

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

**Colina em rações para tilápia do Nilo: desempenho produtivo e respostas  
hematológicas antes e após o estímulo a frio**

**ADEMIR CALVO FERNANDES JUNIOR**

Trabalho apresentado ao Programa de  
Pós-graduação em Zootecnia como parte  
das exigências para obtenção do título de  
Mestre

**BOTUCATU – SP**  
**JULHO – 2008**

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

**Colina em rações para tilápia do Nilo: desempenho produtivo e respostas  
hematológicas antes e após o estímulo a frio**

**ADEMIR CALVO FERNANDES JUNIOR**  
**Zootecnista**

**ORIENTADORA: Prof. Dra. MARGARIDA MARIA BARROS**

Trabalho apresentado ao Programa de  
Pós-graduação em Zootecnia como parte  
das exigências para obtenção do título de  
Mestre.

**BOTUCATU – SP**  
**JULHO – 2008**

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

F363c      Fernandes Junior, Ademir Calvo, 1984-  
Colina em rações para tilápia do Nilo: desempenho produtivo e respostas hematológicas antes e após o estímulo a frio / Ademir Calvo Fernandes Junior. - Botucatu : [s.n.], 2008.  
vi, 45 f. : il., tabs.

Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008  
Orientador: Margarida Maria Barros  
Inclui bibliografia

1. Vitamina B - Complexo. 2. Peixe - Nutrição. 3. Desempenho. 4. Hematologia. 5. Tilápia (Peixe). I. Barros, Margarida Maria. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

## *Dedicatória*

*Aos meus pais*

*Ademir Calvo Fernandes e Janil Francisca dos Santos Fernandes*

*Agradeço pelo carinho, amor, ensinamentos, educação e lições de vida...*

*Minha eterna gratidão.*

*Ao meu irmão Bruno*

*Agradeço pela amizade e companhia durante todos esses anos...*

*Aos meus avós*

*Aristides e Benedicta ; José (Seu Leico) e Iranil*

*Agradeço pelo aprendizado e exemplo...*

*Aos meus tios , tias e primos por parte de pai e mãe*

*Agradeço pelos conselhos, amizade e carinho...*

*Amo todos vocês*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga, Prof<sup>a</sup>. Dra. Margarida Maria Barros, pela dedicação, incentivo, confiança, ensinamentos, amizade e paciência;

Ao Professor e amigo Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, pelos ensinamentos, confiança, amizade e sabedoria;

À Mogiana alimentos pelo fornecimento de suplemento mineral e vitamínico;

À toda equipe do Laboratório de Nutrição de Peixes – AquaNutri; Igo Gomes Guimarães, Vivian Gomes dos Santos, Dario Rocha Falcon, Hamilton Hisano, Blanca Stella Pardo Gamboa, Luis Gabriel Quinteiro, André Bordignon, Fernando Kojima Nakagome, João Fernando Albers Kock, Caroline Pelegrina Teixeira, Daniel Magalhães de Araújo, Rosângela do Nascimento Fernandes, Graciela Pessoa Martins, Marta Arianá Valentin Luzia e Altevir Signor, pela amizade, ajuda, união e respeito. Obrigado pela convivência;

Ao Professor Dr. Carlo Rossi Del Carratore, pelos ensinamentos, confiança e amizade adquirida na graduação;

À minha namorada Natália Cavalheiro Braz, pelo companheirismo, incentivo, paciência e carinho;

Ao professor Carlos Roberto Padovani, Departamento de Bioestatística, pelo auxílio na realização das análises estatísticas;

Aos professores e funcionários do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal pelo auxílio e amizade;

Aos funcionários da seção de Pós-graduação da FMVZ, Posto de Serviço Lageado, Seila Cristina Cassineli Vieira e Danilo pela atenção e auxílios;

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/UNESP, Botucatu,  
pelo privilégio em realizar o Mestrado em Zootecnia nesta instituição;

Aos funcionários do Laboratório de Bromatologia, Renato e Elaine, muito  
obrigado pelo espaço cedido e amizade;

A todos que de alguma forma colaboraram com esse trabalho

MUITO OBRIGADO...

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | PÁGINA |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>CAPÍTULO I</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |        |
| CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 01     |
| Funções e exigências nutricionais da colina.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 02     |
| Biossíntese de fosfatidilcolina .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 04     |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 11     |
| Figura 1. Composição química da etanolamina, colina, serina e glicerol .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 03     |
| Figura 2. Composição química da fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e<br>fosfatidilcolina ou lecitina .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 04     |
| Figura 3: Biossíntese de fosfatidilcolina .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 05     |
| <b>CAPÍTULO II</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |        |
| DESEMPENHO PRODUTIVO DE TILÁPIA DO NILO ARRAÇOADADA COM<br>DIETAS SUPLEMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE COLINA.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 15     |
| Resumo .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 16     |
| Abstract .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 17     |
| Introdução.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 18     |
| Material e métodos .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 19     |
| Resultados.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 20     |
| Discussão.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 21     |
| Conclusões.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 22     |
| Referências bibliográficas .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 23     |
| Tabela 1.Composição percentual dos ingredientes da dieta e químico-<br>bromatológica das dietas experimentais.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 25     |
| Tabela 2.Valores médios e desvios padrões para ganho de peso do peixe por<br>tratamento, (GPPT), consumo aparente da dieta por peixe (CADP) e<br>ganho de peso diário por peixe (GPDP) e valores de mediana e semi-<br>amplitude total para conversão alimentar aparente (CAA) e<br>sobrevivência (SBV) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados com dietas<br>suplementadas com níveis crescentes de colina durante 109 dias..... | 26     |
| Tabela 3.Valores de mediana e semi-amplitude total do extrato etéreo do fígado<br>(EEFO) e filé (EEFE) (% na matéria natural) e valores de média e desvio                                                                                                                                                                                                                                                                          |        |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| padrão para índice hepatossomático (IHS) e lipídeos no plasma em mg/ml (LPP) .....                                                                                                                                                                                                                                                                            | 26 |
| <b>CAPÍTULO III</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
| RESPOSTA HEMÁTICA DA TILÁPIA DO NILO ALIMENTADA COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE COLINA E SUBMETIDA A ESTÍMULO POR BAIXA TEMPERATURA.....                                                                                                                                                                                                    | 27 |
| Resumo .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 28 |
| Abstract .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 29 |
| Introdução.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 30 |
| Material e métodos .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 31 |
| Resultados.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 33 |
| Discussão.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 34 |
| Conclusões.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 37 |
| Referências bibliográficas .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 38 |
| Tabela 1.Composição percentual dos ingredientes da dieta e químico-Bromatológica das dietas experimentais .....                                                                                                                                                                                                                                               | 40 |
| Tabela 2.Média e desvio padrão do número de eritrócitos (Erit), porcentagem de hematócrito (Htc), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis crescentes de colina e submetidos a estímulo pelo frio ..... | 41 |
| Tabela 3.Mediana e semi-amplitude de leucócitos totais (Leuc) e média e desvio padrão do número de proteína plasmática total de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis crescentes de colina e submetidos a estímulo pelo frio .....                                                                                      | 42 |
| Tabela 4.Média e desvio padrão do número de linfócitos (Linf) e mediana e semi-amplitude de monócitos (Mon) e neutrófilos (Neut) de juvenil de tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis crescentes de colina e submetidos a estímulo pelo frio .....                                                                                   | 43 |
| <b>CAPÍTULO IV</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 44 |

## **CAPÍTULO I**

### **CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### Funções e exigências nutricionais da colina

A colina é considerada substância essencial para o organismo animal e é utilizada para regulação dos processos metabólicos, como manutenção das células estruturais, formação da lecitina, sendo responsável pelo transporte de lipídeos e formação das membranas. É também necessária para síntese de acetilcolina, um importante neurotransmissor. Outra função é a liberação de radicais metil, para reações de metilação, participando do processo de formação da metionina (McDowell, 1989; Halver, 1989). Visto este efeito, Tsiagbe et al. (1992) constataram que a colina pode ser substituída e substituir parcialmente a metionina nas rações de aves de postura, sem prejudicar a produção e qualidade dos ovos.

A forma mais comum de se encontrar a colina é em cloreto de colina, com cerca de 60,0 a 70,0% de colina disponível. Esta é estável ao calor, fato comprovado por Aburto et al. (1998), sendo que após o processo de extração do óleo e obtenção do farelo de soja o nível de colina presente se manteve; e também é estável em meio ácido, entretanto, em meio alcalino é destruída (Halver, 1989).

A colina é indispensável para o ótimo crescimento dos peixes e previne o fígado gordo (Ketola, 1976; Halver, 1989). Os animais conseguem sintetizar essa substância, porém são produzidas em quantidades insuficientes para atender à exigência, sendo necessária sua inclusão na dieta.

A exigência de colina pode ser afetada por alguns fatores, como por exemplo: a concentração de metionina, betaína, inositol, ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub>, ou a combinação de diferentes níveis e composição da gordura, carboidratos e proteínas, além da espécie, sexo e idade. Tudo isso deve ser considerado, pois influencia sua exigência e ação lipotrófica (Mookerjea, 1971). A sua deficiência nos animais pode ser medida pelo sangue no qual se observa diminuição do número de eritrócitos, queda na porcentagem de hematócrito e na taxa de hemoglobina, além de aumentar a infiltração de gordura no fígado e rins (Lewis & Southern, 2001). A deficiência de colina piora a conversão alimentar e o crescimento dos peixes, além de causar hemorragia no intestino. Entretanto, dietas ricas em farelos de trigo, soja e leguminosas, não determinaram sinais de deficiência uma vez que esses ingredientes são ricos em colina

(níveis acima de 200,0 mg de colina por 100,0 gramas de ingredientes, já são considerados ricos) (Halver, 1989).

Segundo Devlin (2000), a colina faz parte da formação de fosfolípidos, sendo estes lipídeos polares, iônicos, compostos por 1,2-diacilglicerol e uma ponte fosfodiéster que liga o esqueleto do glicerol a uma base, geralmente nitrogenada, como colina, serina ou etanolamina (Figura 1). Os fosfolípidos mais abundantes nos tecidos são a fosfatidilcolina (também chamada de lecitina), fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (Figura 2).

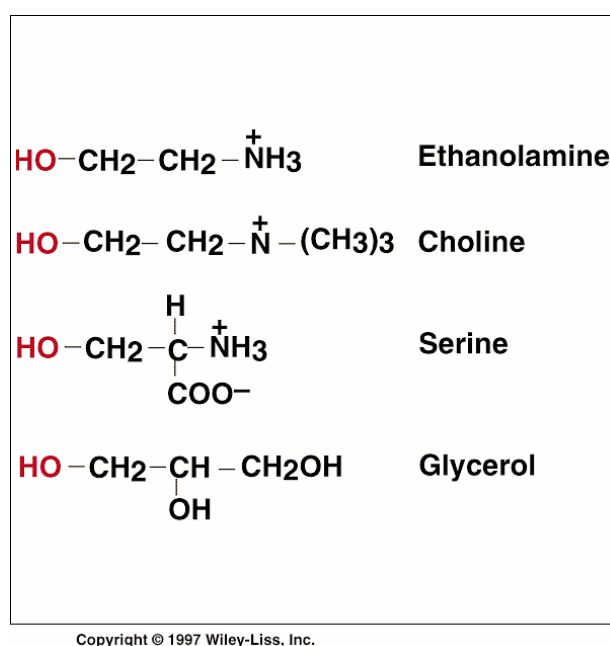


Figura 1: Composição química da etanolamina, colina, serina e glicerol (Devlin, 2000).

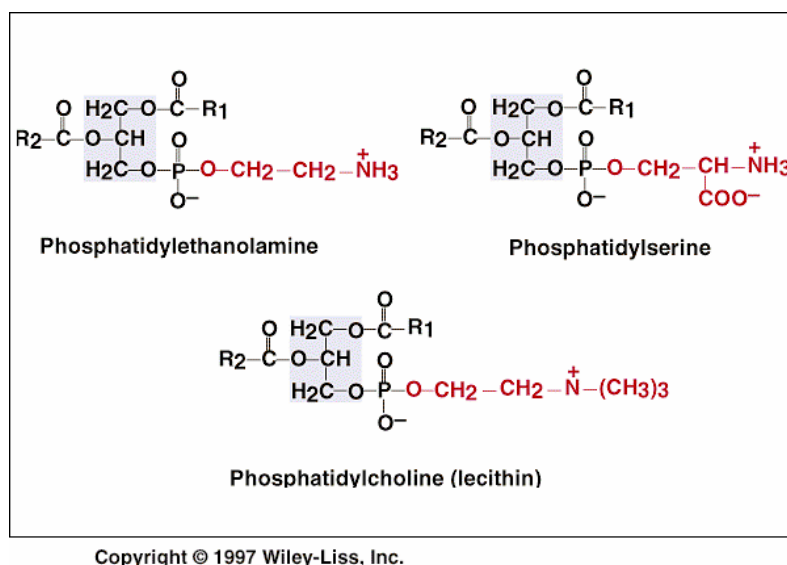


Figura 2: Composição química da fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilcolina ou lecitina (Devlin, 2000).

Em pH fisiológico, a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina não têm carga líquida e existem como *zwitterions*, enquanto que a fosfatidilserina tem carga líquida de -1, sendo, portanto, um fosfolípídeo ácido. Fosfatidiletanolamina (PE) está relacionada com a fosfatidilcolina, pois a trimetilação de PE produz lecitina. A maioria dos fosfolípídeos contém mais de um tipo de ácido graxo por molécula, de maneira que classe de fosfolípídeos de qualquer tecido, representa uma família de espécies moleculares. Fosfatidilcolina (PC) contém principalmente ácido palmítico (16:0) ou ácido esteárico (18:0) na posição *sn*-1 e, primeiramente, os ácidos graxos insaturados de 18 carbonos oléicos, linoléico ou linolênico, na posição *sn*-2. Fosfatidiletanolamina tem os mesmos ácidos graxos insaturados que PC na posição *sn*-1, mas contém mais dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa especificamente, 18:2, 20:4 e 22:6 na posição *sn*-2 (Devlin, 2000).

### **Biossíntese de fosfatidilcolina**

Segundo Devlin (2000) a principal via para biossíntese de fosfatidilcolina (lecitina) envolve a conversão sequencial de colina em fosfocolina, citidina-difosfato (CDP-colina) e fosfatidilcolina. Nessa via, o grupo da cabeça polar da fosfocolina é ativado usando citidina trifosfato (CTP), de acordo com as seguintes reações: a colina livre, necessidade dietética da maioria dos mamíferos, incluindo o homem, é primeiro fosforilada por ATP, pela colina quinase resultando em fosfocolina que é convertida em CDP-colina, às custas de CTP, na reação catalisada por fosfocolina citidililtransferase. A ligação pirofosforil de alta energia da CDP-colina é muito instável e reativa, de modo que a porção fosfocolina pode ser transferida facilmente para o centro nucleofílico fornecido pelo grupo OH da posição 3 do 1,2-diacilglicerol, pela colina fosfotransferase.

Segundo Devlin (2000), a etapa limitante da velocidade da biossíntese de fosfatidilcolina é a reação da citidililtransferase, que forma CDP-colina. Essa enzima é regulada por um mecanismo notável, envolvendo a troca de enzima entre o citosol e o retículo endoplasmático. A forma citosólica da citidililtransferase é inativa e parece funcionar como reservatório da enzima; a ligação da enzima à membrana resulta em ativação. O deslocamento da citidililtransferase do citosol para o retículo endoplasmático é regulado por cAMP e acil graxo-CoA. Fosforilação reversível da

enzima por uma quinase dependente de cAMP faz com que ela seja liberada da membrana, ficando inativa. Subseqüente desfosforilação fará a citidililtransferase se ligar novamente à membrana e se tornar ativa. Acil graxo-CoAs ativam a enzima por promoverem sua ligação ao retículo endoplasmático (Figura 3).

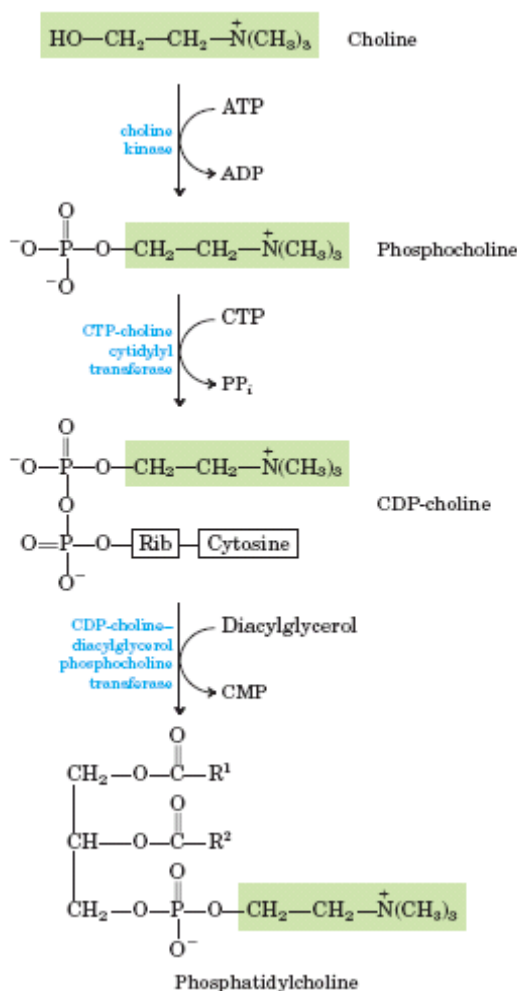


Figura 3: Biossíntese de fosfatidilcolina (Leninger et al., 2000).

Somente no fígado, a fosfatidilcolina é formada por metilação repetida de fosfatidiletanolamina. Fosfatidiletanolamina *N*-metiltransferase do retículo endoplasmático catalisa a transferência de grupos metil, um de cada vez, de *S*-adenosilmetionina (AdoMet) para fosfatidiletanolamina, produzindo fosfatidilcolina. Ainda é desconhecido se uma ou mais enzimas estão envolvidas nessas transferências de metil. Segundo Kanazawa et al. (1985) e Poston (1990b), entre os fosfolipídeos, o que demonstra melhor efeito de crescimento é a fosfatidilcolina. Já Takeuchi et al. (1992) e Kanazawa (1993) demonstraram que a fosfatidiletanolamina tem efeito pior em relação aos demais fosfolipídeos.

Os fosfolipídeos têm função detergente (emulsificante) nos lipídeos, especialmente a fosfatidilcolina, que desempenham papel importante na bile, que atuam na solubilização do colesterol. Um defeito na produção de fosfolipídeos e em sua secreção na bile pode resultar em formação de cálculos de colesterol e de pigmentos biliares. Fosfoinositol e fosfatidilcolina também funcionam como fonte de ácido araquidônico para síntese de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e compostos relacionados.

Segundo Devlin (2000) os lipídeos são importantes componentes das membranas, sendo os três principais: glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos e colesterol. Os glicerofosfolipídeos (fosfoglicerídeos) são os lipídeos mais abundantes nas membranas. Estes têm uma molécula de glicerol com um fosfato esterificado no carbono alfa e dois ácidos graxos de cadeia longa, esterificados nos átomos de carbono remanescentes. Glicerol não tem carbono assimétrico, mas os átomos de carbono alfa não são estequiometricamente idênticos. A esterificação de fosfato a um carbono alfa torna a molécula assimétrica. Os glicerofosfolipídeos de ocorrência natural são designados pelo sistema de numeração estereoespecífica (*sn*).

O 1,2-diacylglicerol 3-fosfato ou ácido fosfatídico é o composto que dá origem a uma série de glicerofosfolipídeos sendo que diferentes compostos contendo hidroxilas, alguns dos quais polares, são esterificados ao fosfato. Os principais compostos ligados por uma ponte fosfodiéster ao glicerol são colina, etanolamina, serina, glicerol e inositol. Fosfatidiletanolamina ou cefalina e fosfatidilcolina (colina glicerofosfolipídeos ou lecitina) são os glicerofosfolipídeos mais comuns em membranas (Devlin, 2000).

Observa-se que a colina apresenta respostas importantes para saúde e desenvolvimento animal. Isso pode ser evidenciado em diversas pesquisas com peixes e outros animais.

O fornecimento insuficiente de colina pode acarretar acúmulo de gordura no fígado e outras disfunções orgânicas (Osol et al., 1982). A deficiência de colina em carpa comum (*Cyprinus carpio*) não alterou o crescimento, mas demonstrou aumento de 10,0% na concentração de lipídeo no fígado (Ogino et al., 1970). Segundo Woodward, (1994), a exigência nutricional de colina para salmonídeos pode variar de 430,0 a 4050,0 mg/kg, em Esturjão branco (*Acipenser transmontanus*) podem variar de 1700,0 a 3200,0 mg/kg. Entretanto o autor cita que essas exigências devem ser melhor estudadas já que a exigência de colina está ligada a várias outras vitaminas e metionina. Shils et al. (2003) enfatizaram que a metionina pode substituir a colina somente quando a fosfatidiletanolamina-*N*-metiltransferase for totalmente ativa. Já em camarão

(*Marsupenaeus japonicus*), Teshima et al. (1993) determinaram que a exigência de colina varia de 0,06% até 0,30% da dieta. Em estudo realizado por Michael et al. (2006) com juvenis de camarão compararam o efeito da colina e metionina como doadores de radical metil, e observaram que quando a metionina está deficiente na dieta, o nível de 0,12% de cloreto de colina equiparou-se em ganho de peso e sobrevivência com os dados obtidos com 1,50% de metionina e 0,06% de cloreto de colina, com isso quando a dieta está deficiente de metionina é preciso maior teor de colina para suprir a exigência de radicais metil.

A exigência de colina do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) pode ser aumentada quando não se tem excesso de metionina. Usando-se 0,39% de metionina e 400,0 mg de colina/kg de ração, obteve-se melhores resultados de desempenho, além de apresentar melhor estado do fígado; na medida em que o nível de colina foi aumentando, a concentração de lipídeos no fígado diminuiu (Wilson & Poe, 1988). Ocorreu o mesmo com o fígado das carpas, aumentando concentração de colina, diminuiu a concentração de lipídeos no fígado (Ogino et al., 1970).

Craig & Gatlin III (1996) determinaram que para “Red drum” (*Sciaenops ocellatus*) a exigência de colina varia de 330,0 a 676,0 mg/kg. Craig & Gatlin III (1997), testaram com essa mesma espécie, níveis de colina e lecitina, 0 e 4% da dieta para lecitina e 0,0; 3000,0 e 6000,0 mg de colina/kg de ração, e os que tiveram melhores resultados foram a utilização de 4% de lecitina sem a inclusão de colina. Isso se deveu à presença de farinha de peixe na composição da dieta, sendo esta excelente fonte de colina; mas quando suplementado por 3000,0 mg de colina/kg de dieta, houve menor concentração de lipídeos no fígado e maior concentração no músculo.

Griffin et al. (1994) demonstraram que o híbrido do “Striped bass” (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) teve melhor desempenho quando alimentados com dietas suplementadas com 500,0 mg de cloreto de colina/kg de ração. Sealey et al. (2001) trabalhando com larvas dessa mesma espécie, testaram níveis de colesterol e de lecitina de soja variando de 0,0 a 60,0 gramas dos dois ingredientes por quilo de ração. O resultado mostrou que nenhum dos níveis de inclusão foi benéfico ao crescimento do peixe, concluindo que na fase de larva essa espécie tem habilidade de sintetizar esses componentes.

Segundo Viera et al. (2001) 375,0 mg de cloreto de colina/kg de ração, são suficientes para atender às exigências de alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Nesta pesquisa demonstraram que a betaína não determinou o mesmo

desempenho que a colina, não sendo possível sua substituição. Entretanto, segundo Kasper et al. (2002), para tilápia a betaína pode substituir a colina, sem prejudicar o crescimento; com melhor resultado na proporção de 10:90, colina e betaína respectivamente, sendo 300,0 mg de colina/kg de ração e 2,24 gramas de betaína/kg de ração. Kasper et al. (2000) avaliaram a interação de metionina e colina também para tilápia, obtiveram o melhor resultado de ganho de peso e sobrevivência para 0,5 gramas de aminoácidos sulfurados totais (AAS)/100g de dieta e 3,0 gramas de colina/kg de ração. Quando utilizou 0,5 g de AAS/100g de dieta e 4,0 gramas de colina/kg de ração houve prejuízo no crescimento e aumento na mortalidade. Segundo os autores o nível de 4,0 gramas de colina/kg de dieta está próximo do que se considera letal, concluindo que o uso de colina é necessário somente caso a metionina não esteja em excesso.

Foi demonstrado por Poston (1990a) que larvas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) arraçadas com rações suplementadas com colina, apresentaram melhor crescimento em comparação às larvas arraçadas com rações não suplementadas. O mesmo foi observado por Rumsey (1991), quando alevinos da mesma espécie com 1,4 gramas revelaram exigência de colina de 813,0 mg/kg de ração e peixes com 3,2 gramas de 774,0 mg/kg de dieta. Avaliou, ainda, a inclusão de betaína em substituição à colina, porém a substituição não melhorou o desempenho dos peixes. Em pesquisa realizada com a truta arco-íris, utilizando proteína isolada de soja como base da dieta, incluindo nas quantidades de 0,0 ; 2,0; 4,0; 6,0; e 8,0 %, Poston (1991b), comparou o uso de colina e lecitina de soja e o resultado que se mostrou superior foi nos peixes alimentados com maiores teores de lecitina de soja, apesar de testar somente 300,0 mg de colina/kg de ração, nível aquém da exigência de trutas.

Segundo Twibell & Brown (2000), a colina é essencial quando as concentrações de aminoácidos sulfurados não estão em excesso em relação à exigência. A exigência de colina para juvenis de yellow perch (*Perca flavescens*) com 16,0 gramas de peso vivo está entre 598,0 a 634,0 mg de colina/kg de ração e a melhor fonte foi o cloreto de colina. Nessa mesma pesquisa utilizaram lecitina em comparação com a colina e observaram que a inclusão de lecitina não melhorou o desempenho dos peixes.

Hung & Berge (1997) constataram que para o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) 880,0 mg de colina/kg de ração e a inclusão de 30,0 g/kg de lecitina, propiciou efeito benéfico na digestibilidade dos nutrientes. Resultados satisfatórios foram observados por Hung & Lutes (1988), trabalhando com o esturjão branco, quando compararam o desempenho produtivo, utilizando 8,0 g de lecitina de soja ou 800,0 mg de cloreto de

colina como fonte de colina em dietas purificadas sendo o melhor resultado de desempenho com o cloreto de colina. Poston (1991a), trabalhando com salmão do Atlântico, avaliou a interação entre lecitina e colina, e os melhores resultados para ganho de peso foram de 6,0% de lecitina e 0,3% de colina na dieta, utilizando a lecitina sem problemas. Resultados semelhantes foram encontrados por Hung & Berge (1997) para a mesma espécie.

Segundo Shiau & Lo (2000), juvenis do híbrido de tilápias (*Oreochromis niloticus* x. *O. aureus*) tiveram melhor desempenho quando alimentados com dietas contendo 880,0 a 920,0 mg/kg de colina na ração. A exigência descrita de colina para os peixes varia de 50,0 mg/kg de ração para larvas de truta arco-íris (Poston, 1991c) até 3400,0 mg/kg de ração para esturjão branco (Hung, 1989).

Estudos demonstraram que a vitamina B<sub>12</sub> e o ácido fólico reduzem a exigência de colina em frangos de corte e ratos (Welch & Couch, 1955), sendo estas vitaminas necessárias para síntese de grupo metil. Isso pôde ser comprovado no trabalho realizado por Ryu et al. (1997), sendo que aves de postura alimentadas com rações à base de farelo de soja e milho, contendo 23,0% de proteína bruta e 750,0 mg/kg de colina contida nos ingredientes, não apresentaram sinais clínicos de deficiência, mas quando se adicionou 500,0 mg de colina/kg de ração, totalizando 1250,0 mg/kg, diminuiu a exigência do ácido fólico de 1,3 mg/kg para 1,2 mg/kg.

Para suínos jovens, estudos demonstraram que a suplementação de colina trouxe benefícios. Para animais adultos, a colina aumenta o número da leitegada e faz com que as fêmeas permaneçam por mais tempo em reprodução (Cunha, 1977). Matthews et al. (1988), trabalhando com suínos em terminação, utilizaram a betaína na ração (0,125%) e não constataram melhora nos índices zootécnicos, a não ser no rendimento de carcaça. Em pesquisa com leitões, a utilização de citrato de colina melhorou o perfil hematológico, comparado com o uso de metionina e sulfato (Lovett et al., 1986). Russett et al. (1979) testaram a interação de metionina e colina em dietas para leitões, e sugeriram que a suplementação de colina deverá ser feita somente quando a dieta estiver com 11,0% de proteína bruta; 0,13% de cistina e 0,32% de metionina na dieta.

Em leitões, pesquisas demonstraram resultados semelhantes quando da avaliação da interação entre metionina, treonina e colina e, metionina e treonina. Os autores observaram que a ação da suplementação de colina foi observada somente quando a quantidade de metionina estava insuficiente na dieta (Kroening & Pond, 1967). Estes resultados foram igualmente descritos para ratos; para esses animais dietas sem colina

determinaram teor de gordura no fígado maior em relação aos animais alimentados com dietas suplementadas com colina (Kroening & Pond, op. cit.).

Para gatos jovens 0,10% de colina determinou desempenho semelhante ao 0,37% de metionina, indicando que a colina é capaz de sintetizar metionina. Entretanto, quando foi adicionado 2-amino-2metil-1propanol (AMP) (inibidor de síntese de colina), a suplementação de colina obteve resultado melhor em relação à suplementação de metionina e o uso de colina diminuiu a concentração de gordura no fígado, sendo o uso de 0,10% de colina que determinou ótimo crescimento (Anderson et al., 1979). Em coelhos a exigência de colina está na faixa de 0,13% na dieta para crescimento, com prevenção de cirrose hepática e necrose renal (Hove et al., 1954).

Com base nessas informações, este estudo está apresentado em dois capítulos intitulados:

Capítulo II – “Desempenho produtivo da tilápia do Nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis crescentes de colina” objetivando caracterizar os efeitos dos níveis de suplementação de colina por meio do desempenho produtivo (ganho de peso, conversão alimentar aparente, porcentagem de sobrevivência, índice hepatossomático, extrato etéreo no filé e fígado e lipídeos totais no plasma). A redação deste capítulo foi realizada de acordo com as normas de publicação da revista *Journal of Applied Aquaculture*.

Capítulo III – “Resposta hemática da tilápia do Nilo alimentada com dietas suplementadas com níveis crescentes de colina e submetida a estímulo por baixa temperatura” objetivando caracterizar os efeitos dos níveis de suplementação de colina por meio de parâmetros hematológicos (hemograma e leucograma), antes e após o estímulo a frio. A redação deste capítulo foi realizada de acordo com as normas de publicação da revista *Aquaculture*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABURTO, A., VAZQUEZ, M., DALE, N.M. Strategies for utilizing overprocessed soybean meal: I. Amino acid supplementation, choline content, and metabolizable energy, *Journal Applied Poultry*, v. 7, p. 189-195, 1998.
- ANDERSON, P.A., BAKER, D.H., SHERRY, P.A., CORDIN, J.E. Choline-methionine interrelationship in feline nutrition. *Journal Animal Science*, v. 49, n° 2, p. 522-527, 1979.
- CAMARA, M. R. Dietary phosphatidylcholine requirements in larval and postlarval *Penaeus japonicus* Bate. *Aquaculture Nutrition*, vol 3, pag. 39 – 47. 1997.
- COMBS, G.F.Jr. *The Vitamins – Fundamental aspects in nutrition and health*. San Diego: Academic. Press, 526p. 1992.
- CRAIG, S.R., GATLIN III, D.M. Dietary choline requirements of juvenile Red drum (*Sciaenops ocellatus*). *The Journal. of Nutrition*, v. 126, n. 6, p. 1696 – 1700, 1996.
- CUNHA, T.J. *Swine feeding and nutrition*. Academic. Press, New York, 1977.
- DEVLIN, T.M. *Manual de bioquímica com correlações químicas*. Edgard Blucher, São Paulo, 2000.
- GRIFFIN, M. E., WILSON, K.A., WHITE, M.R., BROWN, P.B. Dietary choline requirements of juvenile Hybrid Striped bass. *The Journal. of Nutrition*, v. 124, n. 9, p. 1685 – 1689, 1994.
- HALVER, E.J. *Fish nutrition*. . Academic Press, Inc, San Diego, 1989.
- HOVE, E.L., COPELAND, D.H., SALMON, W.D. Choline deficiency in the rabbit. *Journal Nutrition*, p. 377-389, 1954.
- HUNG, S.S.O., LUTES, P.B. A preliminary study on the non-essentiality of lecithin for hatchery-produced juvenile White sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquaculture*, 68, p. 353-360, 1988.
- HUNG, S.S.O. Choline requirements of hatchery – produced juvenile White sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquaculture nutrition*, v. 78, p. 183 – 194, 1989.
- HUNG, S.S.O., BERGE, G.M. Growth and digestibility effects of soya lecithin and choline chlorideo on juvenile Atlantic salmon. *Aquaculture Nutrition*, v. 3, p. 141- 144, 1997.
- KANAZAWA, A. Essential phospholipids of fish and crustaceans. *Fish Nutrition in Practice*. June 24-27. No. 61 Paris. p. 519-530. 1993.

- KANAZAWA, A., TESHIMA, S., SAKAMOTO, M. Effects of dietary bonito-egg phospholipids and some phospholipids on growth and survival of the larval ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Journal Applied. Ichthyology*, v, 1. p. 165-170. 1985.
- KASPER, C.S., WHITE, M.R., BROWN, P.B. Choline is required by Tilapia when methionine is not in excess. *Journal Nutrition*, v. 130, p. 238-242, 2000.
- KASPER, C.S., WHITE, M.R., BROWN, P.B. Betaine can replace choline in diets for juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 205, p. 119-126, 2002.
- KETOLA, H.G. Choline metabolism and nutritional requirement of Lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Journal Animal Science*, v. 43, p. 474 – 477, 1976.
- KROENING, G.H., POND, W.G. Methionine, choline and threonine interrelationships for growth and lipotropic action in the baby pig and rat. *Journal Animal Science*, 1967.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D. L., COX. M. M. *Principles of biochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. Worth Publishers, 2000.
- LEWIS, A.J., SOUTHERN, L.L. *Swine nutrition*. CRC Press, Boca Raton, 2001.
- LOVETT, T.D., COFFEY, M.T., MILES, R.D., COMBS, G.E. Methionine, choline and sulfate interrelationships in the diet of weanling swine. *Florida Agr. Exp. Sta. Journal Series*, 1986.
- MATTHEWS, J.O., SOUTHERN, L.L., PONTIF, J.E., HIGBIE, A.D., BIDNER, T.D. Interactive effects of betaine, crude protein, and net energy in finishing pigs. *Journal Animal Science*. v. 76, p. 2444-2455, 1988.
- MCDOWELL, L.R. *Vitamins in animal nutrition – Comparative aspects to human nutrition*. San Diego: Academic Press, 1989. 486p.
- MICHAEL, F.R., KOSHIO, S., TESHIMA, S., ISHIKAWA, M., UYAN, O. Effect of choline and methionine as methyl group donors on juvenile Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, v. 258, p. 521-528, 2006.
- MOOKERJEA, S. Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. v.43, p. 143 – 150, 1971.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. *Nutrient requirements of fish*. Washington: National Acad. Press, 1993.
- OGINO, C., UKI, N., WATANABE, T., LIDA, Z., ANDO, K. B. Vitamin requirements of carp. IV. requirement for choline. *Bulletin Japanese Society Science Fish*. v. 36, p. 1140 – 1146, 1970.
- OSOL, A., CHASE, S.W., FRANCIS, C.C., NELHAUS, G., PRINCHARD, R.W., RICHARDSON, R.E., WENGER, N.K. *Blakiston's pocket medical dictionary*. 3<sup>rd</sup> ed. McGraw-Hill Book Company, New York, p. 1169, 1982.

- POSTON, H.A. Response of Atlantic salmon fry to feed-grade lecithin and choline. *The Progressive Fish-Culturist*. V. 53, p. 224-228, 1991a.
- POSTON, H.A. Response of Rainbow trout to soy lecithin, choline, and autoclaved isolated soy protein. *The Progressive Fish-Culturist*. V. 53, p. 85-90, 1991b.
- POSTON, H.A. Choline requirements of swimming up rainbow trout fry. *The Progressive Fish-Culturist*. V. 53, p. 1140-1146, 1991c.
- POSTON, H.A. Performance of rainbow trout fry fed supplemental soy lecithin and choline. *The Progressive Fish-Culturist*. V. 52, n. 4, p. 218-225, 1990a.
- POSTON, H.A. Effect bodysize on growth, survival and chemical composition of Atlantic salmon fed soy lecithin and choline. *The Progressive Fish-Culturist*. V. 53, p. 226-230, 1990b.
- RUMSEY, G.L. Choline-betaine requirements of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v. 95, p. 107-116, 1991.
- RUSSET, J.C., KRIDER, J.L., CLINE, T.R., THACKER, H.L., UNDERWOOD, L.B. Choline-methionine interactions in young swine. *Journal of Animal Science*, v. 49, n° 3, p. 708-714, 1979.
- RYU, K.S., ROBERSON, K.D., PETI, G.M. The folic acid requirements of broiler chicks fed diets based on practical ingredients. 1 – Interrelationships with dietary choline. *Poultry-science*, v. 74, n. 9, p. 1447 – 1455, 1997.
- SEALEY, W.M., CRAIG, S.R., GATLIN III, D.M. Dietary cholesterol and lecithin have limited effects on growth and body composition of Hybrid Striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Aquaculture Nutrition*, v. 7, p. 25-31. 2001.
- SHIAU, S.Y.; LO, P.S. Dietary choline requirements of juvenile Hybrid Tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Journal Nutrition*, v. 130, p. 100-103, 2000
- SHILS, M.E., OLSON, J.A., SHIKE, M., ROSS, A.C. *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença*. 9ª Edição, Editora Manole Ltda., 2003.
- TAKEUCHI, T., ARAKAWA, T., SATOH, S., WATANABE, T. Supplemental effect of phospholipids and requirement of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid of juvenile striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58. p. 707-713. 1992.
- TESHIMA, S., KANAZAWA, A., KOSHIO, S. Recent development in nutrition and microparticulate diets of larval prawns. *The Israel Journal of Aquaculture* v. 45, n. 4, p. 175 – 184, 1993.

TSIAGBE, V.K., HARPER, A.E., SUNDE, M.L. A feather-sexed strain of laying hens was more responsive to dietary supplements of choline and metionine than a vent-sexed strain. *Poultry-Science*, v. 71, n. 8, p. 1271 – 1276, 1992.

TWIBELL, R.G., BROWN, P.B. Dietary choline requirement of juvenile Yellow perch (*Perca flavescens*). *Journal Nutrition*, v. 130, p. 95-99, 2000.

VIERA, I., CYRINO, J. E. P., PEZZATO, L. E. *Colina e betaína em rações purificadas na nutrição da tilápia do Nilo (Oreochromis Niloticus)*. *Ciencia Agrícola*, v.58, n.4, p. 675-680, out./dez. 2001.

WELCH, B.E., COUCH, J.R. Homocytine, vitamin B<sup>12</sup>, choline, and methionine in the nutrition of the laying fowl, *Poultry Science*, v. 34, p. 217 – 222, 1955.

WILSON, R.P., POE, W.E. Choline nutrition of fingerling channel catfish. *Aquaculture*, v. 68, p. 65-71, 1988.

WOODWARD, B. Dietary vitamin requirements of cultured young fish, with emphasis on quantitative estimates for salmonids. *Aquaculture*, v. 124, n. 1, p. 133 - 168, 1994.

## **CAPÍTULO II**

### **DESEMPENHO PRODUTIVO DE TILÁPIA DO NILO ARRAÇOADA COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE COLINA**

### **Desempenho produtivo de tilápia do Nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis crescentes de colina**

**RESUMO:** Essa pesquisa teve por objetivo avaliar o desempenho produtivo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) arraçoada com níveis crescentes de colina nas dietas. O período experimental foi de 109 dias. Foram utilizados 192 alevinos com peso médio inicial de 4,0 gramas, distribuídos em 32 tanques-rede de 200 L, numa densidade de seis peixes por tanque rede, sendo os tanques-rede alojados em aquários de 1000 L. O conjunto de aquários era dotado de sistema de filtragem de água por meio de biofiltro e sistema de aquecimento, sendo a temperatura mantida a  $25,3 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ . As rações foram formuladas de modo a apresentar 28,0% de proteína digestível e 3100,0 kcal ED/kg de dieta com mesma concentração de aminoácidos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito tratamentos e quatro repetições. As rações foram suplementadas com colina (cloreto de colina 60,0%) de modo a apresentarem 100,0; 200,0; 400,0; 600,0; 800,0; 1000,0 e 1200,0 mg de colina por quilograma de ração, além de uma ração isenta de suplementação. Não foram observadas diferenças estatísticas para ganho de peso, taxa de sobrevivência e conversão alimentar aparente, porcentagem de extrato etéreo do filé e concentração de lipídeos no plasma. No entanto houve diferença estatística para o índice hepatossomático e porcentagem de extrato etéreo do fígado, sendo que 800,0 mg de colina/kg de dieta determinou maior ação lipotrófica. O oposto foi observado nos peixes do tratamento isento de suplementação. Concluiu-se que os diferentes níveis de colina não melhoram o desempenho produtivo dos peixes, pois a dieta basal supostamente supriu a exigência do peixe para colina, entretanto, a suplementação favoreceu a melhora no estado do fígado.

Palavra chave: colina, desempenho, nutrição de peixes.

## **Productive performance of Nile tilapia fed diets supplemented with increasing levels of choline**

**ABSTRACT:** The aim of this study was to evaluate the performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets supplemented with increasing levels of choline. The experimental period was 109 days. One hundred and ninety two (initial weight 4.0 g) fingerlings were distributed in 32 net cages (200L), with a density of six fish per cage. These cages were allocated in 1000L aquariums connected to a bio-filter system and heater controlled temperature through thermostat ( $25.3 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ). Feeds were formulated to contain 28% of digestible protein and 3100 kcal DE/kg with the same concentration of amino acids per treatment organized in totally random experimental design with eight treatments and four replicates. The feeds were supplemented with choline chloride (60%) presenting 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 mg of chlorine per kg of feed and one treatment with no supplementation. It was not observed any significant differences in performance, survival and apparent feed conversion, fillet ether extract and plasma lipids concentration among the treatments. However, there was a significant difference in the hepatosomatic index and liver ether extract percentage, showing that 800 mg of choline/kg determined a better lipotrophic action and the opposite was observed in fish fed diet with no choline supplementation. It was concluded that different levels of choline did not improve performance supposedly due to the amount of choline in the diet, therefore the supplementation favored liver conditions.

**Key words:** Performance, choline, fish nutrition

## INTRODUÇÃO

A aquicultura brasileira vem crescendo nos últimos 20 anos, sendo a criação de tilápia a principal responsável por este aumento, representando cerca de 50,0% da produção nacional. O Brasil tem grande potencial aquícola devido às condições de temperatura, e principalmente, grandes recursos hidrográficos para cultivo.

O governo tem apresentado propostas de financiamento para a atividade, o que tem motivado o aumento na produção de peixes. Hoje, grande parte dos produtos brasileiros ficam no mercado interno, devido à cotação do dólar. Com isso o consumo de peixes da população brasileira vem aumentando apesar do consumo per capita ser pequeno. Com esses benefícios e auxílios, resta o desenvolvimento de estudos relacionados a qualidade da ração, pois a alimentação equivale de 60,0 a 80,0% do custo de produção de peixes.

Deste modo, preocupa a formulação de dietas cujo preço seja acessível e que permitam aos peixes expressar seu potencial genético de crescimento, dentro dos padrões de saúde. Para isso, pesquisas têm sido desenvolvidas, de forma a determinar as exigências nutricionais dos peixes nas diferentes fases de vida. Vitaminas, minerais, proteínas e gorduras são essenciais para o desenvolvimento animal, em proporções adequadas de forma a atender às necessidades nutricionais do peixe, visando seu maior potencial de crescimento e à manutenção da saúde.

O nome vitamina foi criado pelo bioquímico polonês Casimir Funk em 1912, baseado na palavra latina *vita* (vida) e no sufixo *aminas* (aminas da vida), pois naquele tempo se pensava que todas as vitaminas eram aminas. Apesar do erro, o nome se manteve. As vitaminas são substâncias orgânicas presentes em pequenas quantidades nos alimentos. São essenciais para o metabolismo normal e não podem ser sintetizadas pelos animais, pelo menos em quantidades apreciáveis (Graham, 1987).

Dentre as vitaminas, a colina possui grande importância sendo essencial para o desenvolvimento dos animais. É responsável pela manutenção das células estruturais, transporte de lipídeos e síntese de metionina (aminoácido limitante para os animais) (Devlin, 2000 e Halver, 1989). Apesar de sua importância no metabolismo animal, pouco se sabe sobre o efeito da suplementação desta vitamina em estágios de desenvolvimento iniciais dos peixes. Deste modo, esta pesquisa teve por finalidade avaliar a suplementação de níveis de colina em rações práticas para tilápia do Nilo, por meio do desempenho produtivo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado na Unesp – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Nutrição Animal, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, Câmpus de Botucatu.

Foram utilizados alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), provenientes da Piscicultura Aracanguá, cidade Santo Antonio do Aracanguá – SP. Os alevinos foram inicialmente alojados em tanques circulares de 250 L, para seleção e distribuição nos aquários experimentais e ficaram durante duas semanas para adaptação recebendo a dieta controle isenta de colina.

Os alevinos com aproximadamente 4,0 g foram distribuídos em 32 tanques-rede com capacidade de 200 L e na densidade de seis peixes por tanque-rede. Os tratamentos foram compostos por quatro tanques-redes de 200 L, dentro de um aquário de 1000 litros. Esses aquários estavam ligados ao sistema de recirculação de água, com aquecimento controlado por sistema digital integrado, no sentido de manter a temperatura da água constante ( $25,3 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ). A água do sistema estava acoplada a central de aeração e filtragem físico-biológica, a qual manteve sua qualidade e possibilitou dez renovações diárias. O arraçoamento foi *ad libitum* quatro vezes ao dia (8:00, 11:00, 14:00, 17:00) de forma a não haver sobra nos aquários.

Para compor os tratamentos experimentais, as dietas foram suplementadas com cloreto de colina (60,0%), de modo a apresentar os seguintes níveis de colina: 100,0; 200,0; 400,0; 600,0; 800,0; 1000,0 e 1200,0 mg de colina/kg de ração, além do tratamento controle isento de suplementação colina, sendo dietas balanceadas segundo o NRC (1993). Os tratamentos foram distribuídos completamente ao acaso entre os aquários, totalizando quatro repetições por tratamento.

Essas rações foram formuladas de forma a apresentarem 28,0% de proteína digestível, 3100,0 kcal ED/kg de dieta. Os níveis de aminoácidos foram balanceados segundo recomendação de Furuya et al. (2001), além de níveis iguais de fibra bruta. Foi utilizada dieta prática à base de farelo de soja, farelo de algodão 28, quirera de arroz e amido de milho, formuladas de forma a conter os níveis preestabelecidos de colina e atender às exigências nutricionais da tilápia para os demais nutrientes (Tabela 1).

As rações após serem formuladas foram extrusadas, secas em estufa de recirculação forçada de ar a  $55,0^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e quando necessário foram quebradas de forma a

obter grânulos condizentes ao tamanho dos peixes. As análises bromatológicas das rações foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da FMVZ, Unesp – Câmpus de Botucatu.

Diariamente foi medida a temperatura da água e, semanalmente o pH, o teor de oxigênio dissolvido e a amônia total. Os aquários foram sifonados mensalmente nos dois primeiros meses e depois de 60 dias quinzenalmente, para manter a qualidade da água. Ao final de 109 dias foram determinados os valores de ganho de peso do peixe por tratamento, consumo aparente da dieta por peixe, conversão alimentar aparente, ganho de peso médio diário, sobrevivência, índice hepatossomático, extrato etéreo do tecido corporal e hepático e quantificação de lipídeos no plasma.

Para a análise de extrato etéreo, no tecido corporal e hepático, foi utilizada a metodologia de lavagem sucessiva da amostra com o solvente éter de petróleo, em aquecedor cibelin e conjunto extrator de Soxhlet (A.O.A.C, 1975). Para análise de lipídeos totais no plasma foi utilizada a metodologia adaptada de Tonks (1970).

Os dados de desempenho foram submetidos à técnica da análise de variância (paramétrica ou não paramétrica) para o modelo com um fator, complementada com teste de comparação múltipla entre pares de grupos (Zar, 1999).

## RESULTADOS

Os parâmetros físico-químicos da água, tais como, pH, oxigênio dissolvido (mg/l), amônia total, e alcalinidade, foram:  $7,1 \pm 0,5$ ;  $7,15 \pm 0,20$ ;  $0,10 \pm 0,07$ ;  $100,00 \pm 10,00$ , respectivamente. Os parâmetros de qualidade da água foram adequadas e recomendado para a espécie em estudo (Boyd, 1996).

Os valores de ganho de peso do peixe por tratamento (GPPT), consumo aparente da dieta por peixe (CADP), conversão alimentar aparente (CAA), ganho de peso médio diário (GPMD) e sobrevivência (SBV) estão apresentados na Tabela 2. Os valores de índice hepatossomático (IHS), lipídeos no plasma (LPP) e extrato etéreo do fígado (EEFO) e do filé (EEFE) estão apresentados na Tabela 3.

Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) do nível de suplementação de colina sobre o GPPT, CADP, CAA, GPMD, sobrevivência, lipídeos no plasma, e extrato etéreo do filé. Para o índice hepatossomático e extrato etéreo no fígado, houve diferença ( $P < 0,05$ ). O resultado de índice hepatossomático obtido pela ração isenta de suplementação com colina não favoreceu o estado do fígado e o que favoreceu foi obtido com a

suplementação de 800,0 mg de colina/kg. Esse mesmo nível promoveu melhores valores absolutos de GPPT e CAA, sendo esses 15,0 e 10,0% respectivamente, melhores que os piores resultados desses parâmetros. Já o extrato etéreo do fígado não pode ser explicado em função dos níveis de colina.

## DISCUSSÃO

A colina é essencial para o ótimo crescimento dos peixes, previne o fígado gordo, hemorragias nos rins e anemia (Ketola, 1976 e Halver, 1989). A deficiência de colina piora a conversão alimentar e o crescimento dos peixes, além de causar hemorragia nos rins e intestinos. Entretanto, dietas à base de farelos de trigo, soja e leguminosas, não determinaram sinais de deficiência, pois esses ingredientes são ricos em colina (Halver, 1989). Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho, sendo que o desempenho produtivo não foi alterado em conseqüências dos níveis de colina presentes nas dietas. Para o desempenho produtivo, estes níveis de colina não influenciaram, provavelmente porque a ração basal continha a quantidade de colina exigida pela espécie, já que a dieta utilizada foi à base de ingredientes práticos, diferentes das pesquisas realizadas com ingredientes purificados.

A colina também é utilizada para formação da lecitina ou fosfatidilcolina, sendo este responsável pelo transporte de lipídeos e formação das membranas. É importante para prevenção de fígado gordo, uma vez que mobiliza lipídeos do fígado, para tecido e sangue. Isso pode ser evidenciado nesse experimento em que o índice hepatossomático maior foi observado na dieta isenta de colina, o que já era esperado. Também era esperado que o extrato etéreo do fígado fosse influenciado, porém essa influencia não pode ser explicada pelos níveis de colina. O período experimental pode ter influenciado e talvez por período prolongado o peixe pudesse ter problemas de saúde por decorrência de acúmulo de gordura no fígado. A deficiência de colina em carpa comum (*Cyprinus carpio*) não alterou o crescimento, mas determinou aumento de 10,0% na concentração de lipídeo no fígado (Ogino et al., 1970), Resultados semelhantes foram observados nas espécies: bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) (Wilson e Poe, 1988), Hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) (Griffin et al., 1994), Red drum (*Sciaenops ocellatus*) (Craig e Gatlin, 1996), e em leitões (Kroening e Pond, 1967). No entanto, Viera et al. (2001), não observaram diferenças significativas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no extrato etéreo do fígado.

Outra função da colina é a liberação de radicais metil, que sofrem reação de metilação participando assim do processo de formação da metionina (McDowell, 1989 e Halver, 1989). Visto este efeito, Tsiagbe et al. (1992) constataram que a colina pode ser substituída e substituir parcialmente a metionina nas rações de aves de postura, sem prejudicar a produção e qualidade dos ovos. Nesse experimento foi utilizado 0,47% de metionina, nível recomendado por Furuya et al. (2001), e aquém do recomendado pelo NRC que indica 0,75%. Desta forma, foi possível minimizar o possível erro pelo excesso de metionina, já que diversos pesquisadores tiveram problemas quando a colina era exigida e a metionina estava em excesso. Resultado semelhante foi obtido por Michael et al. (2006) com juvenis de camarão (*Marsupenaeus japonicus*), quando compararam o efeito da colina e metionina como doador de radical metil, e observaram que quando a metionina está deficiente na dieta é preciso um teor de colina maior para suprir a exigência de radicais metil. A exigência de colina do bagre do canal pode ser aumentada quando não se tem excesso de metionina, usando-se 0,39% de metionina e 400,0 mg de colina/kg de ração, obteve os melhores resultados de desempenho (Wilson e Poe, 1988).

## CONCLUSÕES

Concluiu-se que a suplementação de colina não influenciou o desempenho produtivo dos peixes, possivelmente devido à dieta basal suprir a exigência do peixe para colina, entretanto a suplementação de colina favoreceu o melhor estado funcional do fígado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. 1975. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 12.ed. Washington. 1094p.
- BOYD, C.E. 1996. Water quality in ponds for aquaculture. Songkhala: Shrimp Mart, 482p.
- CRAIG, S.R., and GATLIN III, D.M. 1996. Dietary choline requirements of juvenile Red drum (*Sciaenops ocellatus*). *The Journal. of Nutrition*, v. 126, n. 6, p. 1696 – 1700.
- DEVLIN, T.M. 2000. *Manual de bioquímica com correlações químicas*. Edgard Blucher, São Paulo.
- FURUYA, W.M., PEZATO, L.E., BARROS, M.M., and MIRANDA, M.M. 2001. Coeficientes de Digestibilidade e Valores de Aminoácidos Digestíveis de Alguns Ingredientes para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*.
- GRAHAM, S. 1987. *Stedman's dicionário médico*. 23ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- GRIFFIN, M. E., WILSON, K.A., WHITE, M.R., and BROWN, P.B. 1994. Dietary choline requirements of juvenile Hybrid Striped bass. *The Journal. of Nutrition*, v. 124, n. 9, p. 1685 – 1689.
- HALVER, E.J. 1989. *Fish nutrition*. Academic Press, Inc, San Diego.
- KETOLA, H.G. 1976. Choline metabolism and nutritional requirement of Lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Journal Animal Science*, v. 43, p. 474 – 477.
- KROENING, G.H., and POND, W.G. 1967. Methionine, choline and threonine interrelationships for growth and lipotropic action in the baby pig and rat. *Journal Animal Science*.
- MCDOWELL, L.R. 1989. *Vitamins in animal nutrition – Comparative aspects to human nutrition*. San Diego: Academic Press, 486p.
- MICHAEL, F.R., KOSHIO, S., TESHIMA, S., ISHIKAWA, M., and UYAN, O. 2006. Effect of choline and methionine as methyl group donors on juvenile Kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* Bate. *Aquaculture*, v. 258, p. 521-528.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. 1993. *Nutrient requirements of fish*. Washington: National Acad. Press.

- OGINO, C., UKI, N., WATANABE, T., LIDA, Z., and ANDO, K. B. 1970. Vitamin requirements of carp. IV. requirement for choline. *Bulletin Japanese Society Science Fish.* v. 36, p. 1140 – 1146.
- TONKS, D.B. 1970. Quality control in clinical laboratories diagnostic reagents. Division, Ontario.
- TSIAGBE, V.K., HARPER, A.E., and SUNDE, M.L. 1992. A feather-sexed strain of laying hens was more responsive to dietary supplements of choline and metionine than a vent-sexed strain. *Poultry-science*, v. 71, n. 8, p. 1271 – 1276.
- VIERA, I., CYRINO, J. E. P., and PEZZATO, L. E. 2001. Colina e betaína em rações purificadas na nutrição da tilápia do Nilo (*Oreochromis Niloticus*). *Ciencia Agrícola*, v.58, n.4, p. 675-680.
- WILSON, R.P. and POE, W.E. 1988. Choline nutrition of fingerling channel catfish. *Aquaculture*, v. 68, p. 65-71.
- ZAR, J.H. 1999. *Biostatistical analysis*, 4th Ed. Prentince hall, New Jersey, 663P.

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes da dieta e químico-bromatológica das dietas experimentais

| <b>Ingredientes</b>                     | <b>T1 (%)</b>   | <b>T2 (%)</b> | <b>T3 (%)</b> | <b>T4 (%)</b> | <b>T5 (%)</b> | <b>T6 (%)</b> | <b>T7 (%)</b> | <b>T8 (%)</b> |
|-----------------------------------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Farelo de soja                          | 54,15           | 54,15         | 54,15         | 54,15         | 54,15         | 54,15         | 54,15         | 54,15         |
| Farelo de algodão 28                    | 9,00            | 9,00          | 9,00          | 9,00          | 9,00          | 9,00          | 9,00          | 9,00          |
| Quirera de arroz                        | 28,00           | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         |
| Amido de milho                          | 5,00            | 4,984         | 4,968         | 4,936         | 4,904         | 4,872         | 4,84          | 4,808         |
| Antioxidante - BHT                      | 0,02            | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          |
| DL-Metionina                            | 0,18            | 0,18          | 0,18          | 0,18          | 0,18          | 0,18          | 0,18          | 0,18          |
| Vitamina. C Polifosfatada 35%           | 0,02            | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          |
| Cloreto de colina 60%                   | 0,00            | 0,016         | 0,032         | 0,064         | 0,096         | 0,128         | 0,16          | 0,192         |
| Suplemento min/vit.1                    | 0,41            | 0,41          | 0,41          | 0,41          | 0,41          | 0,41          | 0,41          | 0,41          |
| Fosfato bicálcico                       | 3,12            | 3,12          | 3,12          | 3,12          | 3,12          | 3,12          | 3,12          | 3,12          |
| NaCl                                    | 0,10            | 0,10          | 0,10          | 0,10          | 0,10          | 0,10          | 0,10          | 0,10          |
| Total                                   | 100             | 100           | 100           | 100           | 100           | 100           | 100           | 100           |
| <b>Composição químico-bromatológica</b> |                 |               |               |               |               |               |               |               |
| Energia digestível (kcal/kg)            | 3100            | 3100          | 3100          | 3100          | 3100          | 3100          | 3100          | 3100          |
| Proteína bruta (%)*                     | 30,01           | 30,01         | 30,01         | 30,01         | 30,01         | 30,01         | 30,01         | 30,01         |
| Proteína digestível (%)                 | 28,00           | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         |
| Fibra bruta (%)*                        | 8,33            | 8,33          | 8,33          | 8,33          | 8,33          | 8,33          | 8,33          | 8,33          |
| Fibra bruta (%)                         | 4,86            | 4,86          | 4,86          | 4,86          | 4,86          | 4,86          | 4,86          | 4,86          |
| Extrato etéreo (%)*                     | 0,74            | 0,74          | 0,74          | 0,74          | 0,74          | 0,74          | 0,74          | 0,74          |
| Extrato etéreo (%)                      | 1,14            | 1,14          | 1,14          | 1,14          | 1,14          | 1,14          | 1,14          | 1,14          |
| Ca total                                | 1,39            | 1,39          | 1,39          | 1,39          | 1,39          | 1,39          | 1,39          | 1,39          |
| Fósforo disponível                      | 0,49            | 0,49          | 0,49          | 0,49          | 0,49          | 0,49          | 0,49          | 0,49          |
| Colina (mg/kg dieta)                    | 0,00            | 100           | 200           | 400           | 600           | 800           | 1000          | 1200          |
| Colina *(mg/kg dieta)                   | ND <sup>2</sup> | 160           | 290           | 440           | 810           | 1100          | 1280          | 1470          |
| Metionina                               | 0,47            | 0,47          | 0,47          | 0,47          | 0,47          | 0,47          | 0,47          | 0,47          |
| Metionina+Cistina                       | 0,81            | 0,81          | 0,81          | 0,81          | 0,81          | 0,81          | 0,81          | 0,81          |
| Lisina                                  | 1,88            | 1,88          | 1,88          | 1,88          | 1,88          | 1,88          | 1,88          | 1,88          |
| Triptofano                              | 0,36            | 0,36          | 0,36          | 0,36          | 0,36          | 0,36          | 0,36          | 0,36          |
| Treonina                                | 0,99            | 0,99          | 0,99          | 0,99          | 0,99          | 0,99          | 0,99          | 0,99          |

<sup>1</sup> Suplemento vitamínico e mineral (mg/kg de dieta): Vitamina A, 16060mg; Vitamina D<sub>3</sub>, 4510mg; Vitamina E, 250 mg; Vitamina K<sub>3</sub>, 30 mg; Vitamina B<sub>1</sub>, 32 mg; Vitamina B<sub>2</sub>, 32 mg; Vitamina B<sub>12</sub>, 0,032mg; Vitamina B<sub>6</sub>, 32 mg; Vitamina C, zero; Pantotenato de cálcio, 80 mg; Niacina, 170 mg; Ácido fólico, 10 mg; Biotina, 10 mg; **Cloreto de colina** <sup>2</sup>, ; Óxido de cobalto, 0,5 mg; Óxido de cobre, 20 mg; Óxido de ferro, 150 mg; Iodeto de cálcio, 1mg; Óxido de manganês, 50 mg; Óxido de selênio, 0,7 mg; Óxido de zinco, 150 mg; Veículo q.s.p., 1.000 g; \*Analisado (Fornecido pela Mogiana Alimentos); <sup>2</sup> ND = Não determinado.

Tabela 2. Valores médios e desvios padrões para ganho de peso do peixe por tratamento, (GPPT), consumo aparente da dieta por peixe (CADP) e ganho de peso diário por peixe (GPDP) e valores de mediana e semi-amplitude total para conversão alimentar aparente (CAA) e sobrevivência (SBV) de juvenis de tilápia do Nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis crescentes de colina durante 109 dias

| TRAT        | GPPT (g)         | CADP (g)         | CAA           | GPDP (g)      | SBV (%)          |
|-------------|------------------|------------------|---------------|---------------|------------------|
| <b>0</b>    | 168,96 ± 31,52 a | 232,24 ± 19,43 a | 1,32 ± 0,20 a | 1,55 ± 0,20 a | 91,67 ± 8,34 a   |
| <b>100</b>  | 143,31 ± 18,64 a | 194,97 ± 15,26 a | 1,37 ± 0,11 a | 1,39 ± 0,16 a | 83,33 ± 8,33 a   |
| <b>200</b>  | 152,35 ± 18,34 a | 208,59 ± 23,08 a | 1,38 ± 0,04 a | 1,40 ± 0,06 a | 100,00 ± 8,34a   |
| <b>400</b>  | 158,70 ± 34,52 a | 222,08 ± 35,70 a | 1,37 ± 0,11 a | 1,45 ± 0,09 a | 100,00 ± 16,67 a |
| <b>600</b>  | 164,88 ± 12,58 a | 225,90 ± 15,84 a | 1,37 ± 0,07 a | 1,52 ± 0,11 a | 91,67 ± 8,34 a   |
| <b>800</b>  | 166,07 ± 22,86 a | 213,55 ± 22,92 a | 1,26 ± 0,08 a | 1,52 ± 0,14 a | 100,00 ± 8,34a   |
| <b>1000</b> | 162,03 ± 34,38 a | 209,93 ± 33,12 a | 1,29 ± 0,10 a | 1,56 ± 0,10 a | 91,67 ± 16,65a   |
| <b>1200</b> | 156,15 ± 42,35 a | 211,95 ± 37,65 a | 1,31 ± 0,20 a | 1,56 ± 0,24 a | 83,33 ± 8,34 a   |

<sup>1</sup> Letras minúsculas comparam os diferentes níveis colina. Valores médios acompanhados de letras iguais não diferem entre si estatisticamente.

Tabela 3. Valores de mediana e semi-amplitude total do extrato etéreo do fígado (EEFO) e filé (EEFE) (% na matéria natural) e valores de média e desvio padrão para índice hepatossomático (IHS) e lipídeos no plasma em mg/ml (LPP)

| TRAT | EEFO (%)        | EEFE (%)      | IHS            | LPP (mg/ml)   |
|------|-----------------|---------------|----------------|---------------|
| 0    | 18,61 ± 3,74 ab | 6,10 ± 1,33 a | 2,50 ± 0,50 b  | 7,34 ± 0,38 a |
| 100  | 7,32 ± 4,13 ab  | 4,87 ± 0,95 a | 2,00 ± 0,26 ab | 7,63 ± 1,36 a |
| 200  | 7,77 ± 7,56 ab  | 5,03 ± 1,92 a | 1,75 ± 0,30 a  | 7,12 ± 0,51 a |
| 400  | 21,85 ± 5,02 a  | 4,63 ± 0,92 a | 2,09 ± 0,16 ab | 6,98 ± 0,32 a |
| 600  | 12,64 ± 6,58 ab | 8,00 ± 1,43 a | 1,84 ± 0,19 a  | 6,87 ± 1,49 a |
| 800  | 11,10 ± 6,00 ab | 6,96 ± 2,67 a | 1,50 ± 0,08 a  | 6,44 ± 1,49 a |
| 1000 | 7,11 ± 0,97 b   | 9,76 ± 2,00 a | 1,81 ± 0,22 a  | 6,67 ± 1,60 a |
| 1200 | 11,04 ± 4,49 ab | 8,12 ± 6,48 a | 1,75 ± 0,15 a  | 7,60 ± 1,15 a |

<sup>1</sup> Letras minúsculas comparam os diferentes níveis colina. Valores médios acompanhados de letras iguais, não diferem entre si estatisticamente.

### **CAPÍTULO III**

**RESPOSTA HEMÁTICA DA TILÁPIA DO NILO ALIMENTADA COM  
DIETAS SUPLEMENTADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE COLINA E  
SUBMETIDA A ESTÍMULO POR BAIXA TEMPERATURA**

**Resposta hemática da tilápia do Nilo alimentada com dietas suplementadas com níveis crescentes de colina e submetida a estímulo por baixa temperatura**

**RESUMO:** Essa pesquisa teve por objetivo avaliar a resposta hemática da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) arraçoada com níveis crescentes de colina nas dietas e submetidas a estímulo a temperatura baixa. O período experimental foi realizado em duas etapas: a primeira de 109 dias e a segunda de sete dias. Durante a primeira etapa foram utilizados 192 alevinos com peso médio inicial de quatro gramas, os quais foram distribuídos em 32 tanques-rede de 200 L, sendo os tanques-rede instalados em aquários de 1000 L. As rações foram formuladas, de modo a apresentar 28,0% de proteína digestível e 3100,0 kcal ED/kg de dieta e mesma concentração de aminoácidos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito tratamentos e quatro repetições. As rações foram suplementadas com colina (cloreto de colina 60,0%) de modo a apresentarem 100,0; 200,0; 400,0; 600,0; 800,0; 1000,0 e 1200,0 mg de colina por quilo de ração, além de uma ração isenta de suplementação. Após o período de 109 dias foram efetuadas as análises hematológicas. Ao término destas análises os peixes foram transferidos para a sala de desafio e distribuídos em 24 aquários, permanecendo a uma temperatura de 17° C durante sete dias. Após esse período foram feitas as mesmas análises que antes do desafio. A suplementação de colina não influenciou a eritropoiese ao estímulo pelo frio, por estar associada a quantidades adequadas na dieta de ácido fólico (tetraidrofolato) e ainda de vitamina B<sub>12</sub> no suplemento vitamínico/mineral. Portanto, suprimindo a exigência nutricional de timidilato e, desta forma, garantindo normal produção de células sangüíneas. Com isso, pode-se concluir que a colina não interferiu na síntese de eritrócitos e leucócitos e a temperatura de 17,0°C determinou linfopenia e neutrofilia.

Palavras chave: colina, estresse, hematologia, nutrição de peixes, temperatura

**Hematic response of Nile tilapia fed diets supplemented with increasing levels of choline and submitted to low temperature**

**ABSTRACT:** The aim of this study was to evaluate the hematic response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets supplemented increasing levels of choline and submitted to low temperature stimulation. The experimental period was realized in two phases, the first one during 109 days and the second seven days. On the first stage, 192 fingerlings (initial weight 4g) were distributed in 32 net cages (200L) allocated in 1000L aquaria. The feeds were formulated to 28% of digestible protein and 3100 kcal DE/kg with the same concentration of amino acids per treatment organized in totally random experimental design with eight treatments and four replicates. The feed were supplemented with choline chloride (60%) in order to present 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 mg of chlorine per kg of feed and one treatment with no supplementation. The hematological analyses were performed after 109 days. After these analyzes the fish were transferred to the challenge room and distributed in 24 aquaria, remaining at a temperature of 17° C during seven days. After this period, the same hematological analyzes were run. Choline supplementation did not affected erythropoiesis because of its interaction to appropriated quantities of folic acid in the diets. Also, B<sub>12</sub> vitamin in the premix accomplished the nutritional demand of thymidylate, reflecting in a normal blood cells production. It is possible to conclude that choline did not affect erythrocyte and leukocyte synthesis and the 17°C temperature determine low lymphocytes and neutrophils number.

**Key words:** hematology, stress, temperature, fish nutrition, choline.

## INTRODUÇÃO

A nutrição tem como principal objetivo determinar as exigências nutricionais dos peixes nas diferentes fases de vida. Nutrientes como vitaminas, minerais, proteínas e gorduras são essenciais para o desenvolvimento animal, em proporções adequadas de forma a atender as necessidades nutricionais do peixe, visando seu maior potencial de crescimento e a manutenção da saúde.

Dentre as vitaminas, a colina possui grande importância, sendo essencial para o desenvolvimento dos animais. É responsável pela manutenção das células estruturais, transporte de lipídeos e síntese de metionina (aminoácido limitante para os animais) (Devlin, 2000 e Halver, 1989).

Uma ferramenta muito utilizada ultimamente é a hematologia, com a qual se analisa o sangue para poder saber o estado de saúde animal. O sangue é um tecido líquido, móvel, do tipo conjuntivo, que está em equilíbrio com praticamente todos os outros tecidos, constituindo uma das grandes forças homeostáticas do organismo. Distribui calor, transporta gases respiratórios, nutrientes e produtos de excreção, além de atuar na defesa do organismo (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

Diferentemente dos mamíferos, os peixes têm vários centros hematopoiéticos (rim cefálico, baço, fígado, entre outros). Caso uma enfermidade comprometa o principal centro hematopoiético, outros órgãos podem assumir a produção de células. Assim fica difícil a caracterização do quadro leucocitário dos peixes com lesão dos órgãos (Feldman et al., 2000).

O volume de sangue dos peixes (sem estresse) é em torno de 1,5 a 3,0% do peso vivo em teleósteos e cerca de 6,0% nos elasmobrânquios. Os peixes têm alta renovação celular e depois de oito dias o sangue retirado já foi repostado (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004). O sangue é composto por três camadas: líquida (soro ou plasma), branca: (leucócitos e trombócitos) e vermelha (eritrócitos). A fase líquida, plasma é composta de 90,0% de água, 7,0% de proteínas (globulinas e albuminas) e 3,0% de solutos variados – eletrólitos. Tem como função o transporte de substâncias, anticorpos produzidos pelos plasmócitos, regulação osmótica entre o sangue e o líquido tecidual. A fase sólida é composta por elementos figurados como os glóbulos vermelhos (eritrócitos) e glóbulos brancos (linfócitos, monócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, célula granulocítica especial e trombócitos) (Feldman et al., 2000).

Sabendo da importância da hematologia como ferramenta de aplicação, esta pesquisa teve por finalidade avaliar a suplementação de diferentes níveis de colina para tilápia do Nilo, por meio da análise hematológica antes e após o estímulo pelo frio.

## MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado na Unesp – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Nutrição Animal, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri, Câmpus de Botucatu.

Foram utilizados alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), provenientes da piscicultura Aracanguá, localizado na cidade de Santo Antonio do Aracanguá – SP. Os alevinos foram inicialmente alojados em tanques circulares de 250 L, para seleção e distribuição nos aquários experimentais e ficaram durante duas semanas para adaptação recebendo a dieta controle isenta de colina.

Os alevinos com aproximadamente 4,0 g foram distribuídos em 32 tanques-rede com capacidade de 200 L e na densidade de seis peixes por tanque-rede, e esses tanques rede ficavam em número de quatro dentro de aquários de 1000 L, totalizando quatro repetições.

Esses aquários estavam ligados ao sistema de recirculação de água, com aquecimento controlado por sistema digital integrado, no sentido de manter a temperatura da água ( $25,3 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ). A água do sistema estava acoplada à central de aeração e filtragem físico-biológica, a qual manteve sua qualidade e possibilitou dez renovações diárias. O arraçãoamento foi feito *ad libitum* quatro vezes ao dia (8:00, 11:00, 14:00, 17:00) de forma a não haver sobra excessiva nos aquários.

Para compor os tratamentos do experimento, as dietas foram suplementadas com cloreto de colina (60,0%), de modo a apresentar os seguintes níveis de colina: 100,0; 200,0; 400,0; 600,0; 800,0; 1000,0 e 1200,0 mg de colina/kg de ração, além do tratamento controle isento de suplementação colina, sendo essas dietas balanceadas segundo NRC (1993). Os tratamentos foram distribuídos completamente ao acaso entre os aquários, totalizando quatro repetições por tratamento.

As rações foram formuladas de forma a apresentar 28,0% de proteína digestível, 3100,0 Kcal ED/kg de dieta. Os níveis de aminoácidos foram balanceados segundo recomendação de Furuya et al. (2001), além de níveis iguais de fibra bruta. Foi utilizada dieta prática à base de farelo de soja, farelo de algodão 28, quirera de arroz e amido de

milho, elaboradas de forma a conter os níveis preestabelecidos de colina e atender as exigências nutricionais da tilápia para os demais nutrientes (Tabela 1).

As rações após formuladas foram extrusadas, secas em estufa de recirculação de ar forçada à 55,0°C por 24 horas e quando necessário quebradas de forma a obter grânulos condizentes ao tamanho dos peixes. As análises químico-bromatológicas das rações foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ, Unesp – Câmpus de Botucatu (A.O.A.C., 1975).

Diariamente foi tomada a temperatura da água e, semanalmente, o pH, o teor de oxigênio dissolvido e a amônia total. Os aquários foram sifonados mensalmente nos dois primeiros meses, depois de 60 dias foram sifonados quinzenalmente, para manter a qualidade da água. Ao final de 109 dias, foram determinados o hemograma e leucograma antes e após o estímulo pelo frio.

Para avaliação dos parâmetros hematológicos foram retirados aleatoriamente seis peixes por tratamento dentre os tanques-rede. Os peixes primeiramente foram anestesiados com benzocaína, na concentração de 1,0 g do anestésico em 15 L de água, e após a completa dessensibilização, foi coletado sangue por meio de punção do vaso caudal com auxílio de seringa de 1,0 mL, banhada com anticoagulante (EDTA 3,0%). A contagem do número de eritrócitos e leucócitos foi realizada pelo método do hemocítômetro em câmara de Neubauer, utilizando como diluente a solução azul de toluidina a 0,01%, em pipeta de Thoma. A taxa de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina utilizando-se o kit comercial Analisa Diagnóstica<sup>®</sup>, para determinação colorimétrica, segundo Collier (1944). A porcentagem de hematócrito (Htc) foi determinada pelo método do microhematócrito, segundo Goldenfarb et al. (1971).

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por meio de extensões em lâminas. Essas foram limpas com detergente e água e, desengorduradas com éter etílico PA e secas com auxílio de gaze. Devidamente identificadas, foram confeccionadas seis lâminas por tratamento e corar com o corante May-Grünwald Giemsa utilizando técnicas descritas por Tavares-Diaz e Moraes (2004). Para essa contagem foi utilizado microscópio com auxílio de óleo de imersão, com aumento de 100 vezes, sendo contados 200 células e estabelecendo o percentual de cada componente celular (linfócito, neutrófilo, monócito, basófilo).

Posteriormente a essas análises, foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio [ $VCM = (Htc \times 10) / \text{eritrócitos}$ ] e concentração de

hemoglobina corpuscular média [ $\text{CHCM} = (\text{Hb} \times \text{Htc}) \times 100$ ], segundo Wintrobe (1934). A proteína plasmática total foi mensurada por meio do uso de refratômetro manual de Goldberg, pela quebra do tubo de microhematócrito logo acima da camada de leucócitos, após a leitura do hematócrito (Jain, 2000).

Após as avaliações hematológicas, os peixes permaneceram na mesma estrutura com o sistema de aquecimento desligado, objetivando baixar gradativamente a temperatura para posterior mudança dos animais para a sala de desafio. A partir do momento em que a temperatura da água dos aquários de ambas as estruturas experimentais estava similar, os peixes foram transferidos. A sala experimental de desafio por temperatura contém 24 aquários de 40 L, com filtros individualizados e aeração. Foram distribuídos aleatoriamente 96 peixes, na densidade de quatro/aquário. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com oito tratamentos e seis repetições sendo cada peixe considerado uma repetição.

Após a distribuição dos peixes, a temperatura da água dos aquários foi reduzida do conforto térmico para a espécie para  $17,0^{\circ}\text{C}$ , permanecendo neste valor durante sete dias. Ao final desse período foram avaliados os mesmos parâmetros hematológicos do momento anterior ao estímulo contagem do número de eritrócitos e leucócitos, taxa de hemoglobina, porcentagem de hematócrito e proteína plasmática total. Foram ainda calculados os índices hematimétricos sangüíneos, volume globular médio, concentração de hemoglobina globular média.

Os dados de hematologia foram submetidos à análise de variância para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes (Johnson e Wichern, 2002).

## RESULTADOS

Os parâmetros de qualidade de água, monitorados na fase I, estiveram dentro do considerado adequado para manutenção da condição de saúde dos peixes segundo Boyd (1996) com 7,15 mg/L de oxigênio dissolvido e 7,1 de pH.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados do número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito, taxa de hemoglobina, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média, na fase anterior (Fase I) e posterior (Fase II) ao estímulo por baixa temperatura. O eritrograma dos peixes na fase anterior ao estímulo a frio não foi influenciado pela suplementação de colina, com exceção da porcentagem de hematócrito dos peixes alimentados com a dieta suplementada com 200,0 mg colina/kg

de ração que apresentaram valor acima da média dos peixes dos demais tratamentos. Os índices hematimétricos, VCM e CHCM, também não sofreram influência da suplementação de colina na dieta nesta fase.

Após o estímulo por baixa temperatura (17,0°C) pode-se observar que os animais apresentaram prejuízo na síntese de células vermelhas, independente da suplementação de colina e que esta foi significativamente inferior à eritropoiese em condições adequadas de temperatura. A porcentagem de células vermelhas foi inferior ( $P < 0,05$ ) na segunda fase nos peixes alimentados com ração suplementada com níveis de 100,0; 200,0 e 1200,0 mg colina/kg de ração. Nesses mesmos animais, embora não de forma significativa, houve queda na taxa de hemoglobina, no volume da célula e na concentração de hemoglobina celular. A taxa de hemoglobina foi influenciada significativamente ( $P < 0,05$ ), após o estímulo a frio, nos peixes alimentados com a ração suplementada com 800,0 mg de colina/kg de ração.

A Tabela 3 apresenta o número de leucócitos totais e quantidade de proteína plasmática total (PPT) e a Tabela 4, a diferenciação dos leucócitos. Igualmente à série vermelha, os valores de leucócitos, bem como da PPT não se alteraram em função do nível de colina suplementada na ração, nem antes e nem após o estresse. No entanto, a porcentagem de linfócitos e de neutrófilos variou em função do nível de suplementação após o estímulo a frio. O estresse por temperatura determinou aumento significativo no número de neutrófilos. O volume corpuscular médio também se alterou em função do nível de colina, sendo que a ausência de suplementação e a suplementação de 1000,0 mg colina/kg de ração determinaram a liberação de células com maior volume. Comparando-se os momentos determinou-se queda na porcentagem de linfócitos e aumento na porcentagem de neutrófilos após o estresse.

## DISCUSSÃO

A colina pode influenciar indiretamente a eritropoiese. Segundo Devlin (1997) vários derivados de um carbono do tetraidrofolato são utilizados em reações de biossíntese, como por exemplo, para síntese de colina, serina, glicina, purinas e dTMP (timidina monofosfato). Segundo este autor, quando a quantidade de colina e de aminoácidos está adequada à síntese de purina e dTMP parece ser metabolicamente mais significativa. Estes compostos são essenciais para síntese das células. Em quantidades inadequadas pode haver retardo no processo de maturação dos glóbulos

vermelhos, causando produção de células macrocíticas, podendo levar ao processo de anemia.

Os valores apresentados pelos peixes alimentados com as diferentes dietas experimentais, na fase anterior ao estímulo a frio, estão dentro do considerado adequado para peixes sadios por Feldman et al. (2000) e Barros et al. (2006). Embora os peixes alimentados com a ração deficiente em colina apresentassem níveis normais de células vermelhas na fase anterior ao estímulo, esses animais foram os que apresentaram significativamente o menor número de células, após o desafio. Entretanto, peixes alimentados com as dietas suplementadas com 200,0; 600,0; 1000,0 e 1200,0 mg de colina/kg de ração também demonstraram ter prejuízo na síntese de células vermelhas quando submetidos à baixa temperatura.

Isto demonstra que não só a nutrição adequada, mas também que as condições de ambiente podem ter ação sobre a eritropoiese. Pickering (1981) classificou os principais agentes estressores num sistema de produção de peixes como sendo: químicos (qualidade da água, poluição, composição da dieta e resíduos metabólicos); biológicos (densidade populacional, presença de outras espécies de peixes e de microorganismos); físicos (temperatura, luz, sons e gases dissolvidos) e de manejo (manuseio, transporte e tratamento de doenças). Considerando-se que o metabolismo dos peixes sofre influência direta da temperatura da água, este fator tem sido considerado como o principal agente estressor quando fora da faixa de conforto da espécie. As principais consequências fisiológicas em condições de estresse para peixes são: desequilíbrio iônico e osmótico (McDonald e Milligan, 1997 e Piiper, 1989); alterações hematológicas (Mariano, 2006), hormonais, metabólicas (Moraes et al., 2004 e Wendelaar Bonga, 1997) e na excreção dos produtos nitrogenados (Randall et al., 2004).

O prejuízo na manutenção dos parâmetros hematológicos dos peixes sob condições de baixa temperatura (estresse crônico) foi anteriormente descrito por Falcon et al. (2007) ao avaliarem a higidez da tilápia do Nilo alimentada com dietas contendo suplementação de vitamina C e lipídeos e por Signor (2007), também com tilápias do Nilo alimentadas com níveis de levedura e zinco em rações práticas.

Quando se comparou os momentos, a porcentagem de hematócrito, igualmente ao número de eritrócitos, estava abaixo dos valores normais para peixes sadios para os alimentados com as rações suplementadas com 200,0; 400,0 e 1200,0 mg de colina/kg de ração e, para a taxa de hemoglobina nos peixes alimentados com a ração suplementada com 800,0 mg de colina/kg de ração. Nutricionalmente, não se encontrou

embasamento para tal resposta, inferindo-se que estes resultados podem ter sido devido a outros fatores que não a suplementação de colina. Segundo Hubrec e Smith in Feldman et al. (2000) um número significativo de fatores faz o diagnóstico hematológico em peixes mais complexo que em mamíferos, podendo levar a resultados conflitantes.

Segundo Tavares Dias e Moraes (2004) há diferenças na resposta hemática à termoaclimatação, principalmente quando em baixas temperaturas, sendo que pode ocorrer processo de hemodiluição. Chen et al. (1995) ressaltaram que a hemodiluição pode determinar redução na biossíntese de hemoglobina e na eritropoiese. Embora não tenha sido observada alteração significativa na taxa de hemoglobina houve decréscimo na produção de eritrócitos.

Na série branca, observou-se leucopenia nos peixes de todos os tratamentos, porém de modo significativo nos alimentados com a ração suplementada com 100,0 e 400,0 mg de colina/kg. Este efeito foi anteriormente descrito por outros autores e, a não significância determinada na maioria dos tratamentos pode estar relacionada à grande variação na contagem das células. Esta queda no número de leucócitos foi acompanhada pelo decréscimo da porcentagem de linfócitos e aumento da porcentagem de neutrófilos. Quadro de leucopenia, sob condições de estresse por temperatura, foi anteriormente descrito por Dunn et al. (1989) para *Carassius auratus*; por Falcon et al. (2007) e por Signor (2007) para a tilápia do Nilo. O prejuízo exercido pelo estresse a frio às condições de higidez dos peixes fica evidente mesmo em condições nutricionais adequadas.

Comparando-se os momentos, observou-se queda na produção de proteína plasmática total, após o estresse, para os peixes alimentados com a ração ausente de suplementação de colina e nos peixes alimentados com a ração suplementada com 100,0 e 1000,0 mg/kg. Novamente não houve tendência de resposta para o nível de suplementação. Estes resultados suportam a hipótese de que a temperatura de 17,0°C determina alterações fisiológicas que podem interferir no processo de defesa do peixe. Diminuição dos valores de PPT após estímulo por baixa temperatura foi igualmente relatado por Falcon (2007). De forma oposta, Thomas (2000) relatou aumento da PPT após estresse e processo de inflamação.

A não influência do nível de suplementação de colina na eritropoiese pode estar associada a quantidades adequadas de ácido fólico (tetraidrofolato) e ainda de vitamina B<sub>12</sub> no suplemento vitamínico/mineral o que estaria, portanto suprimindo a exigência

nutricional de timidilato e, desta forma, garantindo normal produção de células sanguíneas.

### **CONCLUSÕES**

A colina não interferiu na síntese de eritrócitos e leucócitos e a temperatura de 17,0°C determinou linfopenia e neutrofilia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. 1975. Association Of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 12.ed. Washington, 1094p.
- Barros, M.M., Pezzato, L., Falcon, D.R., Guimaraes, I.G. 2006. Nutrição e saúde de peixes. In: Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal, 2, 2006, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, Cd-rom.
- Boyd, C.E. 1996. Water quality in ponds for aquaculture. Songkhala: Shrimp Mart, 482p.
- Chen, G.R., Sun, L.T., Lee, Y.H., Chang, C.F. 1995. Characterisitcs of blood in commom carp, *Cyprinus carpio*, exposed to low temperatures. *Journal Applied Aquaculture*.5:21-31.
- Collier, H.B. 1944. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Med. Assist. J*, Toronto, v. 50, p. 550-552.
- Devlin, T.M. 1997. Textbook of biochemistry with clinical correlations. John Wiley & Sons, Inc. Copyright. 1007p..
- Devlin, T.M. 2000. *Manual de bioquímica com correlações químicas*. Edgard Blucher, São Paulo.
- Dunn, S.E., Murad, A., Houston, A.H. 1989. Leucocyts and leucopoietic capacyt in thermally acclimated goldfish, *Carassius auratus* L. *Journal Fish Biology*. v.34, p.901-911.
- Falcon, D.R. 2007.  $\beta$ -glucano e vitamina C na desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos da tilápia do Nilo: nível de suplementação e tempo de administração. Jaboticabal, SP: Caunesp, 2007, p.147 (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. 2000. Schalm's veterinary hematology. (Ed. Fifth).
- Furuya, W.M., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Miranda, M.M. 2001. Coeficientes de Digestibilidade e Valores de Aminoácidos Digestíveis de Alguns Ingredientes para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*.
- Goldenfard, P.B., Bowyer, F .P., Hall, E., Brosius, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Amer. J. Clinic Path*, Baltimore, v. 56, n.1, p. 35-39.
- Halver, E.J. 1989. *Fish nutrition*. . Academic Press, Inc, San Diego.

- Jain, N.C. Schalm's veterinary hematology. (Ed. Fifth), p. 1120-1132.
- Johnson, R.A., Wichern, D.W. 2002. APPLIED MULTIVARIATE STATISTICAL ANALYSES, 5 th edition. Prentice-Hall, New Jersey, 767p.
- Mariano, W. 2006. Respostas fisiológicas e bioquímicas do jeju *Hoplerthrinus unitaeniatus* à exposição aérea. Dissertação de mestrado. UFSCar, São Carlos, SP.88p.
- McDonald, G., Milligan, L. 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation. In: Iwama, G.K., Pickering, A. D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K, pp. 119-144.
- Moraes, G., Polez, V.L.P., Iwama, G.K. 2004. Biochemical responses of two erythrinidae fish to environmental ammonia. *Braz. J. Biol.* 64(1), 95-102.
- National Research Council – NRC.1993. *Nutrient requirements of fish*. Washington: National Acad. Press.
- Piiper, J. 1989. Factors affecting gas transfer in respiratory organs of vertebrates. *Can. J. Zool.* 67, 2956-2960.
- Pickering, A.D. 1981. Introduction: the concept of biological stress. In: PICKERING, A.D. *Stress and fish*. London: Academic Press, p.1-9.
- Randall, D.J., IP, Y. K., Chew, S.F., Wilson, J. M. 2004. Air breathing and ammonia excretion in the giant mudskipper, *Periophthalmus schlosseri*. *Physiol. and biochem. Zool.* 77, 783-788.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Silva-Souza, A.T. 2004. *Hematologia de Peixes Brasileiros. Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo, SP. Editora Varela, p. 89 – 120.
- Signor, A. 2007. Desempenho produtivo e resistência ao estresse a frio da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* submetidas a dietas contendo levedura autolisada e zinco. Jaboticabal, SP: CAUNESP, 2007, p. 103 (Mestre em Aqüicultura) – Universidade Estadual Paulista.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Willimpress Complexo Gráfico. Ribeirão Preto, SP. 144p.
- Thomas, J.S. 2000. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The Stress Response in Fish. *Physiol.* 77, 591-625.
- Wintrobe, M.M. 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, Leipzig, v. 51, p. 32-49.

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes da dieta e químico-bromatológica das dietas experimentais

| <b>Ingredientes</b>                     | <b>T1 (%)</b>   | <b>T2 (%)</b> | <b>T3 (%)</b> | <b>T4 (%)</b> | <b>T5 (%)</b> | <b>T6 (%)</b> | <b>T7 (%)</b> | <b>T8 (%)</b> |
|-----------------------------------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Farelo de soja                          | 54,15           | 54,15         | 54,15         | 54,15         | 54,15         | 54,15         | 54,15         | 54,15         |
| Farelo de algodão 28                    | 9,00            | 9,00          | 9,00          | 9,00          | 9,00          | 9,00          | 9,00          | 9,00          |
| Quirera de arroz                        | 28,00           | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         |
| Amido de milho                          | 5,00            | 4,984         | 4,968         | 4,936         | 4,904         | 4,872         | 4,84          | 4,808         |
| Antioxidante - BHT                      | 0,02            | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          |
| DL-Metionina                            | 0,18            | 0,18          | 0,18          | 0,18          | 0,18          | 0,18          | 0,18          | 0,18          |
| Vitamina. C Polifosfatada 35%           | 0,02            | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          | 0,02          |
| Cloreto de colina 60%                   | 0,00            | 0,016         | 0,032         | 0,064         | 0,096         | 0,128         | 0,16          | 0,192         |
| Suplemento min/vit. <sup>1</sup>        | 0,41            | 0,41          | 0,41          | 0,41          | 0,41          | 0,41          | 0,41          | 0,41          |
| Fosfato bicálcico                       | 3,12            | 3,12          | 3,12          | 3,12          | 3,12          | 3,12          | 3,12          | 3,12          |
| NaCl                                    | 0,10            | 0,10          | 0,10          | 0,10          | 0,10          | 0,10          | 0,10          | 0,10          |
| Total                                   | 100             | 100           | 100           | 100           | 100           | 100           | 100           | 100           |
| <b>Composição químico-bromatológica</b> |                 |               |               |               |               |               |               |               |
| Energia digestível (kcal/kg)            | 3100            | 3100          | 3100          | 3100          | 3100          | 3100          | 3100          | 3100          |
| Proteína bruta (%)*                     | 30,01           | 30,01         | 30,01         | 30,01         | 30,01         | 30,01         | 30,01         | 30,01         |
| Proteína digestível (%)                 | 28,00           | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         | 28,00         |
| Fibra bruta (%)*                        | 8,33            | 8,33          | 8,33          | 8,33          | 8,33          | 8,33          | 8,33          | 8,33          |
| Fibra bruta (%)                         | 4,86            | 4,86          | 4,86          | 4,86          | 4,86          | 4,86          | 4,86          | 4,86          |
| Extrato etéreo (%)*                     | 0,74            | 0,74          | 0,74          | 0,74          | 0,74          | 0,74          | 0,74          | 0,74          |
| Extrato etéreo (%)                      | 1,14            | 1,14          | 1,14          | 1,14          | 1,14          | 1,14          | 1,14          | 1,14          |
| Ca total                                | 1,39            | 1,39          | 1,39          | 1,39          | 1,39          | 1,39          | 1,39          | 1,39          |
| Fósforo disponível                      | 0,49            | 0,49          | 0,49          | 0,49          | 0,49          | 0,49          | 0,49          | 0,49          |
| Colina (mg/kg dieta)                    | 0,00            | 100           | 200           | 400           | 600           | 800           | 1000          | 1200          |
| Colina *(mg/kg dieta)                   | ND <sup>2</sup> | 160           | 290           | 440           | 810           | 1100          | 1280          | 1470          |
| Metionina                               | 0,47            | 0,47          | 0,47          | 0,47          | 0,47          | 0,47          | 0,47          | 0,47          |
| Metionina+Cistina                       | 0,81            | 0,81          | 0,81          | 0,81          | 0,81          | 0,81          | 0,81          | 0,81          |
| Lisina                                  | 1,88            | 1,88          | 1,88          | 1,88          | 1,88          | 1,88          | 1,88          | 1,88          |
| Triptofano                              | 0,36            | 0,36          | 0,36          | 0,36          | 0,36          | 0,36          | 0,36          | 0,36          |
| Treonina                                | 0,99            | 0,99          | 0,99          | 0,99          | 0,99          | 0,99          | 0,99          | 0,99          |

<sup>1</sup> Suplemento vitamínico e mineral (mg/kg de dieta): Vitamina A, 16060mg; Vitamina D<sub>3</sub>, 4510mg; Vitamina E, 250 mg; Vitamina K<sub>3</sub>, 30 mg; Vitamina B<sub>1</sub>, 32 mg; Vitamina B<sub>2</sub>, 32 mg; Vitamina B<sub>12</sub>, 0,032mg; Vitamina B<sub>6</sub>, 32 mg; Vitamina C, zero; Pantotenato de cálcio, 80 mg; Niacina, 170 mg; Ácido fólico, 10 mg; Biotina, 10 mg; **Cloreto de colina**<sup>2</sup>; Óxido de cobalto, 0,5 mg; Óxido de cobre, 20 mg; Óxido de ferro, 150 mg; Iodeto de cálcio, 1mg; Óxido de manganês, 50 mg; Óxido de selênio, 0,7 mg; Óxido de zinco, 150 mg; Veículo q.s.p., 1.000 g; \*Analisado (Fornecido pela Mogiana Alimentos); <sup>2</sup> ND = Não determinado.

Tabela 2. Média e desvio padrão do número de eritrócitos (Erit), porcentagem de hematócrito (Htc), taxa de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis crescentes de colina e submetidos a estímulo pelo frio.

| Colina <sup>1</sup> | Erit<br>(10 <sup>6</sup> /μL) |                      | Htc<br>(%)    |               | Hb<br>(%)    |              | VCM<br>(fL)    |                 | CHCM<br>(%)  |              |
|---------------------|-------------------------------|----------------------|---------------|---------------|--------------|--------------|----------------|-----------------|--------------|--------------|
|                     | Fase I <sup>2</sup>           | Fase II <sup>3</sup> | Fase I        | Fase II       | Fase I       | Fase II      | Fase I         | Fase II         | Fase I       | Fase II      |
| 0,0                 | 1,89±0,29 aB                  | 1,39±0,24 aA         | 30,25±2,60 aA | 28,00±5,01 aA | 7,47±0,65 aA | 7,63±1,29 aA | 161,56±12,67 a | 203,29±28,03 b  | 27,36±1,52 a | 24,72±1,35 a |
| 100                 | 1,92±0,20 aA                  | 1,67±0,16 aA         | 30,33±3,60 aB | 24,50±2,49 aA | 7,78±1,05 aA | 6,91±0,86 aA | 158,91±17,60 a | 147,66±14,39 a  | 28,17±1,49 a | 25,61±0,95 a |
| 200                 | 1,95±0,21 aB                  | 1,48±0,19 aA         | 34,58±5,95 bB | 24,92±3,07 aA | 7,88±1,02 aA | 6,49±0,57 aA | 178,65±35,59 a | 168,84±19,04 ab | 26,17±1,53 a | 23,16±3,53 a |
| 400                 | 1,87±0,14 aA                  | 1,65±0,10 aA         | 26,92±2,75 aA | 25,08±2,11 aA | 7,03±0,68 aA | 6,77±0,41 aA | 144,20±13,78 a | 152,85±18,01 a  | 27,09±1,80 a | 26,16±1,02 a |
| 600                 | 1,92±0,24 aB                  | 1,53±0,14 aA         | 28,33±2,71 aA | 26,42±2,48 aA | 7,27±1,00 aA | 6,71±0,72 aA | 149,19±21,49 a | 173,70±25,25 ab | 25,60±3,71 a | 25,57±1,19 a |
| 800                 | 1,80±0,23 aA                  | 1,61±0,26 aA         | 29,17±2,11 aA | 24,17±4,59 aA | 7,62±0,61 aB | 6,32±0,78 aA | 163,68±20,37 a | 150,30±19,46 a  | 26,48±2,55 a | 26,17±1,92 a |
| 1000                | 1,71±0,18 aB                  | 1,42±0,21 aA         | 28,75±3,53 aA | 26,83±4,11 aA | 7,05±1,22 aA | 6,96±0,72 aA | 167,73±3,64 a  | 191,00±27,02 b  | 26,12±1,64 a | 24,47±2,57 a |
| 1200                | 1,83±0,14 aB                  | 1,50±0,16 aA         | 27,00±2,59 aB | 21,75±3,81 aA | 6,73±1,06 aA | 6,13±0,91 aA | 149,44±23,20 a | 145,51±23,57 a  | 28,32±1,88 a | 24,77±1,96 a |

<sup>1</sup> Níveis de suplementação de colina em mg/kg de dieta.

<sup>2</sup> Fase I: antes do estímulo a frio.

<sup>3</sup> Fase II: após o estímulo a frio.

Letras minúsculas: comparação de níveis de colina fixado o momento.

Letras maiúsculas: comparação de momento dentro de tratamento.

Tabela 3. Mediana e semi-amplitude de leucócitos totais (Leuc) e média e desvio padrão do número de proteína plasmática total de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis crescentes de colina e submetidos a estímulo pelo frio.

|                            | Leuc           |                | PPT          |              |
|----------------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|
|                            | (μL)           |                | (mg/dL)      |              |
|                            | Fase I         | Fase II        | Fase I       | Fase II      |
| <i>Colina</i> <sup>1</sup> |                |                |              |              |
| 0,0                        | 70750±17500 aA | 48000±24500 aA | 3,13±0,24 aB | 2,48±0,31 aA |
| 100                        | 68250±18250 aB | 45750±9250 aA  | 2,87±0,27 aB | 2,25±0,29 aA |
| 200                        | 65750±41750 aA | 54000±7000 aA  | 2,97±0,59 aA | 2,44±0,24 aA |
| 400                        | 89000±33250 aB | 44000±20750 aA | 3,18±0,27 aA | 2,57±0,64 aA |
| 600                        | 92000±60250 aA | 47500±20500 aA | 3,23±0,79 aA | 2,89±0,64 aA |
| 800                        | 77250±51000 aA | 44250±21000 aA | 2,89±0,23 aA | 2,47±0,29 aA |
| 1000                       | 76750±67000 aA | 40500±17250 aA | 3,15±0,25 aB | 2,53±0,30 aA |
| 1200                       | 71600±63000 aA | 53750±16250 aA | 3,06±0,54 aA | 2,64±0,41 aA |

<sup>1</sup> Níveis de suplementação de colina em mg/kg de dieta.

<sup>2</sup> Fase I: antes do estímulo a frio.

<sup>3</sup> Fase II: após o estímulo a frio.

Letras minúsculas: comparação de níveis de colina fixado o momento.

Letras maiúsculas: comparação de momento dentro de tratamento.

Tabela 4. Média e desvio padrão do número de linfócitos (Linf) e mediana e semi-amplitude de monócitos (Mon) e neutrófilos (Neut) de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com níveis crescentes de colina e submetidos a estímulo pelo frio.

| Colina <sup>1</sup> | Linf (%)      |                 |              | Neut (%)   |                |              | Mon (%)    |              |
|---------------------|---------------|-----------------|--------------|------------|----------------|--------------|------------|--------------|
|                     | Fase I (%)    | Fase II (%)     | Fase I (%)   | Fase I (%) | Fase II (%)    | Fase I (%)   | Fase I (%) | Fase II (%)  |
| 0,0                 | 92,75±1,17 aB | 80,67±4,66 abcA | 2,75±1,25 aA |            | 15,25±4,50 bB  | 2,00±2,00 aA |            | 3,50±2,25 aA |
| 100                 | 91,08±5,76 aA | 89,83±4,57 cA   | 3,50±7,25 aA |            | 8,00±4,25 aA   | 2,00±1,00 aA |            | 2,00±0,75 aA |
| 200                 | 92,67±2,93 aB | 85,58±2,56 bcA  | 3,00±1,50 aA |            | 10,75±3,75 aB  | 2,00±1,25 aA |            | 2,75±0,50 aA |
| 400                 | 94,67±1,63 aB | 77,33±7,39 aA   | 1,25±1,00 aA |            | 18,25±7,75 bB  | 1,50±1,50 aA |            | 3,50±1,50 aA |
| 600                 | 91,67±1,44 aB | 80,00±4,30 abA  | 4,75±2,25 aA |            | 16,50±5,50 bB  | 2,75±1,50 aA |            | 2,50±1,00 aA |
| 800                 | 93,17±2,09 aB | 83,33±4,62 abcA | 4,00±2,00 aA |            | 12,50±5,25 abB | 1,50±1,75 aA |            | 2,00±1,00 aA |
| 1000                | 93,75±1,86 aB | 87,42±4,06 bcA  | 2,75±2,50 aA |            | 8,75±4,50 aB   | 1,75±0,75 aA |            | 2,50±1,00 aA |
| 1200                | 93,00±1,61 aB | 81,17±8,98 abcA | 3,75±2,25 aA |            | 12,25±9,50 abB | 2,25±1,00 aA |            | 2,25±1,75 aA |

<sup>1</sup> Níveis de suplementação de colina em mg/kg de dieta.

<sup>2</sup> Fase I: antes do estímulo a frio.

<sup>3</sup> Fase II: após o estímulo a frio.

Letras minúsculas: comparação de níveis de colina fixado o momento.

Letras maiúsculas: comparação de momento dentro de tratamento.

## **CAPÍTULO IV**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo suscitou as seguintes implicações:

- A) A colina é uma vitamina que é influenciada por outras vitaminas, lipídeos e metionina. Desta forma, em pesquisas com colina, deve-se considerar o excesso dessas substâncias, as quais podem prejudicar a atuação da colina e com isso mascarar os resultados.
- B) São necessárias novas pesquisas com período experimental maior com o peixe em peso de abate. Na prática, observa-se que o peixe neste tamanho, ou próximo, apresenta problemas de fígado, que ainda não estão elucidados.
- C) A maioria das pesquisas avaliando-se colina foram desenvolvidas utilizando-se dietas purificadas. No entanto, o uso de dietas práticas aproxima-se mais da realidade das indústrias e com isso, poderia melhorar ainda mais o elo entre a pesquisa e indústria.