

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

DESEMPENHO E PERFIL HEMATOLÓGICO DA TILÁPIA-DO-NILO
ALIMENTADA COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM FERRO E
COBRE E SUBMETIDA AO ESTRESSE POR CALOR

FELIPE TENÓRIO CINTRA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do
Título de Mestre.

BOTUCATU - SP
Novembro - 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

DESEMPENHO E PERFIL HEMATOLÓGICO DA TILÁPIA-DO-NILO
ALIMENTADA COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM FERRO E
COBRE E SUBMETIDA AO ESTRESSE POR CALOR

FELIPE TENÓRIO CINTRA

Zootecnista

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Margarida Maria Barros
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Francisco Fleuri

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do
Título de Mestre.

BOTUCATU - SP
Novembro – 2012

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

Cintra, Felipe Tenório, 1987-
C575d Desempenho e perfil hematológico da tilápia-do-nylo alimentada com dietas suplementadas com ferro e cobre e submetida ao estresse por calor / Felipe Tenório Cintra. - Botucatu : [s.n.], 2012
55 f. : grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2012

Orientador: Maria Margarida Barros

Co-orientador: Luciana Francisco Fleuri

Inclui bibliografia

1. Tilapia (Peixe). 2. Peixe - Nutrição. 3. Stress (Fisiologia) - Aspectos nutricionais. I. Barros, Maria Margarida. II. Fleuri, Luciana Francisco. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmão pelo incontestável incentivo,
Pela nobreza de seus valores e caráter
E por permitir conhecer a pureza de sentimentos tão raros e sinceros.

Aos meus familiares por sustentarem a firmeza de uma família unida e honesta,
Passando seus valores e servindo de exemplo á todas as novas gerações.

Ao meu avô Edmar Dumas (*in memorian*) que iniciou nossas vidas
Com as escolhas certas
E que por pouco tempo não comemora conosco esse grande passo.

Aos amigos e professores que trilharam esse caminho comigo,
Dando alegria, inspiração, diretrizes, exemplos e muitos ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela dádiva da vida, saúde e por mostrar a plenitude dos sinceros sentimentos e valores, na forma mais bonita de todas, o amor dos meus pais e família;

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu, pelo privilégio de utilizar as estruturas da escola, por desfrutar do excelente corpo docente e administrativo;

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Margarida Maria Barros pelos ensinamentos, paciência em muitos momentos, pela irrefutável ajuda e orientação para execução desse trabalho. Também pelo exemplo passado como pessoa e de excelência no profissionalismo, ética, responsabilidade e paixão pela profissão;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luiz Edvaldo Pezzato por todo apoio na formação, execução do trabalho, conselhos e por servir de inspiração desde as mínimas atitudes;

À minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Luciana Francisco Fleuri pela ajuda na execução do trabalho, na sempre disponível ajuda e conselhos, alegrias e a enorme inspiração e exemplo que fornece;

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani pela ajuda na análise estatística dos dados do experimento e as conversas engrandecedoras que tivemos;

Ao Prof. Pedro de Magalhães Padilha e equipe de trabalho pela ajuda nas análises no experimento;

À Guabi pela confecção dos suplementos vitamínicos e minerais utilizados no experimento;

Aos professores e funcionários vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia, nas pessoas do Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi e Prof. Dr. José Roberto Sartori, por todo apoio fornecido;

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

Aos companheiros de laboratório e pós-graduação: Ademir Fernandes Jr., Caroline Pelegrina, João Fernando Koch, Vivian Gomes, Paula Monteiro, Pedro Pucci, Mariucha Ribeiro, Rafael Lopes, Flávia Damasceno, Renan Botelho, Lara Genovez, Jakeline Azambuja, Eric Portilho, Guilherme Sassi, Vítor Fascina;

À Universidade Federal de Alagoas na pessoa da Prof.^a Dr.^a Edma Carvalho de Miranda, pela minha formação acadêmica, incentivo e meios para buscar o mestrado fora do estado e as amizades obtidas;

Aos amigos conquistados durante o período do mestrado, ou pela convivência na pós-graduação ou no dia-a-dia, pela honra de desfrutar da companhia de todos vocês, aprender um pouco mais sobre as diferenças, diversidade de pensamentos e posturas, além da agradável convivência regada a muitos sorrisos e alegria. E aos que tiveram a árdua missão do convívio diário: Pedro Pucci, João Fernando Kock e Cauê Surge, pela paciência e por sempre me trazer ótimas lembranças e companheirismo.

E a todos os outros que contribuíram com a formação e execução do trabalho os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I.....	01
Considerações iniciais.....	02
1. Mineral ferro.....	02
1.1 Características e funções do mineral ferro.....	02
1.2 Efeitos do ferro em dietas para peixes.....	04
2. Mineral cobre.....	07
2.1 Características e funções do mineral cobre.....	07
2.2 Efeitos do cobre em dietas.....	09
3. Hematologia e estresse.....	11
4. Referências bibliográficas.....	14
CAPÍTULO II.....	19
DESEMPENHO PRODUTIVO E PERFIL HEMATOLÓGICO DA TILÁPIA- DO-NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>) ALIMENTADA COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM NÍVEIS DE FERRO E COBRE E SUBMETIDA A ESTRESSE POR CALOR.....	19
Resumo.....	20
Abstract.....	21
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	23
Resultados	27
Discussão.....	28
Conclusões.....	32
Referências Bibliográficas.....	33
CAPÍTULO III.....	46
Implicações.....	47

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO II - DESEMPENHO PRODUTIVO E PERFIL HEMATOLÓGICO DA TILÁPIA-DO-NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>) ALIMENTADA COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM NÍVEIS DE FERRO E COBRE E SUBMETIDA A ESTRESSE POR CALOR.....	19
Tabela 1 – Composição das dietas experimentais.....	37
Tabela 2 - Média (desvio padrão) do ganho de peso, peso médio final, consumo de ração, conversão alimentar e taxa de sobrevivência de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de ferro e cobre.....	38
Tabela 3 - Média (desvio padrão) dos valores médios da contagem de eritrócitos, taxa de hemoglobina e hematócrito de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas contendo níveis de inclusão de ferro e cobre, antes e pós-estresse por calor.....	39
Tabela 4 - Média (desvio padrão) dos valores médios do volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e proteína plasmática total (PPT) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de ferro e cobre, antes e pós-estresse por calor.....	40
Tabela 5 - Média (desvio padrão) da concentração de ferro plasmático, capacidade latente de ligação do ferro (CLLF), capacidade total de ligação do ferro (CTLF) e índice de saturação da transferrina (IST) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de ferro e cobre, antes e pós-estresse por calor.....	41
Tabela 6 - Média (desvio padrão) da atividade oxidativa da ceruloplasmina sérica (U/L) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de ferro e cobre, antes e pós-estresse por calor.....	42
Tabela 7 – Mediana e valores mínimos e máximo da concentração de ferro e cobre hepático (mg.g^{-1} de fígado) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas contendo níveis de inclusão de ferro e cobre.....	43

Tabela 8 - Mediana e valores mínimos e máximos do número total de trombócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos ($10^9/\mu\text{L}$) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas contendo níveis de inclusão de ferro e cobre.....	44
Tabela 9 - Mediana e valores mínimos e máximos do número de linfócitos, neutrófilos e monócitos (%) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas contendo níveis de inclusão de ferro e cobre.....	45

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Mineral ferro

1.1. Características e funções do mineral ferro

O ferro (Fe) é um elemento traço essencial para produção e normal funcionamento da hemoglobina, mioglobina, citocromos e enzimas do organismo. O principal papel nos vertebrados é ser componente da hemoglobina. Grande parte do ferro circulante no organismo é reciclado na regeneração periódica dos eritrócitos, a parte não utilizada é excretada via bile pelo intestino (NRC, 2011). Segundo Hrubec & Smith (2006), a hemoglobina é o principal constituinte do citoplasma dos eritrócitos, sendo responsável pelo transporte de oxigênio para órgãos e tecidos.

Desempenhando importantes funções nos processos celulares, o ferro participa de várias reações bioquímicas, como síntese de ácidos nucleicos e proteínas, proliferação celular, transporte de elétrons, respiração celular, produção de ATP (Trifosfato de adenosina) e regulação da expressão gênica (MILLER et al., 1993; BOLDT, 1999). Segundo Eimerit et al. (2001) para minimizar o efeito tóxico do ferro, mecanismos sofisticados e moléculas especializadas na absorção, transporte e armazenamento deste elemento, em sua forma solúvel e não tóxica, estão envolvidos de modo a atingir a exigência celular do mineral e controlar a homeostase corpórea.

Neves et al. (2009) destacaram que o próprio metabolismo mantém o equilíbrio entre os benefícios e efeitos tóxicos deste mineral, realizado por interações gênicas, muitas das quais são também conhecidas por estarem envolvidos na resposta à infecção, como as proteínas de transporte, transferrina e de armazenamento, a ferritina e apoferritina. Em vertebrados, o mecanismo da absorção do ferro inicia-se com a ligação do ferro no seu estado ferroso (Fe^{2+}) à molécula de transferrina no lúmen intestinal e transportado através da mucosa. O ferro ligado a transferrina é transportado pelo sangue, sendo novamente liberado em determinados locais (fígado e tecidos hematopoiéticos). Dentro da célula, o ferro em seu estado férrico (Fe^{3+}), se liga a molécula de apoferritina formando a ferritina (BURY & GROSELL, 2003; NRC, 2011).

Os principais fatores que influenciam a absorção de ferro dos alimentos consumidos são: a forma química do elemento, proporção de componentes orgânicos e

inorgânicos na dieta, digestibilidade da ração, interação com outros componentes dietéticos, idade do animal e estado de saúde do trato digestório (LALL, 2002).

O nível corporal de ferro é regulado por mecanismos homeostáticos, sendo dependente, dentre outros fatores, da necessidade de formação de células, que podem regular a produção de receptores específicos de ferro nas células da mucosa do intestino delgado, onde é feita grande parte da absorção e excreção do mineral. O ferro no lúmen intestinal é absorvido pelos receptores e transferidos para o citoplasma das células por transporte ativo, com gasto de energia, estando possivelmente ligado a aminoácidos, sendo a absorção dependente da concentração do mineral na ferritina e nos receptores da mucosa intestinal, ocorrendo um decréscimo da absorção quando atingida a saturação (LATUNDE-DADA et al., 1998; LIEU et al., 2001; BURY et al., 2003).

No enterócito, a hemoglobina e a mioglobina são degradadas por enzima específica que libera o ferro na forma inorgânica, o qual pode ser armazenado como ferritina ou transportado para a corrente sanguínea. Com a morte desse enterócito, o ferro permanece na forma de ferritina e será excretado pelo próprio trato gastrintestinal (LIEU et al., 2001; BURY et al., 2003).

Os alimentos são a maior fonte de ferro para peixes, mas a absorção pelas brânquias também ocorre, porém de forma limitada, pois o metal está presente na água em baixas concentrações (HALVER, 1988). Segundo Bury et al. (2003), as brânquias são importantes vias de absorção de ferro, possuem receptores específicos para tal, mas este mecanismo ainda não é bem elucidado, sendo a via alimentar a principal responsável pela entrada do mineral para utilização no organismo.

O ferro absorvido é rapidamente ligado à transferrina e levado para sítios específicos para armazenagem ou metabolização. O fígado é o principal órgão de armazenamento de ferro, resgatando a quantidade circulante do metal que excede a capacidade de ligação da transferrina. As células do fígado possuem receptores para transferrina, ferritina, hemoglobina e heme, capturando ferro dessas moléculas. A ferritina é constituída de apoferritina e ferro e é a principal proteína envolvida no armazenamento do mineral. Quando excedida a capacidade de armazenamento da molécula ocorre o depósito amorfo e instável de ferro chamado hemossiderina (BONKOVSKY, 1991; DEVLIN, 1998).

Metal bivalente, o ferro compete pelos mesmos sítios de absorção de outros minerais, sendo observada íntima relação com o cobre, zinco manganês e outros. A elevação de cobre na dieta gera aumento na concentração de ferro no fígado de trutas sem apresentar mudanças significativas na quantidade total do mineral no plasma, podendo ser explicado pela presença da ferroxidase que possibilita o seu acúmulo na ferritina hepática, indicando também que em baixas concentrações promove alterações no metabolismo do cobre (LANNO et al., 1985; CARRAQUIRIBORDE et al., 2004).

1.2. Efeitos do ferro em dietas para peixes

Os efeitos benéficos e deletérios da suplementação de ferro em rações para peixes têm sido estudados. Tacon (1992) ressaltou o importante papel do ferro no transporte de oxigênio e respiração celular. Peixes alimentados com baixos níveis na dieta podem desenvolver vários sinais clínicos, dentre eles quadro de anemia hipocrômica microcítica. Hrubec & Smith (2006) caracterizaram a anemia quando se tem valores abaixo do normal, para cada espécie, do número total de eritrócitos, taxa de hemoglobina e/ou volume corpuscular.

A deficiência de ferro em bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*) é caracterizada pela diminuição nos valores de hematócrito, hemoglobina, conteúdo do mineral no plasma e saturação da transferrina. Gatlin & Wilson (1986) enfatizaram também que o mínimo de ferro exigido é o necessário para promover ótimo crescimento e ótima conversão alimentar, dentre outros parâmetros de desempenho produtivo, devido ao processo de reciclagem desse mineral pelo organismo.

Carraquiriborde et al. (2004) em experimento com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) utilizando a adição de ferro em 100 mg.kg⁻¹ e 1500 mg.kg⁻¹ em dietas purificadas por oito semanas, observaram maior acúmulo de ferro no intestino e estômago dos peixes alimentados com altos níveis de suplementação do mineral, enquanto nas dietas com níveis normais e abaixo do preconizado a maior concentração foi determinada nos músculos, brânquias e fígado, respectivamente. Ocorreu aumento na concentração de hemoglobina corpuscular média nos eritrócitos dos peixes alimentados com níveis normais e altos de suplementação do mineral. Foi observado também incremento na capacidade total de ligação do ferro no soro para alta inclusão

em detrimento da diminuição da capacidade latente de ligação do ferro nesse nível. Observou-se correlação negativa da concentração de ferro com a de cobre, indicando que a redução da quantidade de ferro no intestino foi responsável pelo aumento na concentração de cobre intestinal.

Em outro estudo com bagres do canal, Sealey et al. (1997) utilizaram duas formas de adição de ferro na dieta, sulfato ferroso e ferro metionina, em níveis de zero a 180 mg/kg de dieta purificada, por oito semanas, posteriormente promovendo desafio bacteriológico com *Edwardsiella ictaluri*. Observou-se que a não suplementação, independente da forma, reduziu o desempenho, mas que essas formas e os níveis de inclusão não diferiram entre si. Foi notado também diminuição nos valores de hematócrito, hemoglobina corpuscular média e volume corpuscular médio. Valores abaixo de 30 mg.kg⁻¹ da dieta aumentaram a suscetibilidade a infecções por *E. ictaluri* e prejudicaram o desempenho produtivo dos animais. Os autores também destacaram que as dietas para bagre do canal comercialmente utilizadas já atendem as exigências para o desempenho adequado e higidez dos animais, mas ainda ressaltaram que são necessários estudos complementares para a resposta imune. Em estudo semelhante, Lim et al. (1996) observaram que bagres do canal alimentados sem a suplementação de ferro desenvolvem anemia microcítica hipocrômica caracterizada pela diminuição nos valores de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média.

Ling et al. (2010) avaliaram, por 60 dias, o crescimento, composição corporal e enzimas intestinais de carpa comum (*Cyprinus carpio*) suplementando ferro, em sete dietas purificadas (53,9; 90,0; 115,6; 146,1; 176,0; 215,8 e 266,0 mg de ferro/kg da dieta). Observou-se que o peso final, taxa de crescimento específico, eficiência alimentar e porcentagem de ganho de peso foram piores no mais baixo nível de suplementação. Também foi notada maior concentração de ferro sérico no mais alto nível de inclusão e pior retenção proteica no mais baixo nível de suplementação. Estes autores também observaram que a atividade de tripsina, lipases e alfa-amilases no intestino e hepatopâncreas foram reduzidas nos animais que receberam dieta sem suplementação e que, a piora na eficiência alimentar pode ser consequência desta baixa atividade enzimática.

Para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) observou-se diminuição nos valores de hematócrito, volume corpuscular médio, ferro hepático e hemoglobina corpuscular média em consequência da não suplementação de vitamina C na dieta, mesmo nas dietas suplementadas com níveis de ferro. Na dieta com alta suplementação de ferro (300 mg.kg⁻¹ de ração), a diferença só foi notada na concentração hepática do mineral (ARIDE et al., 2010). Bhaskaram (1988) atribuíram o efeito do aumento no número de células vermelhas à presença de vitamina C na dieta, quando comparada as rações ausentes e, ainda, explicaram também que a diminuição na concentração de ferro nos tecidos, mesmo atendendo às necessidades de vitamina C na dieta é explicada pelo fato dessa vitamina disponibilizar o ferro ligado a ferritina do fígado, para posterior transporte do mineral pelo plasma e, subsequente, incorporação nos tecidos.

Andersen et al. (1997) avaliaram três fontes de ferro em níveis de inclusão de isento a 1500 mg.kg⁻¹ da dieta por oito semanas, para salmão do Atlântico (*Salmo salar*), e notaram diminuição da taxa de crescimento dos animais no nível mais alto de inclusão. Foi notado que a inclusão de sulfato ferroso aumentou a hemoglobina e a concentração hepática de ferro a partir de 25 mg.kg⁻¹ de ração e manteve-se estável a partir de 100 mg.kg⁻¹ de inclusão. Foi observado também diminuição da concentração de cobre hepático para os mais altos níveis de inclusão.

Em experimento com yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) Ukawa et al. (1994) avaliaram a inclusão de concentrado proteico de soja e suplementação de ferro na dieta (0, 50, 100, 250, 500 e 1000 mg.kg⁻¹ de dieta) no perfil hematológico e desempenho dos animais. Não foram observadas diferenças na composição corporal dos diferentes tratamentos e no desempenho produtivo, exceto na eficiência alimentar do grupo com mais alta inclusão de ferro dietético. Os peixes que receberam dieta isenta da suplementação do mineral apresentaram os mais baixos valores, entre os demais tratamentos, para as variáveis de hematócrito, hemoglobina e contagem de células vermelhas e, além disso, não foi notada diferença para as inclusões de 250 a 1000 mg.kg⁻¹ de ferro na dieta. A concentração de ferro sérico e a capacidade latente de ligação do ferro foram piores nos tratamentos isento, com inclusão 50 e 100 mg de ferro/kg nas dietas.

Ye et al. (2007) em estudo desenvolvido com garoupas (*Epinephelus coiodes*) com níveis de 0 a 250 mg.kg⁻¹ de suplementação de sulfato ferroso em dietas

purificadas por oito semanas, observaram que o maior ganho de peso e melhor taxa de eficiência alimentar foi para o nível de 100 mg.kg⁻¹ de suplementação na dieta. A concentração de ferro no fígado aumentou com o incremento da inclusão do mineral na dieta, não observando diferença para a alta inclusão. Não foram observadas diferenças nas variáveis hematológicas de hemoglobina, hematócrito e número de células vermelhas.

Barros et al. (2002) avaliaram, por dez semanas, a inclusão de níveis crescentes de ferro (40, 336 e 671 mg de ferro/kg da ração) em dietas a base de farelo de algodão no desempenho do bagre do canal. Os resultados revelaram efeito linear crescente para ganho de peso, consumo alimentar, número de eritrócitos e taxa de hemoglobina. A suplementação de ferro não interferiu na atividade de macrófagos e aglutinação de anticorpo, sendo notada essa diferença na inclusão de farelo de algodão na dieta pós desafio bacteriológico, onde os animais que receberam mais farelo de algodão nas dietas obtiveram melhoria naqueles parâmetros.

Buscando avaliar os efeitos de diferentes fontes de ferro em dietas para peixes, Rigos et al. (2010) estudaram quatro níveis de ferro orgânico (50, 100, 200 e 300 mg de ferro/kg de dieta) e um nível de ferro inorgânico (300 mg de ferro/kg de dieta) em dietas práticas para dourada (*Sparus aurata*) no perfil hematológico, imunológico e desempenho dos animais. Não foi notada diferença no crescimento e na distribuição do mineral nos tecidos, mas foi notada diminuição no número de células vermelhas na mais alta inclusão de ferro orgânico. Ocorreu melhor resposta antibacteriana no nível de inclusão de 300 mg.kg⁻¹ de ferro na forma orgânica.

Kleemann (2003) observou que o ferro proveniente da dieta não determinou alterações no desempenho produtivo e que a exigência mínima para manutenção da eritropoiese é de 60 mg.kg⁻¹ da ração para alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e que, valores abaixo podem ocasionar anemia microcítica e hipocrômica. Shiau & Su (2003) avaliaram duas fontes de ferro (citrato de ferro e sulfato ferroso) em dietas purificadas isentas ou não da suplementação para tilápia-do-Nilo. Para o desempenho produtivo os autores observaram que o ganho de peso e a eficiência alimentar foram melhores para o nível de 150 mg.kg⁻¹ de inclusão do mineral, e no perfil hematológico os melhores resultados obtidos foram a partir de 100 mg.kg⁻¹ de

inclusão na dieta. Na inclusão de sulfato ferroso o melhor nível encontrado para as variáveis de desempenho e perfil hematológico foi o de 50 mg.kg⁻¹ de inclusão.

2. Mineral cobre

2.1. Características e funções do mineral cobre

O cobre (Cu) é um elemento traço essencial para os vertebrados, incluindo os peixes, por participar de grande número de processos biológicos, principalmente como co-fator de enzimas, como a citocromo oxidase, superóxido dismutase, lisil oxidase, dopamina hidroxilase e tirosinase (WATANABE et al., 1997). Está envolvido também em processos como hematopoiese e formação de colágeno e elastina (NRC, 2011).

Abdel-Tawwab et al. (2007) ressaltaram que o cobre é essencial para o metabolismo celular, mas pode tornar-se tóxico aos animais aquáticos em elevadas concentrações. Em equilíbrio, existem poucos íons livres de Cu em águas naturais, uma vez que o mineral está associado com íons inorgânicos ou substâncias orgânicas. No entanto, sulfato de cobre tem sido amplamente utilizado para controle de algas e alguns patógenos em viveiros de piscicultura, aumentando as concentrações de cobre na água, porém na faixa de tolerância dos peixes.

Segundo Lim & Webster (2006), como os outros peixes, a tilápia-do-Nilo absorve minerais na água suprimindo parte de suas necessidades metabólicas; Porém, a maior parcela dos minerais é proveniente da ração. Busca-se entender as diferenças entre a toxicidade de dietas naturais e rações administradas em cultivos e estudos. Uma explicação é que os metais em dietas naturais são biologicamente incorporados nos alimentos naturais dos peixes em formas que são mais facilmente absorvidos e, por conseguinte, mais tóxicos (CLEARWATER et al., 2002).

A influência direta do cobre na formação do colágeno e elastina foi descrita por Devlin (1998), ressaltando que a deficiência pode causar desmineralização dos ossos e fragilidade dos vasos sanguíneos. O cobre é co-fator da formação da enzima ALA-desidrogenase, participante da síntese do heme, ressaltando a influência do mineral na absorção e metabolismo do ferro e na formação de hemoglobina nos vertebrados (HRUBEC & SMITH, 2006; NRC, 2011).

A deficiência de cobre prejudica o funcionamento de grande número de órgãos e tecidos, incluindo o sistema hematopoiético, cardiovascular e nervoso (BAKER & AMMERMAN, 1995). O cobre tem íntima ligação com o transporte de ferro pelas membranas celulares, além de ser constituinte da ceruloplasmina, importante enzima do metabolismo de ferro, responsável pela oxidação de íons ferrosos para o estado férrico, forma que pode se ligar a transferrina, proteína plasmática responsável pelo transporte de ferro (KANEKO, 1997).

Segundo Arrendondo & Nuñez (2005), o metabolismo do cobre é alterado em distúrbios inflamatórios e infecções; diferentemente dos níveis de ferro que diminuem durante esses processos, os níveis de cobre e ceruloplasmina sobem. As deficiências causadas pelo ferro e pelo cobre têm características diferentes, a proveniente da carência de ferro é caracterizada como microcítica hipocrômica, já a advinda da deficiência de cobre não altera a concentração de hemoglobina, mas causa redução no número de células, gerando quadro de leucopenia, desmineralização óssea, fragilidade de grandes artérias e desmineralização do tecido nervoso (DUKES et al., 1996; DEVLIN, 1998).

Assim como o ferro, o organismo exerce controle rígido dos níveis de cobre circulante. O fígado acumula a maior parte do cobre absorvido da dieta ou água, sendo local de síntese da ceruloplasmina que é a forma mais abundante de proteína que contém o mineral no corpo (BURY et al., 2003).

2.2. Efeitos do cobre em dietas para peixes

Mesmo sendo considerado elemento essencial para o metabolismo de peixes e apesar da suplementação em rações ser usual, pouco se sabe sobre os efeitos do cobre na fisiologia dos animais. Lorentzen & Maage (1999) destacaram que baixas concentrações dietéticas desse mineral resultaram em depreciação do crescimento de carpas e baixas concentrações nos tecidos corporais.

Hashemi et al. (2008) observaram que as concentrações de Cu nas brânquias, fígado e carcaça de carpas foram elevadas em resposta à exposição ao Cu em curto prazo, e foram maiores com a taxa de arraçoamento de 0,5 % do peso corporal do que em peixes arraçados com 5,0 % do peso corporal. Ressaltaram também que altos níveis de cobre provocaram perda de sódio, resultando em distúrbio grave de regulação de

íons. Os efeitos da inclusão de altas dosagens de cobre em dietas para salmão do atlântico (*Salmo salar*) foram notados no metabolismo de energia, pois ocorreram significativos gastos energéticos para desintoxicações e regulação das funções corpóreas, depreciando os estoques do mineral nos tecidos (BERNTSSEN et al., 2000).

Ferrari et al. (2004) observaram que o melhor nível de cobre em dietas para tilápia-do-Nilo foi de 4,0 mg de sulfato de cobre penta hidratado, e consideraram também que concentrações elevadas do cobre na ração ocasionaram alterações hepáticas, sendo o tempo de cultivo fator determinante da ação detrimental do cobre para respostas fisiológicas dos peixes. Ainda para tilápia-do-Nilo, Shaw & Handy (2006) observaram que peixes alimentados com 2000 mg de cobre/kg de ração, apresentaram redução no consumo de ração e ganho de peso por 21 dias de exposição, comparado ao grupo controle (3,0 mg de cobre/ kg de ração).

Outros estudos determinaram níveis de exigências diferentes para distintas espécies. Hoyle et al. (2007) em experimento com bagre africano (*Clarias gariepinus*) avaliaram o desempenho produtivo, hematologia e concentração de cobre nos tecidos dos animais, administrando uma dieta com alta concentração do mineral e outra atendendo as exigências preconizadas. Destacaram que altas concentrações aumentaram o acúmulo nos órgãos, principalmente no fígado, diminuíram o consumo de ração e taxa de crescimento específico, corroborando com o encontrado por Murai et al. (1981) para bagres do canal. Não foi observado diferença na análise hematológica.

Bagres do canal alimentados com dietas suplementadas com sulfato de cobre acima de 16 mg.kg⁻¹ da ração tiveram comprometimento do crescimento. A suplementação de aproximadamente 5 mg.kg⁻¹ do mineral na dieta promoveu melhor atividade de citocromo c oxidase do coração e superóxido dismutase no fígado (GATLIN & WILSON, 1986).

Kim & Kang (2004) avaliaram níveis crescentes até 500 mg.kg⁻¹ de cobre na dieta para juvenis de rockfish (*Sebastes schlegeli*) no perfil hematológico e concentração do mineral nos tecidos e destacaram que o acúmulo é maior no fígado e intestino e é diretamente dependente do tempo de exposição ao metal, sendo que esse fator não causou nenhuma alteração hematológica nos peixes. Esses dados diferem dos encontrado por Berntssen et al. (2000), em estudo com salmão do Atlântico, que destacaram que os rins concentram mais o mineral do que o fígado.

Em estudo com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), Handy (1996) observaram que somente a concentração intestinal de cobre foi alterada quando fornecida dieta contendo 500 mg.kg⁻¹ do mineral na ração. A taxa de crescimento, consumo de ração, taxa de conversão alimentar e composição da carcaça não sofreram alterações quando comparados ao nível exigido pela espécie de inclusão de cobre.

Gatlin et al. (1989) avaliaram dois níveis de suplementação de cobre na dieta (1 e 20 mg.kg⁻¹) e três níveis de zinco (20, 100 e 200 mg.kg⁻¹), buscando avaliar os efeitos da interação dos dois minerais por absorção e participação na formação de enzimas comuns aos metabolismos. Observaram redução no hematócrito para a baixa inclusão de zinco e afirmaram que altos níveis de zinco em dietas práticas não interferem no metabolismo de cobre em bagres do canal.

Segundo Tan et al. (2011), a suplementação de cobre na dieta para yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) não influenciou no desempenho produtivo e composição corporal dos animais. Níveis próximos a 4 mg.kg⁻¹ da dieta promoveram o maior ganho de peso e taxa de crescimento específico e os mais altos níveis (40 e 80 mg de cobre/kg de dieta) pioram a eficiência alimentar prejudicando o metabolismo proteico. A concentração do mineral pelo corpo foi crescente com o aumento da inclusão na dieta.

3. Hematologia e estresse em peixes

O tecido sanguíneo é responsável por inúmeras funções no organismo animal, trocas de calor, transportar gases respiratórios, nutrientes e produtos de excreção, além de participar nos processos de defesa do organismo. A hematologia representa importante ferramenta para auxílio no diagnóstico de enfermidades e compreensão do funcionamento do organismo, sua aplicação em pesquisa animal é bem difundida e considerada como procedimento de rotina em métodos de diagnósticos (RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004).

O estresse pode ser compreendido como o estado orgânico produzido pela condição ambiental ou mesmo pela condição orgânica, que induzem a mudanças fisiológicas e bioquímicas acima dos níveis normais. A presença, quantidade e proporção das diferentes células no sangue periférico, podem ser destacadas em estudo com peixes por refletir o estado fisiológico do organismo, em momento específico ou

período da vida do animal (RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA, 2004; VAL et al., 2004). Segundo Iwama et al. (1999), ao perceber alterações ambientais ou fisiológicas, o animal desencadeia ajustes, começando normalmente com mudança de comportamento. A exposição ao agente estressor resulta em ajustes imediatos desencadeados nos diversos níveis da organização metabólica, tendo custo energético e buscando minimizar os efeitos orgânicos impostos pelo agente (VAL et al., 2005). Em termos gerais, as respostas a agentes estressores podem ser classificadas em respostas primárias, secundárias e terciárias.

Na produção intensiva de peixes o estresse causado por fatores ambientais também contribuem de maneira persistente na perturbação do equilíbrio do organismo, tornando-se estresse crônico. Esta situação interfere na homeostase fisiológica, com redução do crescimento e da capacidade reprodutiva, além da supressão do sistema imune, tornando o peixe susceptível a doenças e decorrente mortalidade (WENDELAAR-BONGA, 1997).

O estresse ocasiona elevação do nível de cortisol plasmático no sangue de peixes, estimulando a gliconeogênese, e esta interfere na taxa de crescimento dos peixes já que promove a mobilização de aminoácidos e lipídeos para servirem de substrato para a produção de energia, não sendo utilizados para a síntese de tecidos (VIJAYAN et al., 1994).

O emprego de estratégias nutricionais que promovam melhora nos mecanismos de defesa dos peixes tem demonstrado grande aplicabilidade e importância nos cultivos, obtendo-se animais mais saudáveis e de melhor qualidade nutricional. Os animais, quando submetidos a essas estratégias, tornam-se mais capazes em reagir alterações ambientais e ataque de agentes oportunistas, proporcionando melhor condição para o crescimento e promovendo mais alta sobrevivência (TORRECILLAS et al., 2007).

São consideradas estratégias nutricionais, o uso de nutrientes e compostos, em quantidades adequadas, que auxiliada pelo conhecimento das exigências nutricionais baseadas na saúde, permitam o adequado crescimento com melhores condições de higidez (BARROS et al., 2006; WEBSTER, 2007).

Com base nestas informações, o capítulo 2, intitulado “Desempenho produtivo e perfil hematológico da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com dietas suplementadas com ferro e cobre e submetida ao estresse por calor” teve por objetivo

avaliar a interação de níveis de ferro e cobre no desempenho produtivo e respostas hematológicas da tilápia-do-Nilo submetidas a estresse por calor. A redação deste capítulo foi realizada de acordo com as normas da Revista Brasileira de Zootecnia.

4. Referências Bibliográficas

- ABDEL-TAWWAB, M.; MAMDOUH, A.A.; MOUSA, F.; ABBASS, E. Growth performance and physiological response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.) fed organic selenium prior to the exposure to environmental copper toxicity. **Aquaculture**, v.272, p.335–345, 2007.
- ANDERSEN, F.; LORENTZEN, M.; WAAGBO, R.; MAAGE, A. Bioavailability and interactions with other micronutrients of three dietary iron sources in Atlantic salmon, *Salmo salar*, smolts. **Aquaculture Nutrition**, v.3, p.239–246, 1997.
- ARIDE, P.H.R.; FERREIRA, M.S.; DUARTE, R. M.; OLIVEIRA, A.M. Ascorbic Acid (Vitamin C) and Iron Concentration in Tambaqui, *Colossoma macropomum*, Iron Absorption. **Journal of World Aquaculture Society**, v.41, p.145-156, 2010.
- ARREDONDO, M.; NUÑEZ, M.T. Iron and copper metabolism. **Trace Elements and Human Health**, v.26, p.313-327, 2005.
- BAKER, D. H.; AMMERMAN, C. B. Copper bioavailability. In: AMMERMAN, C. B.; BAKER, D.H.; LEWIS, A.J. **Bioavailability of nutrients for animals**. New York: Academic Press, 1995, p. 127-156.
- BARROS, M. M.; LIM, C.; KLESIUS, P. K. Effect of soybean meal replacement cottonseed meal and iron supplementation growth, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. **Aquaculture**, v.207, p.263–279, 2002.
- BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; FALCON, D.R.; GUIMARÃES, I.G. 2006. **Nutrição e saúde de peixes**. Palestra Técnica do Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal p.1-15.
- BERNTSEN, M.H.G.; LUNDEBYE, A.K.; MAAGE, A. Effects of elevated dietary copper concentrations on growth, feed utilization and nutritional status of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. **Aquaculture**, v.174, p.167–181, 2000.
- BHASKARAM, P. Immunology of iron-deficient subjects. In: CHANDRA, R.K. (Ed.) **Nutrition and immunology**. New York: Alan R. Liss, 1988. p.149-68.
- BOLDT, D.H. New perspective on iron: an introduction. **American Journal Medical Sciences**, v.318, p.207-212, 1999.
- BONKOVSKY, H.L. Iron and liver. **American Journal of Medical Sciences**, v.301, p. 31-43, 1991.

- BURY, N.; GROSSELL, M. Iron acquisition by teleost fish. **Comparative Biochemistry Physiology Part C**, v.135, p.97–105, 2003. BOLDT, D.H. New perspectives on iron: an introduction. **American Journal Medical Sciences**, v.318, p.207-12, 1999.
- BURY, N.R.; WALKER, P.A.; GLOVER, C.N. Nutritive metal uptake in teleost fish. **The Journal of Experimental Biology**, v.206, p.11-23, 2003.
- CARRIQUIRIBORDE, P., HANDY, R.D., DAVIES, S.J. Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. **Journal of Experimental Biology**, v.207, p.75–86, 2004.
- CLEARWATER, S.J.; FARAG, A.M.; MEYER, J.S. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. **Comparative Biochemistry Physiology**, v.132C, p.269–313, 2002.
- DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações químicas**. 4 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1998. 1007p.
- DUKES, H.H.; SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856 p.
- EIMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomedical Pharmacoter**, v.55, p.333-9, 2001.
- FERRARI, J.E.C.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; GONÇALVES, G.S.; HISANO, H.; KLEEMAN, G.K. Níveis de cobre em dietas para a tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. **Acta Scientiarum**. Animal Sciences Maringá, v. 26, n. 4, p. 429-436, 2004.
- GATLIN, D.M. & WILSON, R.P. Characterization of iron deficiency and the dietary iron requirement of fingerling channel catfish. **Aquaculture**, v.52, p.191–198, 1986.
- GATLIN, D.M.; PHILLIPS, H.F.; TORRANS, E.L. Effects os various levels os dietary cooper and zinc of channel catfish. **Aquaculture**, v.76, p. 127-134, 1989.
- HALVER, J.E. **Fish nutrition**. 2.ed. New York: Academic Press, 1988. 698p.
- HANDY, R.D. Dietary exposure to toxic metals in fish. In: **Toxicology of Aquatic Pollution** (Taylor, E.W. ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 1996, p. 29–60.
- HASHEMI, S.; BLUST, R.; DE BOECK, G. Combined effects of different food rations and sublethal copper exposure on growth and energy metabolism in Common Carp. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.54, p.318–324, 2008.

- HOYLE, I.; SHAW, B.J.; HANDY, R.D. Dietary copper exposure in the African walking catfish, *Clarias gariepinus*: Transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v.83, p.62–72, 2007.
- HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of fish. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, C.N. **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2006. p.1120-1125.
- IWAMA, G. K.; VIJAYAN, M. M.; MORGAN, J. D. The stress response in fish. In: SAKSENA, D. N. (Ed.) **Ichthyology: recent research advances**. Enfield: Science, 1999. p. 47-57.
- KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. Florida: Academic Press, 1997. 932p.
- KIM, S.-G; KANG, J.-C. Effect of dietary copper exposure on accumulation, growth and hematological parameters of the juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Marine Environmental Research**, v.58, p.65–82, 2004.
- KLEEMAN, G.K. **Exigência nutricional em ferro pela tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus***. 2003. Dissertação (Mestrado)– Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
- LALL, S.P. The minerals. In: **Fish Nutrition** (HALVER, J.E. & HARDY, R.W. eds), 3. ed., Academic Press, San Diego, CA, 2002. p. 259–308.
- LANNO, R.P.; SLINGER, S.J.; HILTON, J.W. Maximum tolerable and toxicity levels of dietary copper in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). **Aquaculture**, v.49, p.257–268, 1985.
- LATUNDE-DADA, G.O.; OLIVEIRA, J.E.D.; CARILLO, S.V.; MARCHINI, J.S.; BIANCHI, M.L.P. Gastrointestinal tract and iron absorption: a review. **Alimentary Nutrition**, v.9, p. 103-25, 1998.
- LIEU, P.T.; HEISKALA, M.; PETERSON, P.A.; YANG, Y. The roles of iron in healthy and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v.22, p. 1-87, 2001.
- LING, J.; FENG, L.; LIU, Y.; JIANG, J.; JIANG, W.-D; HU, K.; LI, S.-H.; ZHOU, X.,-Q. Effects of dietary iron levels on growth, body composition and intestinal enzyme activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Aquaculture Nutrition**, v.16; p.616–624, 2010.
- LIM, C., SEALEY, W.M.; KLESIUS, P.H. Iron methionine and iron sulfate as sources of dietary iron for channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Journal of World Aquaculture Society**, v.27, p.290–296, 1996.

- LIM, C.; WEBSTER, C.D. (Ed.). **Tilapia: biology, culture, and nutrition**. New York: Food Products Press, 2006. 678p. MILLER, J. K.; RANSEY, N.; MADSEN, F.C. Elementos vestigiarios. **Fisiología digestiva y nutrición**, p.391-457, 1993.
- LORENTZEN, M.; MAAGE, A. Trace element status of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed a fish-meal based diet with or without supplementation of zinc, iron, manganese and copper from first feeding. **Aquaculture and Nutrition**, v.5, p.163–171, 1999.
- MILLER, J.K.; RANSEY, N.; MADSEN, F.C. Elementos vestigiarios. **Fisiología digestiva y nutrición**, p.391-457, 1993.
- MURAI, T.; ANDREWS, J. W.; SMITH, R.G. Effects of dietary copper on channel catfish. **Aquaculture**, v.22, p.353-357, 1981.
- NEVES, J.V.; WILSON, J.M.; RODRIGUES, P.N.S. Transferrin and ferritin response to bacterial infection: The role of the liver and brain in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v.33, p.848–857, 2009.
- NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of fish**. Public Review Draft, July, 2011. Washington, DC: NRC.
- RANZANI-PAIVA, M.J.; A.T. SILVA-SOUZA. 2004. **Hematologia de Peixes Brasileiros**. Pages 89-120 in M.J. Ranzani-Paiva, R.M. Takemoto, and M.A.P. Lizama, ed. Sanidade de Organismos Aquáticos. São Paulo: Varela.
- RIGOS, G.; SAMARTZIS, A.; HENRY, M.; FOUNTOULAKI, E.; COTOU, E.; SWEETMAN, J.; DAVIES, S.; NENGAS, I. Effects of additive iron on growth, tissue distribution, haematology and immunology of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. **Aquaculture International**, v.18, p.1093–1104, 2010.
- SEALEY, W.M., LIM, C., KLESIUS, P.H. Influence of the dietary level of iron from iron methionine and iron sulfate on immune response and resistance of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of World Aquaculture Society**, v.28, p.142–149, 1997.
- SHAW, B.J.; HANDY, R.D. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquatic Toxicology**, v.76, p.111–121, 2006.
- SHIAU, S.Y.; SU, L.W. Ferric citrate is half as effective as ferrous sulfate in meeting the iron requirement of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Journal of Nutrition**, v.133, p.483–488, 2003.
- TACON, A.G. **Nutritional Fish Pathology: Morphological Signs of Nutrient Deficiency and Toxicity in Farmed Fish**, v.330. FAO Fisheries Technical Paper. FAO, Rome, Italy, 1992, p.75.

- TAN, X.-Y.; LUO, Z.; LIU, X.; XIE, C.-X. Dietary copper requirement of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquaculture Nutrition**, v.17; p.170-176, 2011.
- TORRECILLAS, S.; A. MAKOL; M.J. CABALLERO; D. MONTERO; ROBAINA, L. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish Shellfish Immunology**, 23: 969-981, 2007.
- UKAWA, M.; TAKII, K.; NAKAMURA, M.; AKUTSU, M.; KUMAI, H.; TAKEDA, M. Effect of iron supplements on a soy protein concentrate diet on hematology of yellowtail. **Fisheries Science**, v.60(2), p.165-169, 1994.
- VAL, A.L.; SILVA, M.N.P.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. **Estresse em Peixes: ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos**. São Paulo: Varela, 2004.
- VAL, A.L.; OLIVEIRA, A.M.; FIORINI, M.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. **Nutrição e estresse em peixes da Amazônia**. In: SIMPÓSIO de NUTRIÇÃO e SAÚDE de PEIXES, 2005, Botucatu. Anais... Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – FMVZ, Universidade Estadual Paulista, 2005, p.84-92.
- VIJAYAN, M.M.; REDDY, P.K.; LEATHERLAND, J.F.; MOON, T.W. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout. A study using the steroid analog RU486. **General Compendium of Endocrinology**, v.96, p.75-84, 1994.
- WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v.151, p.185–207, 1997.
- 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 18 (Anais) Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2007. p. 21-34.
- WENDELAAR-BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiology Review**, v.77, n.3, p.591-625, 1997.
- YE, C.X.; LIU, Y.J.; MAI, K.S.; TIAN, L.X.; YANG, H.J.; NIU, J.; HUANG, J.W. Effect of dietary iron supplement on growth, haematology and microelements of juvenile groupers, *Epinephelus coioides*. **Aquaculture**, v.13, p.1–7, 2007.

CAPÍTULO II

DESEMPENHO E PERFIL HEMATOLÓGICO DA TILÁPIA-DO-NILO
ALIMENTADA COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM FERRO E COBRE E
SUBMETIDA AO ESTRESSE POR CALOR

Resumo

O ferro e o cobre desempenham papel importante no funcionamento do organismo, sendo cofatores de enzimas, atuando ainda na síntese de ácidos nucléicos e células sanguíneas. A fim de avaliar o efeito da suplementação de ferro e cobre na dieta no desempenho de tilápia-do-Nilo e resposta hematológica do estresse por calor, 192 alevinos ($6,23 \pm 0,22$ g) foram distribuídos aleatoriamente em oito tanques por 123 dias e alimentados com dietas práticas suplementadas com níveis crescentes de ferro (30,0, 60,0, 120,0 e 180,0 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /kg de dieta) e cobre (4,0 e 12 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em esquema fatorial com quatro repetições. Foram determinados o ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, peso final e porcentagem de sobrevivência e concentração de ferro e cobre no fígado. Ao final do experimento foram realizadas análises hematológicas (contagem de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, contagem diferencial e total de leucócitos, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e proteína plasmática total), determinação da atividade oxidativa da ceruloplasmina sérica, índice de saturação de transferrina e em seguida os animais foram submetidos a estresse por calor (32 °C) por três dias e avaliados os mesmos parâmetros hematológicos. Não foram observadas diferenças estatísticas para o desempenho produtivo e perfil hematológico. Observou-se aumento na concentração hepática dos minerais com a adição de ferro e cobre nas dietas, sendo a atividade enzimática também aumentada no período pós estresse por calor. Conclui-se que a interação do ferro e cobre em dietas práticas para a tilápia do Nilo, para as suplementações estudadas, resulta em alterações no perfil hematológico e na mobilização dos minerais nos tecidos corporais.

Palavras-chave: desempenho produtivo, hematologia, diferencial de leucócitos, ceruloplasmina, temperatura.

GROWTH PERFORMANCE AND HEMATOLOGICAL PROFILE OF NILE
TILAPIA FED DIETS SUPPLEMENTED WITH IRON AND COPPER AND
SUBMITTED TO HEAT STRESS

Abstract

Iron and copper play an important role in the functioning of organism, enzymes and cofactors, acting also in the synthesis of nucleic acids and blood cells. In order to assess the effect of dietary iron and copper supplementation on the growth performance of Nile tilapia and the haematological response under heat stress, 192 fingerlings (6.23 ± 0.22 g) were randomly distributed into eight tanks for 123 days and fed practical diets supplemented with increasing levels of iron (30.0, 60.0, 120.0 and 180.0 mg of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ kg^{-1} diet) and copper (4.0 and 12 mg of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) with four repetition in factorial. Were determined weight gain, feed intake, feed conversion ratio, final weight and survival percentage and iron and copper liver accumulation. Oxidative activity of ceruloplasmin and haematological analyses (red blood cell count, haematocrit, haemoglobin, total leucocyte and differentiation, mean corpuscular volume, mean corpuscular haemoglobin and total plasma protein), transferrin saturation index were carried out and then subjected to heat stress (32°C) for three days, after the haematological parameters were analysed. There were no statistical differences in growth performance and hematological profile. An increase in liver concentrations of minerals with addition supplementation of iron and copper in the diet, and the enzyme activity also increased in the period after heat stress. It is conclude that the interaction of iron and copper in practical diets for Nile tilapia, for supplementary studied, resulting in changes in hematological profile and mobilization of minerals in body tissues.

Key-words: performance, haematology, differential leukocyte, ceruloplasmin, temperature.

1. Introdução

O estudo de minerais em dietas para peixes abrange diversas hipóteses da influência dos mesmos no organismo animal. A busca pelo nível ótimo de inclusão revela também os efeitos do excesso e deficiência, adequando-se ao melhor desempenho produtivo e elucidando as funções na fisiologia animal e suas implicações.

Dentre os minerais estudados relacionando-se a nutrição e saúde de peixes destacam-se o ferro e o cobre. O ferro (Fe) é componente de hemoglobina, mioglobina, enzimas de ampla atuação no organismo, além de participar de várias reações bioquímicas, como síntese de ácidos nucleicos e proteínas, proliferação celular, transporte de elétrons, respiração celular, produção de ATP (Trifosfato de adenosina) e regulação da expressão gênica (MILLER et al., 1993; BOLDT, 1999), tendo vital importância para manutenção da homeostase corporal. Grande parte do ferro circulante no organismo é reciclado da regeneração periódica dos eritrócitos, sendo a parte não utilizada excretada via bile pelo intestino (NRC, 2011).

O cobre (Cu) participa de grande número de processos biológicos, principalmente como co-fator de enzimas, como a citocromo oxidase, superóxido dismutase, lisil oxidase, dopamina hidroxilase e tirosinase (WATANABE et al., 1997). Participa na formação do colágeno e elastina, ressaltando que a deficiência pode causar desmineralização dos ossos e fragilidade dos vasos sanguíneos (DEVLIN, 1998). O cobre é co-fator da formação da enzima ALA-desidrogenase, participante da síntese do heme, ressaltando a influência do mineral na absorção e metabolismo do ferro, pela formação de hemoglobina nos vertebrados (HRUBEC & SMITH, 2006; NRC, 2011).

O ferro e o cobre possuem, isoladamente, suas exigências definidas para a tilápia-do-Nilo, sabendo-se a íntima relação dos minerais desde a competição por absorção e influências conjuntas nos metabolismos, tornando-se necessário conhecer os efeitos nos níveis exigidos pelos animais desses minerais quando em desbalanço em dietas práticas. A exigência obtida para a espécie em estudo foi de 4 e 60 mg/kg de ração de cobre e ferro, respectivamente (KLEEMAN, 2003; FERRARI et al., 2004).

O presente estudo teve por objetivo avaliar a interação de níveis de ferro e cobre no desempenho produtivo e respostas hematológicas da tilápia-do-Nilo submetidas a estresse por calor.

2. Material e Métodos

O experimento foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Univ. Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2. Foram avaliados quatro níveis de suplementação de ferro na dieta, na forma de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /kg ração), a saber: 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (50% da exigência nutricional para a tilápia-do-Nilo), 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (exigência nutricional), 120 e 180 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, duas e três vezes a exigência nutricional, respectivamente e dois níveis de cobre na forma de sulfato de cobre, 4,0 (exigência nutricional) e 12 (três vezes a exigência nutricional) mg/kg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /kg ração.

As dietas foram formuladas para atender a exigência em 26,0 % de proteína digestível e 3000 $\text{kcal} \cdot \text{kg}^{-1}$ de ração em energia digestível, de acordo com os valores de proteína e aminoácidos digestíveis de acordo com Furuya et al., 2010 (Tabela 1). Utilizou-se suplemento vitamínico e mineral isentos de suplementação de ferro e cobre. Após a pesagem e homogeneização dos ingredientes das dietas, adicionou-se água a 55,0 °C, na proporção de 23% do peso total da mistura. A mistura foi extrudada em extrusor de rosca simples, sendo após desidratada em estufa de ventilação forçada à 55,0 °C, durante 24 horas.

2.1 Desempenho Produtivo

O desempenho produtivo foi avaliado em decorrência de níveis de suplementação de ferro e cobre em dietas práticas. Os animais foram alojados em trinta e duas gaiolas, em quadruplicata, perfazendo quatro repetições por tratamento. Os conjuntos de aquário eram dotados de sistema de filtragem de água por meio de biofiltro e sistema de aquecimento, controlado por termostato, sendo que a temperatura mantida foi de $26,0 \pm 0,4$ °C. Distribuiu-se 192 alevinos de tilápia-do-Nilo, invertidos sexualmente, com peso médio inicial de $6,0 \pm 0,7$ g, perfazendo lotação de seis peixes/gaiola. A duração do experimento foi de 123 dias.

Quinzenalmente foi efetuado o monitoramento da qualidade da água, avaliando-se os parâmetros físico-químicos como: oxigênio dissolvido e pH. Semanalmente foram realizadas sifonagens e limpezas dos aquários experimentais para a retirada de eventuais sobras de dietas e acúmulo de excretas. As análises foram efetuadas utilizando-se sonda multiparâmetros (Modelo 556 MPS) YSI[®]. Os peixes foram pesados em balança digital (0,01g) ao início e final do período experimental, para determinação do consumo de ração, ganho de peso, ganho de peso diário, conversão alimentar aparente e porcentagem de sobrevivência.

2.2 Estresse por calor

Após o final das avaliações de desempenho produtivo aumentou-se gradativamente a temperatura da água em 6,0 °C até atingir 32,0 °C. A concentração e saturação de oxigênio dissolvido foram reduzidas a valores inferiores a 2,0 mg/L e 20%. Ao final de três dias foram avaliados os mesmos parâmetros hematológicos iniciais de seis peixes/tratamento.

2.3 Análises hematológicas

As avaliações hematológicas foram efetuadas antes e após o estresse por calor. No momento anterior ao estresse, os animais tiveram sangue coletado no último dia da avaliação do desempenho produtivo. A coleta de sangue foi efetuada anteriormente às biometrias para que não houvesse interferência no perfil hematológico em função do estresse inerente a esta ação. Neste momento foram avaliados oito peixes/tratamento.

Para a realização das análises hematológicas os peixes foram anestesiados (benzocaína, 1,5g/15 L de água) e, após estarem completamente sedados, foi realizada coleta de sangue por punção da veia caudal, com seringa de 1,0 mL com anticoagulante EDTA a 3,0%.

A contagem de eritrócitos foi realizada pelo método do hemocítômetro em câmara de Neubauer, utilizando-se Azul de Toluidina Merck[®] a 0,01% diluído em solução fisiológica 0,9%, na proporção 1:200. A taxa de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se kit comercial Hemoglobina

Analisa Diagnóstica[®] para determinação colorimétrica. O hematócrito foi obtido utilizando-se o método do microhematócrito. As variáveis acima apresentadas foram avaliadas utilizando-se as técnicas descritas por Jain (1986). Foram determinados os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), úteis na classificação morfológica das anemias e avaliação da resposta eritropoiética, usando-se as seguintes fórmulas: VCM (fL) = hematócrito x 10/ nº de eritrócitos x 10⁶; CHCM (%) = (hemoglobina x 100)/hematócrito.

A contagem diferencial foi realizada em microscópio utilizando-se aumento 100 em óleo de imersão, sendo as extensões sanguíneas utilizadas coradas com May-Grünwald Giemsa. Foram contadas 200 células, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular de interesse e posteriormente feita a contagem de 2000 células para estabelecimento do número total de trombócitos, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos.

A proteína plasmática total (PPT) foi mensurada por meio do uso de refratômetro manual de Goldberg, pela quebra do capilar de microhematócrito logo acima da camada de leucócitos, após a leitura do hematócrito. Para a análise de albumina foram utilizadas as mesmas amostras de sangue colhidas para o hemograma. Estas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 3000 rpm durante 10 minutos para obtenção do plasma, que foi armazenado a -20,0 °C para posterior análise. A quantidade de albumina foi determinada pelo método do verde de bromocresol utilizando-se kit comercial Albumina Analisa Diagnóstica[®] para determinação colorimétrica. De posse dos resultados de albumina e proteína plasmática total foi determinada a quantidade de globulina no plasma.

2.4 Avaliação do ferro plasmático, índice de saturação da transferrina

Para a avaliação do ferro plasmático e da capacidade total de ligação do ferro (CTFL) as amostras de sangue foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (Eppendorf[®]) a 3000 rpm durante 10 minutos para obtenção do plasma, armazenados a -20°C. Foram utilizados os kits comerciais ferro sérico Analisa Diagnóstica[®] e capacidade de ligação de ferro Analisa Diagnóstica[®], respectivamente. O cálculo do

índice de saturação da transferrina foi realizado pela fórmula: $IST = (\text{Ferro sérico}/\text{CTLF}) \times 100$, sendo CTFL a capacidade total de ligação do ferro e proveniente da fórmula: $\text{CTLF} = (\text{capacidade latente de ligação do ferro} + \text{ferro sérico})$.

2.5 Quantificação dos minerais e disponibilidade

Para determinação dos coeficientes de disponibilidade dos minerais avaliados, foi adotada a metodologia recomendada por Pezzato et al. (2004). Os coeficientes foram calculados pela técnica de proporções, com base nos teores de óxido de cromo-III e do mineral nas rações e fezes, segundo Cho & Slinger (1979).

Para este ensaio foram utilizados 100 juvenis de tilápia-do-Nilo, acondicionados em caixas de 250 L, dentro de gaiolas, com sistema de circulação de água, aeração suplementar e filtragem física e biológica. A cada dois dias os animais foram transferidos no período da tarde para aquários de coleta de fezes, tendo sido previamente submetido a regime de alimentação intensificado. Estes animais permaneciam por todo o período noturno e na manhã do dia seguinte as fezes foram coletadas, acondicionadas para posterior secagem e os animais retornavam para os aquários de alimentação, reiniciando o ciclo de coletas. Para determinação da concentração dos minerais, as rações, fezes e fígados foram digeridos com ácido nítrico e ácido perclórico concentrados para posterior quantificação por espectrometria de absorção atômica por chama (Shimadzu AA-6800).

2.6 Análise enzimática

A atividade oxidativa ceruloplasmina sérica foi quantificada no soro coletado dos animais antes e pós-estresse por calor, utilizando-se a o-dianisidina como substrato do meio reacional que recebia como fonte da enzima em estudo uma alíquota de soro coletado. Por meio de medições no decorrer de tempo específico por espectrofotometria visível, determinou-se a formação de composto específico resultante da reação da enzima com o substrato, pelo método de Schoslnsky et al. (1974) adaptado.

2.7 Análises estatísticas

Os resultados de desempenho produtivo e concentração hepática de ferro e cobre foram avaliados utilizando-se a técnica de análise de variância (ANOVA) para o esquema de dois fatores no delineamento inteiramente casualizado (ZAR, 2009). Os dados do perfil hematológico e atividade oxidativa da ceruloplasmina foram submetidos a análise de variância multivariada (MANOVA), complementada com o teste de comparação múltiplas de Bonferroni, considerando o nível de 5% de significância (JOHNSON & WICHERN, 2002).

3. Resultados

A Tabela 2 apresenta os resultados de ganho de peso, consumo de ração, peso médio final, conversão alimentar e porcentagem de sobrevivência de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com rações suplementadas com ferro e cobre. Não houve efeito da inclusão dos minerais sobre as variáveis de desempenho produtivo.

Nas Tabelas 3 e 4 estão apresentados os valores médios da contagem de eritrócitos, taxa de hemoglobina, porcentagem de hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média e proteína plasmática total de juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com rações contendo níveis de suplementação de ferro e cobre, antes e pós-estresse por calor. Observou-se que os parâmetros hematológicos não foram influenciados significativamente pelas diferentes inclusões dos minerais nas dietas, exceto o volume corpuscular médio que foi significativamente maior na dieta com inclusão de 12 mg.kg⁻¹ de sulfato de cobre e 30 mg.kg⁻¹ de sulfato ferroso, tanto em comparação com os níveis ferro estudados, quanto para os de cobre, não havendo diferença entre os momentos dos estudos.

Na tabela 5 encontram-se os valores médio de ferro plasmático, capacidade latente de ligação do ferro, capacidade total de ligação do ferro e índice de saturação de transferrina no soro de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçados com níveis de suplementação de ferro e cobre na dieta, antes e pós-estresse por calor. Não foi observada diferença entre os tratamentos avaliados e os valores obtidos estão dentro da faixa de normalidade para a espécie.

Nas tabelas 6 e 7 apresentam-se os resultados da atividade oxidativa da ceruloplasmina sérica e valores de concentração de ferro e cobre hepáticos para juvenis de tilápia-do-Nilo arraçadas com dietas suplementadas com ferro e cobre, antes e pós estresse por calor. Foi observado aumento na concentração de cobre no fígado dos animais que foram alimentados com crescentes níveis de ferro suplementados para a inclusão de 4 mg de sulfato de cobre/kg da dieta. Igualmente foi observado aumento na concentração de ferro hepático com o aumento da inclusão do mesmo nas dietas, para a mais alta suplementação de cobre. Para a atividade enzimática observou-se maior atividade da ceruplasmina nos peixes alimentados com a dieta suplementada com 180 mg de ferro.kg⁻¹ para a alta inclusão de cobre (12 mg de cobre/kg de ração), demonstrando que em situação de estresse ocorreu aumento da atividade enzimática.

Nas tabelas 8 e 9 apresentam-se os resultados da contagem total de leucócitos e diferencial dos juvenis de tilápia-do-Nilo arraçadas com dietas suplementadas com ferro e cobre, antes e pós-estresse por calor. Na diferenciação de leucócitos foi observado aumento na proporção de neutrófilos para as dietas suplementadas com 30 mg de ferro e 4 mg de cobre/kg de ração em relação aos momentos de avaliação e entres as outras inclusões de ferro para a mesma suplementação de cobre.

4. Discussão

A importância dos minerais ferro e cobre na nutrição e saúde de peixes tem sido descrita por vários autores (SEALEY et al., 1997; BERNTSEN et al., 2000; HASHEMI et al., 2008; LING et al., 2010). Em função das diferentes ações desenvolvidas por esses minerais, bem como o possível efeito tóxico do excesso destes, o organismo animal possui mecanismos regulatórios, que controlam a absorção e garantem a homeostase (EIMERIT et al., 2001). Desta forma, a não influência dos minerais no ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e sobrevivência, mesmo em concentrações acima da exigência nutricional para tilápia-do-Nilo, podem sugerir que houve ação dos mecanismos reguladores de absorção, não permitindo que, tanto o ferro, quanto o cobre compromettesse o crescimento dos peixes.

Resultados semelhantes foram descritos por Ukawa et al. (1994) para o yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) com nível mínimo de 0 e máximo de 1000mg Fe/kg

dieta; por Kleemann (2003) para tilápia-do-Nilo com níveis de 20 a 160 mg Fe.kg⁻¹; por Rigos et al. (2010) para red seabream (*Sparus aurata*), com níveis de 50 mínimo e 300 mg Fe/kg máximo. Diferentemente deste estudo, o efeito do excesso de ferro no desempenho produtivo foi descrito por Andersen et al. (1997) para salmão do Atlântico (*Salmo salar*) utilizando-se níveis quinze vezes acima da exigência nutricional, sendo descrito inclusive a redução na concentração hepática de cobre. Shaw & Hardy (2006) descreveram, para tilápia-do-Nilo, redução no consumo de ração e ganho de peso com rações suplementadas com 2000 mg Cu/kg ração.

Variações no perfil hematológico de espécies de peixes são frequentemente observadas em estudos de suplementação dietária de cobre e ferro, tanto em níveis abaixo ou acima da exigência nutricional, sendo notadas alterações no hematócrito, número de eritrócitos, taxa de hemoglobina e outros parâmetros (MURAI et al., 1981; LIM et al., 1996; ABDEL-TAWWAB et al., 2007; ARIDE et al., 2010). No presente estudo, os níveis de suplementação dos minerais não foram o suficiente para desencadear alterações no perfil hematológico, mesmo quando submetidos ao estresse por calor, sugerindo que os níveis obtidos nas dietas, mesmo abaixo da exigência nutricional, foram suficientes para manutenção da hematopoiese adequada, e que as suplementações acima das exigências não propiciaram quadro de toxicidade. Foi observado aumento no volume corpuscular médio para os peixes alimentados com alta inclusão de cobre e baixa de ferro, indicando a presença de células imaturas no sangue sob efeito dos minerais na eritropoiese.

Outra hipótese a ser considerada é a de que, em condições abaixo da exigência nutricional, os peixes podem ter absorvido tanto o ferro, quanto o cobre da água e desta forma mantido a eritropoiese (WATANABE et al., 1997). Igualmente, o período experimental pode não ter sido suficiente para os animais manifestarem sinais clínicos de deficiência, dentre eles o quadro de anemia hipocrômica microcítica, caracterizada quando se tem valores abaixo do normal, para cada espécie, do número total de eritrócitos, taxa de hemoglobina e/ou volume corpuscular e sendo o sinal clínico mais tardio da deficiência de ferro (HRUBEC & SMITH, 2006). Os animais alimentados com níveis abaixo da exigência nutricional de ferro e alimentados com as dietas contendo alto nível de cobre, que poderia interferir na capacidade absorptiva do ferro, não desenvolveram o quadro de anemia descrito acima, indicando que os níveis finais

da dieta, considerando a quantidade de minerais dos alimentos da formulação, propiciaram a manutenção da homeostase.

Resultados semelhantes ao encontrado nesse estudo foram observados por Ye et al. (2007) em experimento desenvolvido com garoupas (*Epinephelus coiodes*) com níveis de 0 a 250 mg.kg⁻¹ de suplementação de sulfato ferroso e Shiau & Su (2003) com tilápia-do-Nilo, observando que a de 50 mg.kg⁻¹ de sulfato ferroso na dieta foi o suficiente para a manutenção do perfil hematológico e que o excesso não ocasionou efeitos deletérios. Avaliando-se os efeitos da suplementação de cobre na dieta Kim & Kang (2004) utilizando níveis crescentes até 500 mg.kg⁻¹ de cobre na dieta para juvenis de rockfish (*Sebastes schlegeli*) observaram maior concentração do mineral pelo organismo dos animais mas também não observaram alterações no perfil hematológico, resposta também observadas para estudos com bagres do canal (*Ictalurus punctatus*) (MURAI et al., 1981; GATLIN et al., 1989).

As médias de valores obtidos para a concentração de ferro sérico, IST, CLLF e CTLF estão dentro dos valores considerados ótimos para o bom funcionamento do metabolismo corporal de ferro. Os valores para o índice de saturação de transferrina abaixo de 16% demonstram concentração corporal insuficiente de ferro para a eritropoiese adequada e valores acima de 55% indicam condições patológicas (COOK et al., 1992). Foi observado, no período pós estresse, aumento da concentração de ferro sérico, da atividade oxidativa da ceruloplasmina e diminuição do IST, indicando que em condições de estresse o ferro no sangue não está ligado a transferrina, sendo disponibilizado para o organismo por meio da atividade da ceruloplasmina e acumulado na forma de ferritina nos enterócitos e no fígado (KANEKO, 1997). Em estudos com bagre do canal observou-se aumento do ferro plasmático e do IST, quando comparados com os níveis sem suplementação de ferro nas dietas, porém a CTLF não foi alterada entre os tratamentos (GATLIN & WILSON, 1986; LIM et al., 1996).

Foi observado aumento da atividade enzimática no período de estresse por calor para as altas inclusões de ferro na dieta e para o nível mais alto de cobre, indicando maior capacidade da enzima em transformar os íons de ferro do estado ferroso para o férrico, disponibilizando-o para as reservas de ferritina corporal, destinando-se para a ligação do mineral a molécula de transferrina por exemplo. Distúrbios inflamatórios ou em situações de estresse os níveis de ferro sérico tendem a diminuir, sendo estocados na

forma de ferritina nos enterócitos e hepatócitos, diferentemente dos níveis de cobre e ceruloplasmina, que nessas situações tendem a se elevar (KANEKO, 1997; ARRENDONDO & NUÑEZ, 2005).

A concentração de ferro hepático foi aumentada para animais alimentados com os níveis altos de ferro e cobre, observando-se também aumento da atividade enzimática para esses níveis. Pode-se inferir que o maior aporte de cobre na dieta proporcionou melhor absorção de ferro e seu acúmulo pelo organismo, corroborando com Lanno et al. (1985) que observaram que o aumento do cobre dietário aumentou a concentração de ferro no fígado de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), assim como Carraquiriborde et al. (2004) que, para a mesma espécie, observaram também acúmulo hepático na concentração de 1500 mg.kg⁻¹ de ferro na dieta. Foi observado aumento na concentração de cobre hepático para as altas inclusões de ferro, indicando a capacidade do transportador de membrana bivalente dos enterócitos absorver mais cobre em concentrações baixas de ferro no lúmen intestinal, sendo aquele após entrar na corrente sanguínea é metabolizado e acumulado no fígado (GUNSHIN et al. 1997; MORIYA et al. 2008). Resultados distintos foram observados por Andersen et al. (1997) utilizando-se níveis cinco vezes mais altos do que os avaliados no presente estudo, os quais determinaram que altas inclusões de ferro ocasionou diminuição da concentração de cobre hepático para os mais altos níveis de inclusão em dietas para salmão do Atlântico, atribuindo-se a competição pela absorção nas membranas dos enterócitos.

A proporção de neutrófilos nas células brancas sanguíneas foi maior para os animais do tratamento com suplementação abaixo da exigência nutricional de ferro (30 mg de Fe/kg de dieta) e com a suplementação exigida de cobre (4 mg de Cu/kg de dieta) em relação as demais suplementações nos momentos avaliados. Atribui-se esse efeito a perturbação do estado de homeostase do organismo do animal, que como resposta ao agente estressor libera na corrente sanguínea mais neutrófilos (SECOMBES, 1996). A baixa concentração de ferro promoveu desequilíbrio na homeostase e ativação dos mecanismos de defesa do organismo, já que sua deficiência, assim como para outros nutrientes, gera transtornos no funcionamento do organismo (TIZARD, 2002; DEVLIN, 1998).

5. Conclusões

Conclui-se que a interação do ferro e cobre em dietas práticas para a tilápia do Nilo, para as suplementações estudadas, resulta em alterações no perfil hematológico e na mobilização dos minerais nos tecidos corporais.

6. Referências bibliográficas

- ABDEL-TAWWAB, M.; MAMDOUH, A.A.; MOUSA, F.; ABBASS, E. Growth performance and physiological response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.) fed organic selenium prior to the exposure to environmental copper toxicity. **Aquaculture**, v.272, p.335–345, 2007.
- ANDERSEN, F.; LORENTZEN, M.; WAAGBO, R.; MAAGE, A. Bioavailability and interactions with other micronutrients of three dietary iron sources in Atlantic salmon, *Salmo salar*, smolts. **Aquaculture Nutrition**, v.3, p.239–246, 1997.
- ARIDE, P.H.R.; FERREIRA, M.S.; DUARTE, R. M.; OLIVEIRA, A.M. Ascorbic Acid (Vitamin C) and Iron Concentration in Tambaqui, *Colossoma macropomum*, Iron Absorption. **J. World Aqua. S.**, v.41, p.145-156, 2010.
- ARREDONDO, M.; NUÑEZ, M.T. Iron and copper metabolism. **Trace Elements and Human Health**, v.26, p.313-327, 2005.
- BERNTSEN, M.H.G.; LUNDEBYE, A.K.; MAAGE, A. Effects of elevated dietary copper concentrations on growth, feed utilization and nutritional status of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. **Aquaculture**, v.174, p.167–181, 2000.
- BOLDT, D.H. New perspective on iron: an introduction. **Am. J. Med. Sci.**, v.318, p.207-212, 1999.
- CARRIQUIRIBORDE, P., HANDY, R.D., DAVIES, S.J. Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. **J. Exp. Biol.**, v.207, p.75–86, 2004.
- CHO, C.Y.; SLINGER, S.J. Apparent digestibility measurements in feedstuffs for rainbow trout.. In JE Halver & K Tiews (Eds.). **Finfish nutrition and fishfeed technology, II**, Berlin, Alemanha, 1979, p. 239–247.
- COOK, J.D.; BAYNES, R.D.; SKIKNE, B.S. Iron deficiency and the measurement of iron status. **Nutric. Res. Reviews**, v.5, p.189-202, 1992.
- DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações químicas**. 4 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1998. 1007p.
- EIMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomedical Pharmacoter**, v.55, p.333-9, 2001.
- FERRARI, J.E.C.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; GONÇALVES, G.S.; HISANO, H.; KLEEMAN, G.K. Níveis de cobre em dietas para a tilápia-do-Nilo, *Oreochromis*

- niloticus. **Acta Scientiarum**. Animal Sciences Maringá, v. 26, n. 4, p. 429-436, 2004.
- FURUYA, W.M. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Toledo: GFM, 100p. 2010.
- GATLIN, D.M. & WILSON, R.P. Characterization of iron deficiency and the dietary iron requirement of fingerling channel catfish. **Aquaculture**, v.52, p.191–198, 1986.
- GATLIN, D.M.; PHILLIPS, H.F.; TORRANS, E.L. Effects os various levels os dietary cooper and zinc of channel catfish. **Aquaculture**, v.76, p. 127-134, 1989.
- GUNSHIN, H.; MACKENZIE, B.; BERGER, U.V.; GUNSHIN, Y.; ROMERO, M.F.; BORON, W.F.; NUSSBERGER, S.; GOLLAN, J.L.; HEDIGER, M.A. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. **Nature**, v.388, p.482–488, 1997.
- HASHEMI, S.; BLUST, R.; DE BOECK, G. Combined effects of different food rations and sublethal copper exposure on growth and energy metabolism in Common Carp. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.54, p.318–324, 2008.
- HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of fish. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, C.N. **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2006. p.1120-1125.
- JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Haematology**. 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1986.
- KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. Florida: Academic Press, 1997. 932p.
- JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**, 5ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002, 767p.
- KIM, S.-G; KANG, J.-C. Effect of dietary copper exposure on accumulation, growth and hematological parameters of the juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Marine Environmental Research**, v.58, p.65–82, 2004.
- KLEEMAN, G.K. **Exigência nutricional em ferro pela tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus***. 2003. Dissertação (Mestrado)– Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
- LANNO, R.P.; SLINGER, S.J.; HILTON, J.W. Maximum tolerable and toxicity levels of dietary copper in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). **Aquaculture**, v.49, p.257–268, 1985.

- LIM, C., SEALEY, W.M.; KLESIUS, P.H. Iron methionine and iron sulfate as sources of dietary iron for channel catfish *Ictalurus punctatus*. **J. World Aquacult. Soc.**, v.27, p.290–296, 1996.
- LING, J.; FENG, L.; LIU, Y.; JIANG, J.; JIANG, W.-D; HU, K.; LI, S.-H.; ZHOU, X.,-Q. Effects of dietary iron levels on growth, body composition and intestinal enzyme activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). **Aquaculture Nutrition**, v.16; p.616–624, 2010.
- MILLER, J.K.; RANSEY, N.; MADSEN, F.C. Elementos vestigiales. **Fisiologia digestiva y nutrición**, p.391-457, 1993.
- MORIYA, M.; HO, Y.H.; GRANA, A.; NGUYEN, L.; ALVAREZ, A. Copper is taken up efficiently from albumin and alpha2-macroglobulin by cultured human cells by more than one mechanism. **American Journal of Cell Physiology**, v.295, p.708–721, 2008.
- MURAI, T.; ANDREWS, J. W.; SMITH, R.G. Effects of dietary copper on channel catfish. **Aquaculture**, v.22, p.353-357, 1981.
- NRC - National Research Council. **Nutrient requirements of fish**. Public Review Draft, July, 2011. Washington, DC: NRC.
- PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M.; FURUYA, W.M.; QUINTERO-PINTO, L.G. Digestibilidade aparente da matéria seca e da proteína bruta e a energia digestível de alguns alimentos alternativos pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum**, v.26, n.3, p.329-337, 2004.
- RIGOS, G.; SAMARTZIS, A.; HENRY, M.; FOUNTOULAKI, E.; COTOU, E.; SWEETMAN, J.; DAVIES, S.; NENGAS, I. Effects of additive iron on growth, tissue distribution, haematology and immunology of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. **Aquacult Int.**, v.18, p.1093–1104, 2010.
- SEALEY, W.M., LIM, C., KLESIUS, P.H. Influence of the dietary level of iron from iron methionine and iron sulfate on immune response and resistance of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. **J. World Aquacult. Soc.**, v.28, p.142–149, 1997.
- SECOMBES, C.J. **The Nonspecific Immune System: Cellular Defenses**. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. *The Fish Immune System*. London: Academic Press, 1996. 63-105.
- SHAW, B.J.; HANDY, R.D. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquat. Toxicol.**, v.76, p.111–121, 2006.

- SHIAU, S.Y.; SU, L.W. Ferric citrate is half as effective as ferrous sulfate in meeting the iron requirement of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **J. Nutr.** v.133, p.483–488, 2003.
- SCHOSINSKY, K.H.; LEHMANN, H.P.; BEELER, M.F. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dionisidine dihydrochloride. **Clinical Chemistry**, v.20, p.1556-1563, 1974.
- TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 6. ed. 2002.São Paulo: Roca.
- UKAWA, M.; TAKII, K.; NAKAMURA, M.; AKUTSU, M.; KUMAI, H.; TAKEDA, M. Effect of iron supplements on a soy protein concentrate diet on hematology of yellowtail. **Fisheries Science**, v.60(2), p.165-169, 1994.
- WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v.151, p.185–207, 1997.
- YE, C.X.; LIU, Y.J.; MAI, K.S.; TIAN, L.X.; YANG, H.J.; NIU, J.; HUANG, J.W. Effect of dietary iron supplement on growth, haematology and microelements of juvenile groupers, *Epinephelus coioides*. **Aquaculture**, v.13, p.1–7, 2007.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**, 5ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2009, 994p.

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	Dietas (mg de sulfato ferroso/mg de sulfato de cobre por kg de ração) ¹							
	30Fe/ 4Cu	60Fe/ 4Cu	120Fe/ 4Cu	180Fe/ 4Cu	30Fe/ 12Cu	60Fe/ 12Cu	120Fe/ 12Cu	180Fe/ 12Cu
Farelo de Soja	45,63	45,65	45,65	45,66	45,64	45,65	45,65	45,66
Glúten de Milho 60	6,45	6,45	6,45	6,45	6,45	6,45	6,45	6,45
Farelo de Trigo	7,71	7,66	7,66	7,67	7,70	7,66	7,67	7,67
Milho	36,49	36,53	36,49	36,45	36,50	36,52	36,48	36,44
Óleo de Soja	0,67	0,67	0,68	0,69	0,67	0,68	0,69	0,70
L-Lisina	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
DL-Metionina	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
L-Treonina	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
L-Triptofano	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Fosfato Bicálcico	1,98	1,98	1,98	1,98	1,98	1,98	1,98	1,98
Sulfato de Ferro ⁴	0,0091	0,0181	0,0363	0,0544	0,0091	0,0181	0,0363	0,0544
Sulfato de Cobre ⁴	0,0016	0,0016	0,0016	0,0016	0,0048	0,0048	0,0048	0,0048
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Premix vit/min ²	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Vitamina C ³	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
NaCl	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Óxido de Crômio	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Disponibilidade do Ferro (%)	14,12	13,96	15,04	14,33	13,43	14,11	12,91	14,73
Disponibilidade do Cobre (%)	12,41	11,16	17,43	13,09	14,82	14,34	15,29	15,21
Concentração de Fe nas dietas (mg/kg)	412,35	378,9	429,15	398,45	384,59	345,61	298,11	402,88
Concentração de Cu nas dietas (mg/kg)	36,98	38,82	46,68	51,44	56,23	52,09	59,09	67,63

¹Dietas experimentais: 30Fe/4Cu = dieta suplementada com 30 mg/kg da dieta de ferro e suplementada com 4 mg/kg da dieta de cobre; 60Fe/4Cu = dieta suplementada com 60 mg/kg da dieta de ferro e 4 mg/kg da dieta de cobre; 120Fe/4Cu = dieta suplementada com 120 mg/kg da dieta de ferro e 4 mg/kg da dieta de cobre; 180Fe/4Cu = dieta suplementada com 180 mg/kg de ferro e 4 mg/kg de cobre; 30Fe/12Cu = dieta suplementada com 30 mg/kg da dieta de ferro e suplementada com 12 mg/kg da dieta de cobre; 60Fe/12Cu = dieta suplementada com 60 mg/kg da dieta de ferro e 12 mg/kg da dieta de cobre; 120Fe/12Cu = dieta suplementada com 120 mg/kg da dieta de ferro e 12 mg/kg da dieta de cobre; 180Fe/12Cu = dieta suplementada com 180 mg/kg de ferro e 12 mg/kg de cobre.

² Suplemento mineral e vitamínico (kg de produto): Vit. A = 1.200.000 UI; vit. D3 = 200.000 UI; vit. E = 12.000mg; vit. K3 = 2.400 mg; vit.B1= 4.800 mg; vit. B2 = 4.800 mg; vit. B6 = 4.000 mg; vit. B12 = 4.800 mg; ác. Fólico = 1.200mg; pantotenato de cálcio = 12.000 mg; vit. C = 48.000 mg; biotina= 48 mg; colina = 65.000 mg; ácido nicotínico= 24.000 mg; Mn= 4.000 mg; Zn= 6.000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg e Se = 20 mg.

³ Vitamina C Rovimix® Stay-35®, DSM Nutritional Products, Suíça.

⁴ Sulfato de ferro = 33,0 % de Fe; Sulfato de cobre = 25,01 % de Cu.

Tabela 2 - Média ± desvio padrão do ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), peso médio final (PMF), conversão alimentar (CA) e taxa de sobrevivência (TS) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de ferro e cobre.¹

Tratamentos ²	Variável			
	GP (g)	CR (g)	PMF (g)	CA TS (%) *
Fe30Cu4	529,28 ± 27,79	690,27 ± 22,38	118,56 ± 15,83	1,31 ± (0,05) 25,00 (16,67;66,67)
Fe60Cu4	451,30 ± 83,32	657,21 ± 37,15	106,54 ± 15,32	1,50 ± (0,33) 66,67 (50,00;100,00)
Fe120Cu4	499,73 ± 87,22	702,62 ± 89,75	103,22 ± 21,93	1,42 ± (0,12) 83,33 (16,67;100,00)
Fe180Cu4	424,41 ± 104,01	596,12 ± 66,47	100,66 ± 35,14	1,45 ± (0,26) 75,00 (16,67;100,00)
Fe30Cu12	439,43 ± 36,08	640,87 ± 40,02	98,28 ± 9,72	1,46 ± (0,10) 66,67 (16,67;83,33)
Fe60Cu12	469,48 ± 44,40	715,09 ± 12,94	101,83 ± 17,85	1,53 ± (0,13) 33,33 (33,3;83,33)
Fe120Cu12	471,00 ± 50,78	683,19 ± 37,76	116,75 ± 14,56	1,46 ± (0,19) 50,00 (33,3;83,33)
Fe180Cu12	458,98 ± 79,18	680,09 ± 92,99	95,29 ± 5,57	1,49 ± (0,16) 58,33 (16,67;100,00)

¹ médias isentas de letra não diferem estatisticamente;

² Cu4 e Cu12 – 4 e 12 mg/kg de suplementação de sulfato de cobre na dieta, respectivamente. Fe30, Fe60, Fe120 e Fe180 – 30, 60, 120 e 180 mg/kg de suplementação de sulfato ferroso na dieta, respectivamente;

* mediana (valor mínimo; valor máximo).

Tabela 3 - Média (desvio padrão) dos valores médios da contagem de eritrócitos (Ert), taxa de hemoglobina (Hg) e hematócrito (Htc) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas contendo níveis de inclusão de ferro e cobre, antes e pós-estresse por calor.¹

Tratamento ²	Ert (10 ⁶ /μL)		Hg (g/dL)		Htc (%)	
	Momentos de avaliação					
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Fe30Cu4	2,31 ± 0,31	2,18 ± 0,42	6,81 ± 0,64	6,41 ± 1,38	26,67 ± 0,99	24,67 ± 5,66
Fe60Cu4	2,04 ± 0,18	1,84 ± 0,36	5,89 ± 0,53	5,55 ± 1,08	22,85 ± 1,64	20,17 ± 6,21
Fe120Cu4	2,09 ± 0,31	2,11 ± 0,33	6,39 ± 1,11	6,10 ± 0,63	25,25 ± 4,68	23,42 ± 2,11
Fe180Cu4	2,05 ± 0,46	2,08 ± 0,46	6,57 ± 2,06	6,48 ± 1,39	26,17 ± 8,18	24,17 ± 5,65
Fe30Cu12	1,90 ± 0,48	1,89 ± 0,55	6,38 ± 1,62	6,34 ± 2,09	24,08 ± 6,87	26,33 ± 8,00
Fe60Cu12	1,98 ± 0,30	2,12 ± 0,31	6,17 ± 1,12	6,50 ± 0,71	23,92 ± 5,38	26,08 ± 3,51
Fe120Cu12	1,96 ± 0,26	2,00 ± 0,20	7,21 ± 1,09	6,79 ± 1,19	26,33 ± 4,54	24,08 ± 3,80
Fe180Cu12	1,82 ± 0,30	1,97 ± 0,50	6,34 ± 0,88	6,30 ± 0,89	22,33 ± 4,80	23,00 ± 3,30

¹ médias isentas de letra não diferem estatisticamente;

² Cu4 e Cu12 – 4 e 12 mg/kg de suplementação de sulfato de cobre na dieta, respectivamente. Fe30, Fe60, Fe120 e Fe180 – 30, 60, 120 e 180 mg/kg de suplementação de sulfato ferroso na dieta, respectivamente;

Tabela 4 - Média (desvio padrão) dos valores médios do volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e proteína plasmática total (PPT) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de ferro e cobre, antes e pós-estresse por calor.¹

Tratamento ²	VCM (fL)		CHCM (%)		PPT (g/dL)	
	Momentos de avaliação					
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Fe30Cu4	116,06 ± 10,36	113,57 ± 14,42A	25,54 ± 2,25	26,12 ± 2,99	4,16 ± 0,59	3,20 ± 0,72
Fe60Cu4	112,53 ± 7,94	107,78 ± 18,28A	25,83 ± 2,00	28,63 ± 4,75	3,39 ± 0,40	2,80 ± 0,83
Fe120Cu4	120,19 ± 7,79	112,07 ± 9,03A	25,44 ± 2,61	26,03 ± 0,95	3,52 ± 0,71	2,92 ± 0,26
Fe180Cu4	129,91 ± 22,69	117,30 ± 18,45A	25,48 ± 4,26	26,91 ± 0,87	3,72 ± 1,43	3,01 ± 0,52
Fe30Cu12	126,59 ± 16,72	140,61 ± 25,13bB	26,93 ± 2,89	24,28 ± 4,70	3,48 ± 1,01	3,29 ± 1,02
Fe60Cu12	120,21 ± 15,55	123,87 ± 11,21abA	25,99 ± 1,75	25,18 ± 3,40	3,24 ± 0,64	3,22 ± 0,93
Fe120Cu12	136,73 ± 13,54	121,45 ± 21,32aA	27,54 ± 2,90	28,03 ± 4,11	3,89 ± 0,85	2,73 ± 0,74
Fe180Cu12	123,26 ± 17,48	119,62 ± 14,62aA	28,79 ± 2,89	27,50 ± 2,86	3,07 ± 0,70	3,05 ± 0,50

¹Letras minúsculas: comparação dos níveis de ferro fixados cobre e momento; Letras maiúsculas: níveis de cobre fixados ferro e momento;

²Cu4 e Cu12 – 4 e 12 mg/kg de suplementação de sulfato de cobre na dieta, respectivamente. Fe30, Fe60, Fe120 e Fe180 – 30, 60, 120 e 180 mg/kg de suplementação de sulfato ferroso na dieta, respectivamente;

Tabela 5 - Média ± desvio padrão da concentração de ferro sérico, capacidade latente de ligação do ferro (CLLF), capacidade total de ligação do ferro (CTLF) e índice de saturação da transferrina (IST) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de ferro e cobre, antes e pós-estresse por calor.

Tratamentos*	Ferro Sérico (µg/dL)		CLLF (µg/dL)		CTLF (µg/dL)		IST (%)	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Fe30Cu4	113,56 ± 9,37	170,28 ± 3,17	376,11 ± 1,72	453,02 ± 4,11	489,68 ± 7,65	623,29 ± 7,27	23,18 ± 1,55	27,32 ± 0,19
Fe60Cu4	133,44 ± 4,02	185,96 ± 1,22	335,43 ± 0,86	453,02 ± 9,02	468,86 ± 3,16	638,98 ± 9,02	28,46 ± 0,67	29,11 ± 0,41
Fe120Cu4	137,22 ± 5,35	189,32 ± 1,58	320,24 ± 5,15	378,19 ± 10,07	457,47 ± 0,20	567,51 ± 9,49	30,00 ± 1,16	33,90 ± 6,16
Fe180Cu4	132,97 ± 3,35	196,60 ± 2,38	295,34 ± 0,86	466,36 ± 22,97	428,31 ± 4,21	662,96 ± 25,35	31,04 ± 0,48	29,67 ± 0,78
Fe30Cu12	107,89 ± 5,35	124,91 ± 3,96	193,32 ± 0,86	439,68 ± 1,64	301,21 ± 6,21	564,58 ± 2,32	35,81 ± 1,04	22,12 ± 0,61
Fe60Cu12	144,32 ± 3,35	189,88 ± 3,48	249,80 ± 5,15	437,36 ± 4,53	394,12 ± 1,81	627,24 ± 7,92	36,62 ± 1,02	30,28 ± 0,17
Fe120Cu12	134,38 ± 4,02	182,60 ± 1,58	260,12 ± 6,01	445,48 ± 6,56	394,51 ± 10,03	628,08 ± 8,15	34,06 ± 0,15	29,07 ± 0,13
Fe180Cu12	166,08 ± 7,36	180,92 ± 7,13	303,85 ± 12,88	432,72 ± 3,28	469,94 ± 5,52	613,63 ± 10,41	35,36 ± 1,98	29,48 ± 0,66

*Cu4 e Cu12 – 4 e 12 mg/kg de suplementação de sulfato de cobre na dieta, respectivamente. Fe30, Fe60, Fe120 e Fe180 – 30, 60, 120 e 180 mg/kg de suplementação de sulfato ferroso na dieta, respectivamente;

Tabela 6 - Média $\pm$ desvio padrão da atividade oxidativa da ceruloplasmina sérica (U/L) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de ferro e cobre, antes e pós-estresse por calor.¹

Tratamentos*	Atividade enzimática (U/L)	
	Antes	Depois
Fe30Cu4	22,50 $\pm$ 9,76	25,63 $\pm$ 3,48
Fe60Cu4	23,13 $\pm$ 9,24	33,13 $\pm$ 4,10
Fe120Cu4	19,17 $\pm$ 9,96	27,92 $\pm$ 9,10
Fe180Cu4	25,21 $\pm$ 8,16	29,79 $\pm$ 5,46
Fe30Cu12	22,92 $\pm$ 4,73	23,33 $\pm$ 2,89 a
Fe60Cu12	24,58 $\pm$ 5,67	32,71 $\pm$ 10,12 ab
Fe120Cu12	28,13 $\pm$ 7,98	27,08 $\pm$ 5,39 ab
Fe180Cu12	26,67 $\pm$ 5,81	40,21 $\pm$ 10,39 b

*Cu4 e Cu12 – 4 e 12 mg/kg de suplementação de sulfato de cobre na dieta, respectivamente. Fe30, Fe60, Fe120 e Fe180 – 30, 60, 120 e 180 mg/kg de suplementação de sulfato ferroso na dieta, respectivamente;

¹Letras minúsculas: comparação dos níveis de Ferro fixados cobre e momento; Letras maiúsculas: níveis de Cobre fixados ferro e momento;

Tabela 7 – Mediana e valores mínimos e máximo da concentração de ferro e cobre hepático (mg/g de fígado) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas contendo níveis de inclusão de ferro e cobre.

Tratamentos ²	Concentração hepática (mg/g de fígado)	
	Ferro *	Cobre *
Fe30Cu4	0,0166 (0,0128;0,0479)	0,3750 (0,3110;0,3840) a
Fe60Cu4	0,0370 (0,0293;0,0605)	0,5060 (0,4800;0,6100) b
Fe120Cu4	0,0420 (0,0266;0,1050)	0,4800 (0,4480;0,5200) b
Fe180Cu4	0,0602 (0,0379;0,0637)	0,3940 (0,3800;0,4400) ab
Fe30Cu12	0,0578 (0,0443;0,0620) a	0,5030 (0,3920;0,9410)
Fe60Cu12	0,1380 (0,0891;0,1480) b	0,7170 (0,5530;0,9840)
Fe120Cu12	0,1410 (0,0730;0,2340) b	0,3430 (0,3100;0,8010)
Fe180Cu12	0,0725 (0,0642;0,0770) ab	0,4310 (0,4140;0,4330)

¹ Letras minúsculas: comparação dos níveis de ferro fixados cobre e momento; Letras maiúsculas: níveis de cobre fixados ferro e momento;

² Cu4 e Cu12 – 4 e 12 mg/kg de suplementação de sulfato de cobre na dieta, respectivamente. Fe30, Fe60, Fe120 e Fe180 – 30, 60, 120 e 180 mg/kg de suplementação de sulfato ferroso na dieta, respectivamente;

* mediana (valor mínimo; valor máximo).

Tabela 8 - Mediana e valores mínimos e máximos do número total de trombócitos (Trb), leucócito (Lct)s, linfócitos (Lnf), leucófilos (Ntr) e monócitos (Mon) em 10^9 células/ μ L de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas contendo níveis de inclusão de ferro e cobre.¹

Tratamentos*	Trb		Lct		Lnf		Ntr		Mon	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Fe30Cu4	16,4 (11,0;19,8)	12,3 (10,5;23,7)	27,3 (24,2;36,9)	31,9 (26,4;46,2)	26,3 (22,5;31,7)	25,1 (19,3;39,6)	0,87 (0,54;3,5)	6,4 (2,7;7,7)	0,36 (0,13;1,6)	1,5 (0,39;2,1)
Fe60Cu4	12,9 (9,4;21,8)	10,8 (4,5;13,7)	24,3 (21,9;32,0)	28,0 (20,7;35,1)	21,9 (20,7;26,4)	22,4 (18,0;30,5)	1,70 (0,54;3,8)	3,5 (1,2;7,0)	0,56 (0,12;1,7)	1,0 (0,41;1,5)
Fe120Cu4	12,8 (10,8;16,2)	16,2 (11,2;31,9)	23,3 (18,5;30,2)	34,8 (25,0;43,3)	21,6 (18,1;27,1)	29,4 (22,5;38,8)	1,69 (0,37;2,0)	3,0 (1,7;5,8)	0,57 (0,31;0,90)	0,66 (0,43;2,2)
Fe180Cu4	10,2 (5,2;26,0)	16,9 (9,8;21,2)	23,1 (12,0;30,2)	34,3 (16,9;45,8)	19,8 (10,9;27,9)	19,7 (10,2;41,7)	1,67 (0,66;1,9)	2,4 (0,76;1,6)	1,0 (0,41;1,6)	1,8 (0,60;4,5)
Fe30Cu12	14,8 (7,4;22,7)	10,2 (6,8;20,0)	24,7 (15,4;28,4)	27,8 (18,0;40,1)	23,6 (14,7;25,5)	22,5 (14,8;33,0)	0,92 (0,17;1,8)	3,8 (2,6;5,5)	0,31 (0,13;0,99)	1,4 (0,40;2,4)
Fe60Cu12	16,1 (11,0;23,2)	16,8 (9,3;24,4)	24,3 (19,4;28,9)	38,9 (22,6;47,2)	22,9 (18,5;26,3)	35,7 (20,2;43,9)	0,72 (0,36;2,1)	2,0 (0,56;3,2)	0,45 (0,24;0,87)	1,1 (0,65;1,8)
Fe120Cu12	12,3 (9,2;17,8)	14,7 (10,3;18,4)	23,1 (17,6;31,3)	32,7 (18,0;41,5)	21,4 (16,6;28,8)	30,5 (16,9;35,4)	0,85 (0,35;4,5)	1,9 (0,90;7,4)	0,76 (0,35;0,94)	0,79 (0,18;2,0)
Fe180Cu12	12,1 (9,9;18,4)	12,1 (8,3;18,0)	22,4 (14,3;30,8)	30,3 (24,2;51,2)	19,8 (13,7;29,4)	26,6 (21,8;42,0)	1,21 (0,28;2,7)	2,4 (0,84;6,6)	0,58 (0,36;0,74)	0,90 (0,36;2,5)

*Cu4 e Cu12 – 4 e 12 mg/kg de suplementação de sulfato de cobre na dieta, respectivamente. Fe30, Fe60, Fe120 e Fe180 – 30, 60, 120 e 180 mg/kg de suplementação de sulfato ferroso na dieta, respectivamente;

¹ médias isentas de letra não diferem estatisticamente;

Tabela 9 - Mediana e valores mínimos e máximos do número de linfócitos, neutrófilos e monócitos (%) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com dietas contendo níveis de inclusão de ferro e cobre.¹

Tratamento ²	Linfócitos		Neutrófilos		Monócitos	
	Momentos de avaliação					
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Fe30Cu4	95,75 (86,00;97,00)	81,25 (69,00;88,00)	3,00 (2,00;9,50) α	14,50 (10,50;27,50) $B\beta$	1,25 (0,50;4,50)	4,00 (1,50;5,00)
Fe60Cu4	90,75 (89,50;98,00)	89,75 (77,00;93,00)	6,50 (2,00;8,00)	8,50 (5,00;16,50) AB	2,25 (0,00;3,00)	2,25 (1,00;6,50)
Fe120Cu4	95,25 (90,00;97,50)	81,50 (78,50;84,00)	3,75 (1,00;6,00)	7,75 (6,50;11,50) A	1,75 (1,00;3,50)	4,00 (1,50;8,50)
Fe180Cu4	93,00 (86,00;95,50)	92,75 (82,00;95,00)	4,00 (1,50;6,00)	5,50 (4,00;18,00) A	2,50 (1,50;3,50)	2,25 (1,00;5,00)
Fe30Cu12	93,25 (82,50;96,00)	85,50 (76,00;88,00)	5,00 (2,50;12,00)	11,25 (5,50;21,00)	2,50 (0,50;5,50)	3,75 (2,00;6,50)
Fe60Cu12	89,75 (82,50;92,50)	85,50 (83,50;92,50)	6,00 (5,50;9,50)	10,75 (2,00;21,50)	4,25 (2,00;8,00)	5,00 (3,00;15,00)
Fe120Cu12	94,75 (91,00;97,50)	91,50 (89,50;93,00)	3,25 (1,50;7,50)	5,25 (2,50;5,50)	1,75 (1,00;3,50)	3,00 (1,50;8,00)
Fe180Cu12	93,00 (86,00;95,50)	89,00 (82,00;95,00)	4,25 (2,00;11,50)	8,75 (3,50;13,00)	2,50 (1,50;3,50)	3,00 (1,50;5,00)

¹Letras minúsculas: comparação dos níveis de Ferro fixados cobre e momento; Letras maiúsculas: níveis de Cobre fixados ferro e momento; Letras gregas: comparação dos momentos fixados cobre e ferro;

²Cu4 e Cu12 – 4 e 12 mg/kg de suplementação de sulfato de cobre na dieta, respectivamente. Fe30, Fe60, Fe120 e Fe180 – 30, 60, 120 e 180 mg/kg de suplementação de sulfato ferroso na dieta, respectivamente;

Implicações

Este estudo apresenta as seguintes implicações:

1. Demonstrou-se neste estudo que os níveis dos minerais ferro e cobre em dietas para tilápia-do-Nilo estão adequados para o desempenho produtivo e saúde dos animais e que variações na suplementação destes em dietas possui efeitos diversos, dependente da capacidade do organismo de metabolizá-los em situação de excesso e deficiência. A competição por sítio de absorção no enterócitos é algo estudado e evidenciado, mas apesar de ter sido utilizado níveis de suplementação diferentes da exigência nutricionais os excessos não prejudicaram a absorção dos mesmos quando se avaliou a interação, demonstrando a flexibilidade do organismo na metabolização dos minerais e preservação da homeostase.
2. Os ingredientes utilizados em dietas comerciais já disponibilizam ferro e cobre em quantidades suficientes para atender as exigências nutricionais, mas devido as interferências na disponibilidade desses minerais para os peixes, suplementa-se buscando não fornecer quantidade inferior ao exigido. A utilização de dietas práticas no experimento buscou se aproximar da realidade nutricional da produção de pescado, suplementado-se com fontes conhecidas de disponibilidade dos minerais.
3. Pode-se atribuir a ausência de sinais clínicos de deficiência para os níveis de suplementação estudados ao período experimental, podendo este ter sido insuficiente para ocorrência de alterações metabólicas e aos efeitos deletérios do confronto agonístico inerente à espécie estudada, interferindo na taxa de sobrevivência.