).

A suplementação de zinco também não influenciou o PPT, ALB, GLOB e A:G, dos peixes infectados ou não pela bactéria. A PPT diminuiu, significativamente, em peixes infectados quando comparados, dentro do mesmo nível de zinco, aos peixes não infectados. A ALB diminuiu em peixes infectados que foram alimentados com dietas isenta de zinco e suplementada com 20 mg kg^{-1} da dieta. Já a GLOB diminuiu em peixes infectados quando arraçoados com dietas suplementadas com 160 e $320 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ da dieta (Tabela 3). A suplementação de zinco não influenciou a produção de leucócitos (LEUC), linfócitos (LF), neutrófilos (NT) e monócitos (MN) dos peixes infectados ou não pela *A. hydrophila* (Tabela 4).

O zinco suplementar não influenciou a produção de NO por monócitos dos peixes não infectados e infectados pela bactéria *A. hydrophila*. Os peixes infectados, alimentados com dietas suplementadas com 80, 160 e $320 \text{ mg Zn kg}^{-1}$, apresentaram menor produção de NO por monócitos quando comparados aos peixes não infectados

que foram arraçoados com as mesmas dietas. Os peixes não infectados alimentados com dieta suplementada com 320 mg Zn kg⁻¹ apresentaram maior produção de H₂O₂ por monócitos. Já a suplementação dietética a partir de 160 mg Zn kg⁻¹ proporcionou aos animais infectados maior produção de H₂O₂. Os monócitos de peixes infectados alimentados com dieta suplementada com 40 mg Zn kg⁻¹ apresentaram maior produção de H₂O₂, quando comparados, dentro do mesmo nível de zinco, aos não infectados (Tabela 5).

A suplementação dietética a partir de 160 mg Zn kg⁻¹ conferiu aos peixes não infectados maior atividade da SOD. O mesmo ocorreu em peixes infectados arraçoados com dietas com suplementação a partir de 80 mg Zn kg⁻¹. Os peixes infectados alimentados com dietas isenta e suplementadas com 20 e 40 mg Zn kg⁻¹ apresentaram maior atividade de SOD quando comparados com peixes não infectados arraçoados com as mesmas dietas (Tabela 6).

A suplementação dietética de zinco de 80 e 160 mg Zn kg⁻¹ em peixes infectados e de 80 mg kg⁻¹ em peixes não infectados aumentou a AB dos monócitos destes animais (Tabela 7).

Discussão

A intensificação dos sistemas de produção, aliada ao manejo inadequado e fatores ambientais desfavoráveis aumentam a susceptibilidade dos peixes à doenças (Selvaraj et al. 2005). O efeito nocivo das condições adversas sobre a higidez dos peixes pode ser observado nesta pesquisa com resultados de alterações fisiológicas.

A suplementação de zinco não alterou a eritropoiese dos peixes infectados ou não com a bactéria, porém, os peixes alimentados com dietas suplementadas apresentaram

aumento de 9,22% de eritrócitos em relação aos peixes alimentados com dieta isenta de zinco. Peixes infectados com *Aeromonas hydrophila* apresentaram valores hematológicos menores, sendo que as dietas suplementadas com zinco não foram capazes de manter o hemograma nos padrões considerados adequados para animais não infectados (Weiss & Wardrop 2010, Fernandes Junior et al. 2010, Teixeira et al. 2012). A anemia dos peixes infectados foi caracterizada pela queda dos parâmetros hematológicos (Hb, Htc e VCM) (Hrubec & Smith 2010). Tal observação demonstrou que o desafio bacteriano foi prejudicial à manutenção do perfil hematológico. Foram, igualmente, observadas alterações significativas no eritrograma de carpas comum, *Cyprinus carpio*, infectadas também com *A. hydrophila* (Harikrishnan et al. 2003).

A proteína plasmática total e as frações albumina e globulina também foram prejudicadas pelo processo infeccioso sofrido pelos peixes infectados com a bactéria. A albumina apresentou redução de 35,06% em peixes infectados alimentados com dieta isenta de zinco e suplementada com 20 mg kg⁻¹. Os peixes infectados alimentados com dietas suplementadas com 160 e 320 mg Zn kg⁻¹ tiveram redução de 86,11% de globulina plasmática. Este quadro de anemia e diminuição das proteínas plasmáticas representa a defesa do organismo contra a proliferação de microrganismos (Kent et al. 1994). Quando o organismo é infetado por bactérias, ocorre resposta inflamatória com liberação de mediadores, que atuam na inibição da eritropoese e síntese de ferritina, de forma a induzir a retirada do mineral dos locais de invasão bacteriana e promover a síntese de anticorpos (Weinberg 1992, Katevas et al. 1994). Desta forma, é possível sugerir que a menor quantidade de hemoglobina eritrocitária e proteínas plasmáticas tenham sido estratégias complementares que o organismo empregou para se proteger da doença.

A produção de intermediários de nitrogênio e oxigênio indica que a suplementação de zinco não alterou a produção de IRO pelos monócitos dos peixes não infectados, porém níveis de inclusão acima de 40 mg kg^{-1} na dieta dos peixes infectados diminuíram a produção de NO. Por outro lado, níveis crescentes de inclusão de zinco dietético aumentaram a produção de IRO pelos monócitos, em peixes não infectados e infectados pela bactéria. Apesar da suplementação de zinco não ter alterado a quantidade de leucócitos dos peixes, estes se apresentaram mais responsivos. Quando o organismo é exposto a fatores exógenos, os macrófagos podem ser ativados, produzindo citocinas e mediadores químicos, como o H_2O_2 e NO (Janeway 1999). Os resultados corroboram os observados por Hidalgo et al. (2002) para truta arco-íris.

Neste estudo, a atividade da SOD no fígado aumentou com o acréscimo de zinco suplementar. A produção de H_2O_2 e NO por macrófagos expostos a fatores exógenos é importante mecanismo de defesa do organismo e pode refletir na higidez do animal (Pick & Keisari 1980). A liberação de quantidades consideráveis de IRO induz a quebra de fita de DNA e/ou perturbação no citoesqueleto da membrana, levando a bactéria à morte (DeChatelet et al. 1976, Nelson & Cox 2005). Estes resultados corroboram os observados para carpa Jian (Feng et al. 2011) e truta arco-íris (Hidalgo et al. 2002). Com base nos resultados obtidos, é possível sugerir que o efeito antioxidante do zinco, componente estrutural e catalítico da SOD, pode ser atribuído à habilidade de manter esta enzima ativa. Assim, é possível inferir que a maior produção de H_2O_2 na ação bactericida ocorreu devido a maior atividade da SOD.

Os monócitos de peixes alimentados com dietas com suplementação a partir de 80 mg Zn kg^{-1} inibiram com maior eficácia a formação de colônias bacterianas. Porém, os monócitos de peixes infectados alimentados com dieta suplementada com 320 mg Zn

kg⁻¹ não inibiram, tão eficazmente, a formação de colônias. Em ratos, o uso prolongado de doses acima da exigência de zinco prejudicou a atividade bactericida de macrófagos e a proliferação de linfócitos (Lastra et al. 2001). Isto ocorre porque o excesso de zinco pode saturar os receptores de macrófagos e antígenos, inibindo a interação entre eles (Lastra et al. 2001). Desta forma, é possível inferir que a suplementação acima da exigida pode causar efeito imunossupressor nos peixes.

O zinco influencia a atividade respiratória de monócitos em juvenis de tilápia-do-Nilo, e com base na atividade bactericida e da superóxido dismutase, a suplementação de 80 mg Zn kg⁻¹ da dieta confere aos peixes melhores condições de retornarem à homeostase após estresse.

Referências

- Bradford, M.M. (1976) A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assay and applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276-287.
- Bor, M., Özdemir, F. & Türkan, I. (2002) The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Bet vulgaris* L. and wild beet *Beta naritima* L. *Plant Science* **164**, 77-84.
- Cai, L., Li, X.K., Song, Y., Cherian, M.G. (2005) Essentiality and toxicology of zinc and copper and its chelation therapy. *Current Medicinal Chemistry* **12**, 2753-2763.
- Costa A.B. (1998) Ictiopatologia e manejo sanitário em piscicultura intensiva. In:

- Simpósio sobre manejo e nutrição de peixes, 2.*, Campinas. Anais. Campinas CBNA, 73-96.
- DeChatelet L.R., Shirley P.S. & Johnston Jr. R.B. (1976). Effect of phorbol myristate acetate on the oxidative metabolism of human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* **47**, p.545-554.
- Feng, L., Tan, L., Liu, Y., Jiang, J., Jiang, W.D., Hu, K., Li, S.H. & ZHOU, X.Q. (2011) Influence of dietary zinc on lipid peroxidation, protein oxidation and antioxidant defence of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquaculture Nutrition* **17**, 875-882.
- Fernandes Junior, A.C., Pezzato, L.E., Guimarães, I.G., Teixeira, C.P., Koch, J.F.A. & Barros, M.M. (2010) Resposta hemática de tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com colina e submetidas a estímulo por baixa temperatura. *Revista Brasileira de Zootecnia* **39**, 1619-1625.
- Finaud, J., Lac, G. & Filaire, E. (2006) Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. *Sports Medicine* **36**, 327- 358.
- Frerichs, G.N. & Millar, S.D. (1993) *Manual for isolation and identification of fish bacterial pathogens*. Stirling. Pisces Press, 60p.
- Furuya W.M., Pezzato L.E., Pezzato A.C., Barros M.M. & Miranda E.C. (2001) Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* **30**, 1125-1131.
- Green, L.C., Luguriaga, V.R., Wager, D.A., Rand, W., Istfan, N., Yeung, V.R. & Tannenbaum, S.R. (1981) Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**, 7764-7768.

- Guimarães I.G., Pezzato L.E. & Barros M.M. (2008) Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition* **14**, 396-404.
- Harikrishnan R.; Nisha R.M. & Balasundaram C. (2003) Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* **221**, p.41-50.
- Hidalgo, M.C., Expósito, A., Palma, J.M. & Higuera, de.la.M. (2002) Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **34**, 183–193.
- Hrubec T.C. & Smith S.A. Hematology in Fishes. In: Weiss D.J. & Wardrop K.J. (2010) *Schalm's Veterinary Haematology*, 6th edn. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Janeway, C. J.; *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e a na doença*, 4th ed., Ed. Artes Médicas Sul Ltda: Porto Alegre, 1999.
- Katevas P., Andonopoulos A.P., Kourakli-Symeonidis A., Manopoulou E., Lafi T., Maki M. & Zoumbos N.C. (1994). Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis suppress erythropoiesis in vitro via the production of tumor necrosis factor alpha. *European Journal of Haematology* **53**, p.26-30.
- Kent S, Weinberg ED, Stuart-Macadam P. (1994) The etiology of the anemia of chronic disease and infection. *Journal of Clinical Epidemiology* **47**, p.23-33.
- Lastra M.D., Pastelin R., Camacho A., Monroy B. & Aguilar A.E. (2001) Zinc intervention on macrophages and lymphocytes response. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **15**, 5-10.
- Marques, R.C., Marreiro, D N. (2006) Aspectos metabólicos do zinco na síndrome de

- Down. *Revista de Nutrição* **19**, 501-510.
- Minitab, Inc: *Minitab: Data Analysis Software*, release 16.1.1.0. State College, Pa, Minitab Inc, 2010.
- Nelson, D.L. & Cox, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4a. Ed.; W.H. Freeman and Company, New York, USA, 2005.
- Ogino, C. & Yang, G.Y. (1978) Requirement of rainbow trout for dietary zinc. *Bulletin of the Japanese Society Science of Fish* **44**, 1015–1018.
- Pezzato L.E., Miranda E.C. & Barros M.M. (2002) Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* **31**, 1595-1604.
- Pick E & Keisari Y (1980). A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods* **38**, 161-170.
- Powell, S.R., Hall, D., Aiuto, L., Wapnir, R.A., Teichberg, S. & Tortolani, A.J. (1994) Zinc improves postischemic recovery of isolated rat hearts through inhibition of oxidative stress. *American Journal of Physiology* **266**, 2497–2507.
- Powell, S.R. (2000) The antioxidant properties of zinc. *Journal of Nutrition* **130**, 1447S–1454S.
- Sá M.V.C., Pezzato L.E., Barros M.M., Padilha P.M (2004). Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. *Aquaculture* **238**, 385-401.
- Salgueiro, M.J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M.I., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A., Weill, R. & Boccio, J. (2000) Zinc as essential micronutrient: a review. *Nutrition Research* **20**, 737–755.

- Selvaraj, V., Sampath, K. & Sekar, V. (2005) Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* **19**, 293-306.
- Secombes, C.J. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In: Stolen, J., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Van Muiswinkel, W.B. (Eds). *Techniques in fish Immunology*. Fair Haven: SOS Publications, 1990. p.137-154.
- Teixeira, C.P., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Fernandes Junior, A.C., Koch, J.F.A. & Padovani, C.R. (2012) Growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed diets containing levels of pyridoxine and hematological response under heat stress. *Aquaculture Research* **43**, 1081-1088.
- Vazquez-Torres, A., Carson, J.J., Mastroeni P., Ischiropoulos H. & Fang F.C. (2000) Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *Journal of Original Scientific Research* **192**, 227-36.
- Weinberg, E.D. (1992) Iron depletion: a defense against intracellular infection and neoplasia. *Life Sciences* **50**, 1289-1297.
- Weiss D.J. & Wardrop K.J. (2010) *Schalm's Veterinary Haematology*, 6th edn. Blackwell Publishing, Iowa, USA.

Tabela 1 Composição das dietas experimentais

Ingrediente (%)	0Zn	20Zn	40Zn	80Zn	160Zn	320Zn
Farelo soja	46,74	46,74	46,74	46,74	46,74	46,74
Glúten de milho	5,78	5,78	5,78	5,78	5,79	5,80
Fubá de miho	37,20	37,18	37,17	37,15	37,10	37,01
Farelo de trigo	6,75	6,76	6,76	6,77	6,78	6,80
Óleo de soja	0,63	0,63	0,64	0,64	0,65	0,68
DL-Metionina	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
L-Treonina	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
L-Triptofano	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Fosfato bicálcico	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05	2,05
BHT ^a	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Premix Vit/Min ^b	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Vitamina C (35,0%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
NaCl	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Sulfato de Zinco Monoidratado ^c	0,0	0,005	0,011	0,021	0,043	0,086
Óxido de Crômio III (Cr ₂ O ₃)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<i>Composição calculada</i>						
Energia digestível (kcal kg ⁻¹)	3035	3035	3035	3035	3035	3035
Proteína digestível (%)	26,81	26,81	26,81	26,81	26,81	26,81
Fibra bruta (%)	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Extrato etéreo (%)	2,88	2,88	2,88	2,89	2,90	2,92
Ca total (%)	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66
Fósforo disponível (%)	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52
Lisina (%)	1,53	1,53	1,53	1,53	1,53	1,53
Metionina (%)	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52
Metionina + Cistina (%)	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85
Treonina (%)	1,18	1,18	1,18	1,18	1,18	1,18
Arginina (%)	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75	1,75
Zn (mg kg ⁻¹) <i>analisado</i>	46,53	61,00	76,84	133,48	198,96	339,74
Zn disponível (%) <i>analisado</i>	38,85	43,19	45,90	75,07	109,05	138,85

^a antioxidante Butil hidroxitolueno. ^b Premix vitamínico mineral (isento de Zn), níveis de garantia por kg da dieta: vitamina A, 16000 UI; vitamina D3, 4500 UI; vitamina E, 250 UI; vitamina C, 350 mg; vitamina B₁, 32 mg; vitamina B₂, 32 mg; vitamina B₆, 32 mg; pantotenato de cálcio, 80 mg; niacina, 170 mg; biotina, 10 mg; ácido fólico, 10 mg; vitamina B12, 32 µg; Na₂SeO₃, 0,7 mg; MnO, 50mg; FeSO₄, 150 mg; CuSO₄, 20 mg; CoSO₄, 0,5 mg; I₂Ca, 350 mg. ^c Sulfato de zinco monoidratado com 37,4% de zinco.

Tabela 2 Medianas de eritrócitos (Erit), porcentagem de hematócrito (Htc), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis de zinco, infectados ou não com *Aeromonas hydrophila*

Zn (mg kg ⁻¹)	Erit (10 ⁶ µL ⁻¹)		Hb (dL)		Htc (%)		VCM (fL)		CHCM (%)	
	não infectado	infectado	não infectado	infectado	não infectado	infectado	não infectado	infectado	não infectado	infectado
0	2,06	2,00	8,16 A	6,39 B	28,00 A	23,75 B	136,00 A	107,69 B	26,33 B	30,85 A
20	2,31	1,96	7,36 A	5,57 B	28,28 A	19,00 B	137,70 A	105,63 B	25,05 B	29,96 A
40	2,31	1,95	7,66 A	6,54 B	30,75 A	24,00 B	135,75 A	125,67 B	24,45 B	25,91 A
80	2,28	1,88	7,49 A	5,78 B	33,50 A	19,00 B	143,50 A	110,17 B	23,59 B	30,89 A
160	2,25	1,82	7,92 A	6,10 B	30,00 A	19,00 B	127,20 A	104,40 B	26,59 B	29,05 A
320	2,11	1,93	7,19 A	5,65 B	28,25 A	18,50 B	132,10 A	99,88 B	25,49 B	30,54 A
P	0,136	0,840	0,861	0,098	0,183	0,116	0,420	0,726	0,06	0,075

Letras maiúsculas comparam os animais infectados ou não dentro do mesmo tratamento, pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05)

Tabela 3 Medianas de proteína plasmática total (PPT), albumina (ALB), globulina (GLOB) e relação albumina/globulina (A:G) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas suplementadas com zinco, e infectados ou não com *Aeromonas hydrophila*

Zn (mg kg ⁻¹)	PPT (mg dL ⁻¹)		ALB (mg dL ⁻¹)		GLOB (mg dL ⁻¹)		A:G	
	não infectado	infectado	não infectado	infectado	não infectado	infectado	não infectado	infectado
0	3,93 A	3,20 B	0,97 A	0,76 B	3,20	2,43	0,33	0,32
20	4,18 A	3,05 B	1,11 A	0,78 B	2,74	2,42	0,42	0,32
40	4,20 A	3,20 B	0,95	0,76	3,54	2,34	0,28	0,33
80	4,40 A	3,60 B	0,97	0,93	3,12	2,49	0,29	0,38
160	4,15 A	3,10 B	1,24	1,08	3,23 A	1,75 B	0,39	0,42
320	4,13 A	3,80 B	1,20	1,43	3,46 A	1,85 B	0,37	0,68
P	0,696	0,777	0,170	0,350	0,503	0,106	0,315	0,140

Letras maiúsculas comparam os animais infectados ou não dentro do mesmo tratamento, pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05)

Tabela 4 Medianas de número absoluto de leucócitos (LEUC), linfócitos (LF), neutrófilos (NT) e monócitos (MN) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçados com dietas suplementadas com zinco, e infectados ou não com *Aeromonas hydrophila*

Zn (mg kg ⁻¹)	LEUC (10 ⁴ céls µL ⁻¹)		LF(10 ⁴ céls µL ⁻¹)		NT (10 ⁴ céls µL ⁻¹)		MN (10 ⁴ céls µL ⁻¹)	
	não infectado	infectado	não infectado	infectado	não infectado	infectado	não infectado	infectado
0	23,15	21,75	21,45	19,15	1,95	1,79	0,82	0,96
20	22,63	22,45	18,87	21,58	2,14	2,23	0,92	0,88
40	19,98	21,50	18,64	20,35	2,18	1,84	0,79	0,65
80	18,40	22,55	20,14	19,88	2,32	2,03	0,87	0,79
160	21,35	22,10	21,42	18,68	1,88	1,76	0,71	0,89
320	19,23	21,78	22,66	21,30	2,26	2,40	0,90	0,83
P	0,452	0,556	0,767	0,666	0,456	0,321	0,123	0,599

Letras minúsculas comparam níveis de suplementação de zinco (mg kg⁻¹ da dieta), pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05)

Letras maiúsculas comparam os animais infectados ou não dentro do mesmo tratamento, pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05)

Tabela 5 Medianas de valores de intermediários reativos de nitrogênio (NO), e oxigênio (H₂O₂) produzidos por monócitos de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis de zinco infectados ou não com *Aeromonas hydrophila*

Zn (mg kg ⁻¹)	NO (μmol)		H ₂ O ₂ (nmol)	
	não infectado	não infectado	não infectado	infectado
0	12,50	10,76	0,402 a	0,393 a
20	18,42	11,50	0,430 a	0,468 a
40	18,99	13,90	0,459 aB	0,889 bA
80	16,63 A	6,36 B	0,805 b	0,945 b
160	14,79 A	7,38 B	1,437 c	1,476 c
320	17,79 A	6,14 B	2,02 d	2,070 c
P	0,390	0,227	>0,0001	0,001

Letras minúsculas comparam níveis de suplementação de zinco (mg kg⁻¹ da dieta), pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05)
Letras maiúsculas comparam os animais infectados ou não dentro do mesmo tratamento, pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05)

Tabela 6 Medianas de valores de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis de zinco infectados ou não com *Aeromonas hydrophila*

Zinco (mg kg ⁻¹)	SOD (USOD mg ⁻¹ prot)	
	não infectados	infectados
0	0,299 cB	0,325 dA
20	0,300 cB	0,433 cA
40	0,354 cB	0,486 bcA
80	0,460 b	0,501 ab
160	0,554 a	0,525 ab
320	0,555 a	0,548 a
P	0,001	0,003

Letras minúsculas comparam níveis de suplementação de zinco (mg kg⁻¹ da dieta), pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05)
Letras maiúsculas comparam os animais infectados ou não dentro do mesmo tratamento, pelo teste de Mann-Whitney (p<0,05)

Tabela 7 Número de unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹), logaritmo (Log₁₀) e percentual de sobrevivência (%) da bactéria *Aeromonas hydrophila* incubada em meio contendo monócitos de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis de zinco infectados ou não com a bactéria *Aeromonas hydrophila*

Zinco (mg kg ⁻¹)	não infectados			infectados		
	UFC mL ⁻¹ x 10 ⁶	Log	%	UFC mL ⁻¹ x 10 ⁶	Log	%
0	1,97	6,29 ± 0,08 a	100,00	3,21	6,51 ± 0,14 a	100
20	1,28	6,10 ± 0,04 a	65,02	1,71	6,21 ± 0,01 a	53,13
40	1,28	6,10 ± 0,07 a	64,99	1,44	6,21 ± 0,12 a	44,72
80	1,46	6,14 ± 0,16 a	74,11	1,65	6,22 ± 0,03 a	51,47
160	1,11	6,04 ± 0,04 b	56,08	1,36	6,07 ± 0,27 b	42,33
320	0,94	5,96 ± 0,11 b	47,51	1,21	6,06 ± 0,18b	37,67
P	0,97	5,97 ± 0,15 b	48,90	1,88	6,25 ± 0,18 a	58,42
		0,013			0,038	

Letras minúsculas comparam níveis de zinco (mg kg⁻¹ da dieta), pelo teste de Dunnet (p<0,05)

Letras maiúsculas comparam os animais infectados ou não dentro do mesmo tratamento, pelo teste t-Student (p<0,05)

IMPLICAÇÕES

- ✓ O excesso de zinco pode ocasionar prejuízos metabólicos a longo prazo. Portanto, a utilização de níveis elevados de zinco e outros minerais bivalentes em dietas para peixes pelas indústrias de ração, deve ser revista.

- ✓ A extrusão é frequentemente utilizada por indústrias em rações comerciais para peixes. A maioria das pesquisas com zinco para peixes são desenvolvidas utilizando-se rações purificadas. Nesta pesquisa, utilizaram-se rações práticas na tentativa de se aproximar da realidade das indústrias, possibilitando considerar a disponibilidade da fonte de mineral após o seu processamento, de forma que fosse absorvida pelos peixes;

- ✓ Em toda a produção a relação custo/benefício do produto a ser utilizado deve ser considerada. No processo industrial de criação de peixes, a ração representa parte considerável do custo total de produção, e apesar de serem utilizados em pequenas quantidades, os minerais são nutrientes onerosos. Portanto, as rações devem ser formuladas de acordo com a fase de vida do animal, melhorando desta forma, os índices zootécnicos e determinando o sucesso econômico da produção. Esta adequação deve ser realizada de forma a atender a exigência nutricional dos peixes, considerando-se a interação existente entre os nutrientes, visando o crescimento e hígidez dos animais.