

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

**SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA B₆ EM DIETAS PRÁTICAS E
PURIFICADAS NO DESEMPENHO PRODUTIVO E RESPOSTA
HEMÁTICA DA TILÁPIA DO NILO SUBMETIDA A ESTÍMULO
TÉRMICO**

CAROLINE PELEGRINA TEIXEIRA

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

BOTUCATU – SP
Dezembro – 2009

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

**SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA B₆ EM DIETAS PRÁTICAS E
PURIFICADAS NO DESEMPENHO PRODUTIVO E RESPOSTA
HEMÁTICA DA TILÁPIA DO NILO SUBMETIDA A ESTÍMULO
TÉRMICO**

CAROLINE PELEGRINA TEIXEIRA
Zootecnista

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARGARIDA MARIA BARROS

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

BOTUCATU – SP
Dezembro – 2009

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

Teixeira, Caroline Pelegrina, 1976-
T266s Suplementação de vitamina B₆ em dietas práticas e purificadas no desempenho produtivo e resposta hemática da tilápia do Nilo submetida a estímulo térmico / Caroline Pelegrina Teixeira. - Botucatu : [s.n.], 2009.
v, 45 f. : fots., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009
Orientador: Margarida Maria Barros
Inclui bibliografia.

1. Desempenho produtivo. 2. Hematologia. 3. Piridoxina. 4. Proteína. 5. Temperatura. 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,
João Paulo e Fátima, que são a minha inspiração,
razão do meu existir e seguir em frente todos
os dias da minha vida. Agradeço tudo que
fizeram e ainda fazem por mim.
Amo muito vocês!!!

Aos meus irmãos, João Paulo e Cristiane,
que são a minha alegria e gargalhadas.
Amo demais!!

Às minhas avós, Rosa (*in memoriam*) e Célia,
pelo carinho e incentivo.

Ao meu amor, namorado, companheiro,
grande incentivador, profissional exemplar, Vitor
Amo você por demais de fora da quantia!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, por ter nascido numa família maravilhosa, por estar rodeada de pessoas iluminadas e que me ajudaram nessa caminhada e estarão sempre ao meu lado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos;

À minha orientadora, Profa. Dra. Margarida Maria Barros, pelo incentivo, ensinamentos, paciência, dedicação irrestrita, amizade e oportunidade de convivência, porque além de ser excelente profissional é um ser humano iluminado;

Ao Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato, pelos ensinamentos, amizade, incentivo e exemplo de profissional;

À minha amiga e colega de profissão, Raquel Abdallah da Rocha, que me apresentou à minha orientadora e me ajudou a realizar esse sonho;

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, Departamento de Bioestatística, pela atenção e auxílio na realização das análises estatísticas;

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

À toda a equipe do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri; Igo Gomes Guimarães, Vivian Gomes dos Santos, Rosângela do Nascimento Fernandes, Graciela Pessoa Martins, Ademir Calvo Fernandes Junior, João Fernando Albers Koch, Altevir Signor, André Moreira Bordinhon, Fernando Kojima Nakagome, Daniel de Magalhães Araújo, Luis Gabriel Quintero Pinto, Blanca Stella Pardo Gamboa, Renan de Mattos Botelho, Érica Fernandes Paris Martins, Flavia Mota Damasceno, Pedro Luiz Pucci Figueiredo de Carvalho, Rafael Lopes da Silva, e

William Ferdinand Koptian Senske, pela amizade, respeito, auxílio na realização desse trabalho e experiências compartilhadas;

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

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

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

Aos meus amigos Fernanda Cristina Breda, Andréia Márcia de Almeida Soares (Dezza), Fernanda Dornellas Penna, Ana Camila Pelegrina Pavanelli, Daniella Aparecida Berto, Fabyola Barros de Carvalho, Ana Cristina Stradiotti, Lúcio Vilela Carneiro Girão, Gustavo do Vale Polycarpo, Érica Sernagiotto, Ana Beatriz (Gansa) pela amizade, companheirismo e presença em todos os momentos;

Ao meu companheiro Vitor Barbosa Fascina por ter me apoiado e se mantido ao meu lado em todos os momentos, pela paciência e amor;

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

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
 CAPÍTULO II	 18
SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA B ₆ EM DIETAS PRÁTICAS E PURIFICADAS NO DESEMPENHO PRODUTIVO E RESPOSTA HEMÁTICA DA TILÁPIA DO NILO SUBMETIDA A ESTÍMULO TÉRMICO.....	19
Resumo.....	19
Abstract.	20
Introdução	21
Material e Métodos	232
Resultados	26
Discussão	28
Referências Bibliográficas	34
Tabela 1. Composição químico-bromatológica e o percentual dos ingredientes das dietas experimentais práticas.....	39
Tabela 2. Composição químico-bromatológica e o percentual dos ingredientes das dietas experimentais purificadas	40
Tabela 3. Tabela 3. Média e desvio padrão de ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), taxa de eficiência protéica (TEP), taxa de retenção protéica (TRP) e sobrevivência (SOB) de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas práticas e purificadas suplementadas com níveis crescentes de vitamina B ₆	41
Tabela 4. 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 juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas práticas e purificadas e suplementadas com níveis crescentes de vitamina B ₆ e submetidos a estímulo térmico.....	42
Tabela 5. Média e desvio padrão de proteína plasmática total (PPT), albumina (ALB), globulina (GLOB) e relação albumina/globulina (ALB:GLOB) de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas práticas e purificadas e suplementadas com níveis crescentes de vitamina B ₆ e submetidos a estímulo térmico	43

Tabela 6. Mediana e valores mínimo e máximo de número absoluto leucócitos (LEUC), linfócitos (LF), neutrófilos (NT) e monócitos (MN) de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas práticas suplementadas com níveis crescentes de vitamina B ₆ e submetidos a estímulo pelo calor	44
IMPLICAÇÕES	45

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Vitaminas

As vitaminas são um grupo de compostos orgânicos complexos que se apresentam em pequenas quantidades nos alimentos, são essenciais para o equilíbrio orgânico animal e promovem sinais de deficiência em caso de ausência. São necessárias em pequenas quantidades na dieta para a manutenção da saúde, crescimento e reprodução normal do organismo (McDowell, 1989).

As vitaminas são divididas em duas classes básicas de acordo com o tipo de substância em que estas são solúveis, sendo lipossolúveis e hidrossolúveis; portanto, solúveis em solventes orgânicos e solúveis em água, respectivamente. Algumas vitaminas agem como cofatores enzimáticos (vitaminas A, K, B₆, B₁₂ e C, tiamina, niacina, riboflavina, biotina, ácido pantotênico e folato), mas nem todos os cofatores enzimáticos são vitaminas. Algumas têm função antioxidante (vitaminas C e E) e outras agem como cofatores nas reações metabólicas de oxidação-redução (vitaminas E, K, e C, niacina, riboflavina e ácido pantotênico) (Combs, 1998).

Vitamina B₆

As três formas de ocorrência natural da vitamina B₆ são a piridoxina (álcool), o piridoxal (aldeído) e a piridoxamina (amina); estas formas são metabolizadas à piridoxal fosfato no organismo animal. O piridoxal fosfato é a forma metabolicamente ativa da vitamina e participa como coenzima, principalmente no metabolismo de proteínas.

Os compostos de vitamina B₆ são absorvidos por difusão passiva, principalmente no jejuno e íleo. A capacidade de absorção é grande; existem relatos da habilidade animal de absorver quantidades na ordem de duas a três vezes maiores que sua demanda fisiológica. A força motriz para que ocorra a absorção da vitamina B₆ parece ser a fosforilação e a ligação com proteínas, que ocorrem na mucosa intestinal e sangue (Combs, 1998).

Os compostos da vitamina B₆ são absorvidos pelo intestino na forma defosforilada. O intestino delgado é rico em fosfatase alcalina para a reação de

defosforilação do piridoxal fosfato e piridoxamina fosfato. Após a absorção, estes compostos são fosforilados na mucosa jejunal pela enzima piridoxal quinase e transportados na corrente sanguínea ligados à proteínas plasmáticas. A piridoxina e piridoxamina fosforiladas são então oxidadas à piridoxal fosfato no fígado (McDowell, 1989).

O piridoxal atravessa as membranas celulares mais facilmente que o piridoxal fosfato, provavelmente por esta ser a forma mais facilmente capturada pelos tecidos, sugerindo funções das fosfatases como retenção intracelular e, talvez, também, a captura da vitamina. Após a captura pela célula, a vitamina é fosforilada pela enzima piridoxal quinase, sendo a forma predominante nos tecidos. No organismo, são armazenadas pequenas quantidades de vitamina B₆, principalmente sob a forma piridoxal fosfato, e em menor quantidade sob a forma de piridoxamina fosfato. Os principais reservatórios da vitamina são o fígado, cérebro, rim, baço e músculo, onde se encontram ligados a várias proteínas (McDowell, 1989). Menos de 0,1% do total da vitamina B₆ corporal está presente no plasma sanguíneo sob a forma de piridoxal fosfato, normalmente em concentração menor que 1mmol, ligado a proteínas (principalmente a albumina plasmática e hemoglobinas nos eritrócitos) por meio de bases Schiff (Combs, 1998).

A vitamina B₆ é comumente encontrada no sangue na forma de piridoxal fosfato, que é majoritariamente proveniente do metabolismo hepático. Este composto está contido em eritrócitos e frequentemente é usado como parâmetro de condição nutricional da vitamina B₆. A reserva corporal total de vitamina B₆ em humanos é estimado em aproximadamente 1,0 mol, sendo a maioria (80,0 a 90,0%) encontrada em músculos na forma de piridoxal fosfato, convertido pela enzima glicogênio fosforilase (Combs, 1998).

A vitamina B₆ é interconvertida metabolicamente por reações de fosforilação/defosforilação, oxidação/redução e aminação/deaminação (Figura 1). A vitamina não fosforilada penetra a membrana celular mais facilmente que seu análogo fosforilado; aparentemente, a fosforilação é importante forma de reter a vitamina intracelularmente. A enzima hepática piridoxal quinase fosforila a piridoxina, o piridoxal e a piridoxamina produzindo os correspondentes fosfatos, e estes, antes de atravessar a membrana celular, são defosforilados pela fosfatase alcalina em vários tecidos (fígado, cérebro e intestino). A forma reduzida (piridoxina ou piridoxal) pode

ser oxidada pela enzima piridoxal desidrogenase, produzindo piridoxal fosfato, que também pode ser aminado ou transaminado (Combs, 1998).

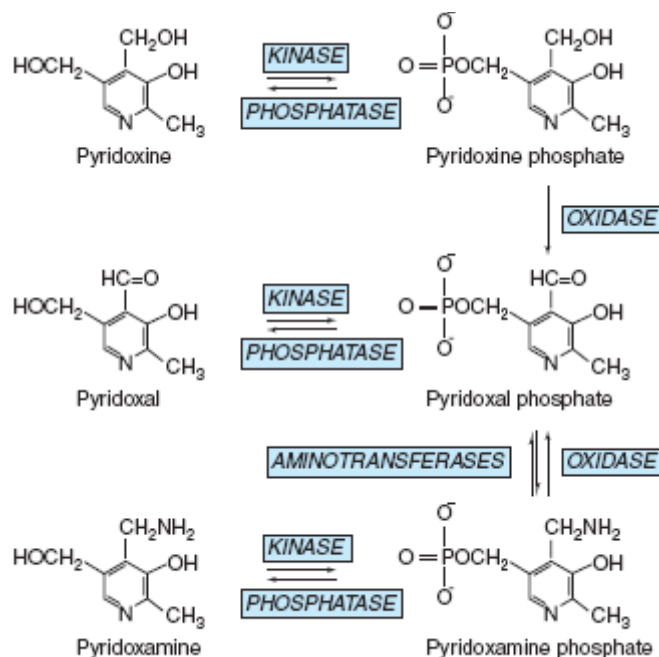


Figura 1: Interconversões da vitamina B₆ (Murray, 2008)

A enzima limitante no metabolismo da vitamina B₆ é a piridoxal fosfato oxidase, que exige a riboflavina-5'-fosfato para sua síntese. Por esta razão, a privação de riboflavina pode reduzir a conversão de piridoxina e piridoxamina à coenzima ativa piridoxal fosfato. O fígado é o órgão central para o metabolismo da vitamina, pois contém todas as enzimas envolvidas nas interconversões. As principais formas da vitamina B₆ neste órgão são o piridoxal fosfato e a piridoxina fosfato, que são mantidas em concentrações intracelulares constantes, em reservatórios endógenos que não são facilmente acessíveis para as moléculas recém-formadas. Posteriormente, um segundo reservatório, que é facilmente mobilizado para conversão metabólica, é liberado para o sangue (Combs, 1998).

O excesso de coenzimas B₆ acarreta em defosforilação destas pela fosfatase alcalina, resultando em piridoxal que pode ser reutilizado, ou em oxidação pelo aldeído oxidase e/ou NAD dependente desidrogenase, resultando em ácido piridóxico (McDowell, 1989). A ligação do piridoxal fosfato à albumina protege a coenzima da degradação na circulação. No fígado, esta é defosforilada e oxidada provavelmente pelo FAD dependente aldeído (piridoxal) oxidase bem como a NAD dependente aldeído

desidrogenase, para produzir o ácido-4'-piridóxico. O ácido piridóxico é o produto final do metabolismo, podendo ser recuperado qualitativamente na urina de indivíduos (Combs, 1998).

Níveis urinários de ácido piridóxico são inversamente proporcionais à ingestão de proteína; esse efeito parece ser maior em fêmeas do que em machos. De qualquer modo, o ácido piridóxico não é detectado na urina de indivíduos deficientes em vitamina B₆, tornando essa avaliação ferramenta para conhecimento da reserva corpórea da vitamina (Combs, 1998).

Fontes de Vitamina B₆

A vitamina B₆ é vastamente distribuída nos alimentos, ocorrendo em grandes concentrações em ingredientes de origem animal e vegetal. Grande porção de vitamina B₆ em muitos alimentos está ligada à proteínas por meio de grupo amino de resíduos de lisina e cistina. A vitamina também é encontrada nas formas quelatadas em pequenas quantidades nos alimentos, principalmente nos de origem animal. Nos grãos de cereais, as concentrações de vitamina B₆ ocorrem primariamente no gérmen e extrato aleurônico; entretanto, em consequência do refino dos grãos para a produção de farinha, muitas dessas frações são removidas, diminuindo substancialmente as concentrações da vitamina nestes alimentos (Combs, 1998).

As formas químicas da vitamina B₆ variam nos alimentos: os vegetais possuem maior quantidade de piridoxina; já os ingredientes de origem animal têm mais piridoxal e piridoxamina. Nos alimentos, a vitamina B₆ é instável em meio neutro ou alcalino, particularmente quando exposta ao calor e à luz. A piridoxina é mais estável que o piridoxal ou piridoxamina e as perdas durante o cozimento variam entre 0 a 40%, dependendo da fonte de vitamina B₆ (Combs, 1998).

A vitamina B₆ dos alimentos, quase na sua totalidade, não está disponível biologicamente. O piridoxal possui baixa disponibilidade, em ratos estima-se entre 20,0 a 30,0 % de disponibilidade dessa forma química, já em humanos, os valores aumentam para 58,0%. A presença da piridoxina quelatada reduz sua biodisponibilidade. Esta pode ser quelatada a peptídeos durante o processamento, cozimento ou digestão dos alimentos (Combs, 1998).

Funções metabólicas da vitamina B₆

A vitamina B₆ ou piridoxina age como componente de várias enzimas, envolvidas no metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos, participando, particularmente, em vários aspectos do metabolismo protéico (McDowell, 1989). A forma metabolicamente ativa da vitamina B₆ é o piridoxal fosfato, utilizado como coenzima de inúmeras enzimas, a maioria envolvida no metabolismo de aminoácidos.

O numeroso grupo de enzimas dependentes dessa piridoxina inclui as aminotransferases, que na sua maioria utiliza o α -cetoglutarato como receptor do grupamento amino. Outras enzimas dependentes do piridoxal fosfato incluem as descarboxilases, racemases e enzimas que catalisam alterações em aminoácidos de cadeia secundária. Além disso, no metabolismo de aminoácidos o piridoxal fosfato também serve como coenzima para as fosforilases e como modulador da estrutura protéica (Combs, 1998).

A transferência de grupos amino ocorre via intermediários enzima-associados do piridoxal fosfato. O sítio ativo da aminotransferase “em repouso” contém piridoxal fosfato covalentemente ligado a um ϵ -amino grupo de um resíduo de lisina, que forma parte da cadeia de aminoácidos da transferase. O complexo é, posteriormente, estabilizado por ligações iônicas e hidrofóbicas. A ligação $-\text{CH}=\text{N}-$ é chamada de base Schiff. O carbono se origina do grupo aldeído do piridoxal fosfato e o nitrogênio é doado pelo resíduo de lisina. Quando um substrato aminoácido pronto para ser metabolizado, se aproxima do sítio ativo, seu grupo amino desloca o ϵ -amino grupo da lisina e uma ligação de base Schiff é formada com o amino grupo do aminoácido substrato. Nesse ponto, a molécula derivada do piridoxal fosfato não está ligada covalentemente à enzima, mas está presa ao sítio ativo somente por interações iônicas e hidrofóbicas entre ela e a proteína. A ligação de base Schiff envolvendo o aminoácido substrato está em equilíbrio tautomérico entre uma aldimina, $-\text{CH}=\text{N}-\text{CHR}_2$, e uma cetimina, $-\text{CH}_2-\text{N}=\text{CR}$ (Devlin, 1998).

A hidrólise da cetimina libera um α -cetoácido, tornando o amino grupo parte da estrutura da piridoxamina. O reverso do processo é agora possível: um α -cetoácido reage com o grupo amino, a dupla ligação migra, e então, a hidrólise libera um

aminoácido. O piridoxal fosfato agora refaz sua base Schiff com a enzima “em repouso”. A maioria das reações que necessitam de piridoxal fosfato envolve transaminação, mas a capacidade da base Schiff de transferir elétrons entre átomos diferentes permite que esse co-fator participe quando outros grupos, como as carboxilas, devem ser eliminados (Lehninger et al., 1995).

As enzimas dependentes do piridoxal fosfato atuam na biossíntese de neurotransmissores como a serotonina (pela triptofano decarboxilase), epinefrina e norepinefrina (pela tirosina carboxilase) e γ -aminobutírico (importante fonte de energia para o cérebro) pela glutamato decarboxilase; do vasodilatador e constritor de músculos lisos histamina (pela histidina decarboxilase) e precursor porfirina para o heme (ácido δ -aminolevulínico sintetase) (Combs, 1998).

O piridoxal fosfato tem papel proeminente no metabolismo do triptofano e muitas enzimas nessa via são dependentes deste composto. A quinureninase é afetada pela deficiência da vitamina B₆, enzima que remove a alanina do 3-hidroxiquinurenina no metabolismo do triptofano. Além disto, a quinureninase catalisa a reação análoga utilizando a quinurenina não hidroxilada como substrato, produzindo o análogo não hidroxilado do 3-hidroxiquinurenina, o ácido antralínico. Aminotransferases dependentes de B₆ também são capazes de metabolizar a quinurenina e 3-hidroxiquinurenina, produzindo os ácidos quinurênico e xanturênico, respectivamente (Combs, 1998). Pelo fato de outras aminotransferases terem maior afinidade de ligação com o piridoxal fosfato do que a quinureninase, a privação da vitamina B₆ reduz primariamente a atividade desta enzima, prejudicando a conversão metabólica do triptofano à niacina, aumentando a produção de ácido xanturênico, que é eliminado pela urina (Devlin, 1998).

A vitamina B₆ é necessária para que haja liberação de glicose a partir do glicogênio, pois atua como coenzima da glicogênio fosforilase. Esta enzima catalisa a primeira etapa de degradação de glicogênio, reação na qual o fosfato inorgânico é usado na clivagem de uma ligação glicosídica α -1,4, gerando glicose 1-fosfato (Devlin, 1998). Por esta razão, mais da metade da vitamina B₆ corpórea está nos músculos e na glicogênio fosforilase (Combs, 1998).

A enzima serina palmitoil-transferase, necessária para a biossíntese de esfingolipídeos, tem como cofator o piridoxal fosfato, assim como outras enzimas

envolvidas na síntese de fosfolipídeos. O piridoxal fosfato parece ter função moduladora sobre receptores de hormônios esteróides, inibindo a indução da tirosina aminotransferase por glicocorticóides, provavelmente formando ligações de base Schiff com o sítio de ligação do DNA do complexo de esteróides receptores, inibindo a ligação ao DNA e deslocando o complexo do núcleo (Combs, 1998).

A vitamina B₆ atua no suporte da competência imune; porém, esta ação não está bem elucidada. Estudos com animais e humanos têm demonstrado efeitos de privação de vitamina B₆ nas respostas imunes humoral (diminuição na produção de anticorpos) e mediadas por células (linfocitofilia, redução de respostas de hipersensibilidade retardada, redução de células T citotóxicas e diminuição na produção de citocina). Esses efeitos podem ser relacionados às atividades diminuídas de muitas enzimas dependentes de piridoxal fosfato, tais como serina transhidroximetilase e timidilato sintetase, diminuindo o metabolismo do carbono-1 e a síntese de DNA (Combs, 1998; Devlin, 1998).

A hemoglobina é uma proteína conjugada, composta por uma proteína simples, a globulina, e por um núcleo prostético, do tipo porfirina, chamado heme, cujo principal componente químico é o ferro. Dentre as vitaminas do complexo B essenciais para a eritropoiese destaca-se a piridoxina (Feldman et al., 2000). Esta vitamina está envolvida no primeiro passo da síntese do ácido aminolevulínico (ALA), que é a condensação de resíduo de glicina com resíduo de succinil CoA, e que ocorre pela ação da ALA sintetase, enzima dependente do piridoxal fosfato (Kaneko et al., 1997). Esta enzima controla a etapa velocidade limitante da síntese do heme em todos os tecidos (Figura 2). A modulação da atividade da ALA sintetase determina a quantidade dos substratos que serão desviados para a biossíntese do heme. O heme, e também a hematina, agem como repressor da síntese da ALA sintetase e como inibidor da sua atividade (Devlin, 1998).

A exigência em piridoxina elucida a anemia responsiva a deficiência desta vitamina (Feldman et al., 2000). Portanto, a ausência ou a concentração inadequada da piridoxina, pode prejudicar a síntese de eritrócitos, afetando a saúde do animal. A anemia é descrita, segundo Feldman et al. (2000), como sendo a diminuição da habilidade do sangue em suprir concentrações adequadas de oxigênio para os tecidos desenvolverem as funções metabólicas adequadamente. Além destas funções a vitamina B₆ age na formação de anticorpos e transporte de aminoácidos (McDowell, 1989).

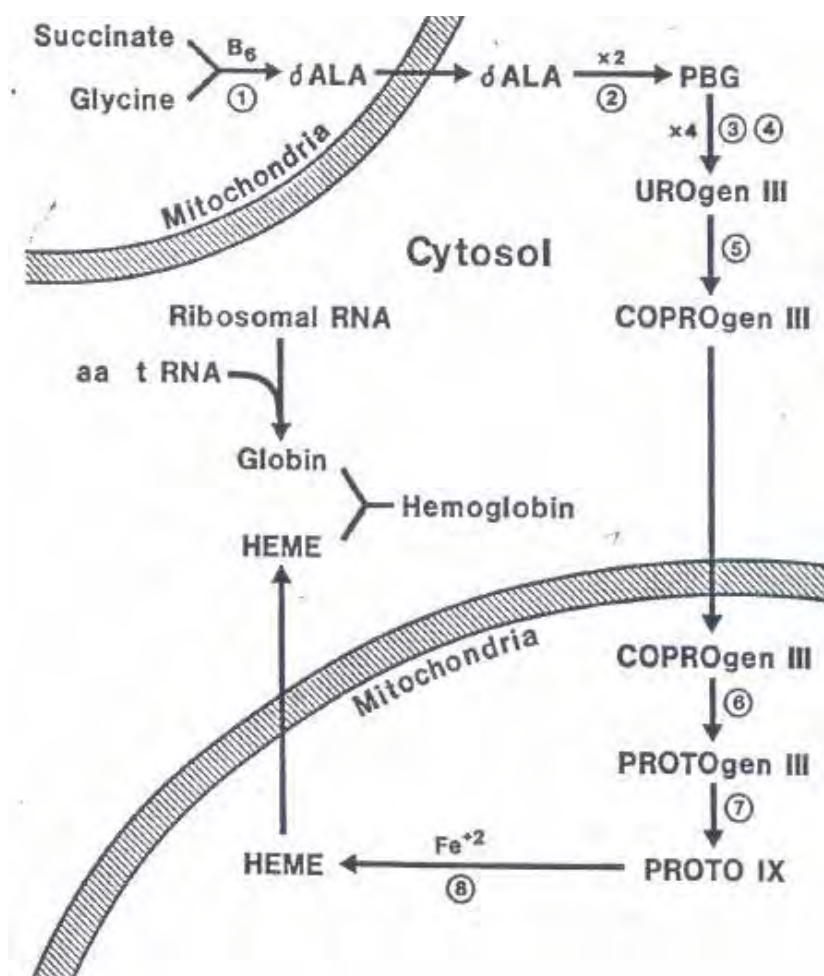


Figura 2. Síntese da hemoglobina (Feldman et al., 2000)

Hematologia, Nutrição e Estresse

O sangue, tecido líquido, móvel, do tipo conjuntivo, está em equilíbrio com praticamente todos os outros tecidos, constituindo uma das grandes forças homeostáticas do organismo (Kalashnikova, 1986). Distribui calor, transporta gases respiratórios, nutrientes e produtos de excreção, além de atuar na defesa do organismo. A aplicação da hematologia em pesquisa animal é bem aceita e considerada como procedimento de rotina em métodos de diagnósticos (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

Ao longo da história evolutiva, os peixes tiveram cerca de 300 milhões de anos para desenvolver o conjunto de adaptações, a fim de manter a homeostase orgânica na interação com os ambientes. Hoje, tanto nos ambientes naturais como nos artificiais, os peixes vêm sendo expostos às condições ambientais e orgânicas cada vez mais desafiadoras do ponto de vista biológico. Tais condições têm efeitos negativos na saúde, crescimento, reprodução e sobrevivência desses animais e podem resultar inclusive em mudanças populacionais. Em termos gerais, estresse é o estado orgânico produzido pela condição ambiental ou mesmo pela condição orgânica, que induzem a mudanças fisiológicas e bioquímicas acima dos níveis normais (Val et al., 2004). Assim, em peixes, a presença, quantidade e proporção das diferentes células no sangue periférico refletem o estado fisiológico do organismo, em um dado momento ou durante determinado período da vida (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

O estado nutricional do animal, consequência direta e indireta da quantidade e qualidade dos nutrientes presentes e disponíveis na ração, tornou-se objetivo de pesquisas para desenvolver estratégias nutricionais que influenciem, positivamente, a saúde e resistência orgânica dos peixes. Embora a importância da nutrição para a manutenção da higidez dos peixes seja evidente, os questionamentos ainda superam os resultados conclusivos nesta linha de pesquisa (Barros et al., 2006).

As rações, adequadamente formuladas, são compostas, principalmente, por macronutrientes (proteínas, lipídeos e carboidratos) e micronutrientes (vitaminas e minerais). Embora ambas as classes de nutrientes possam afetar a saúde dos peixes, algumas vitaminas e minerais têm sido mais estudados. As exigências nutricionais ficam melhor evidenciadas na condição de ausência do nutriente na ração, sendo os sinais clínicos mais facilmente identificáveis. No entanto, sabe-se que não só a ausência, mas também a sub-dosagem e o excesso de nutrientes podem ser prejudiciais à saúde dos peixes (Barros et al., op. cit.).

Modificações consideradas discretas na formulação das rações podem não causar sinais visíveis de alterações. Porém, podem influenciar a resistência a doenças e colocar os peixes em condição de deficiência marginal. Frequentemente é difícil diagnosticar a causa de deficiências nutricionais, porque a exigência quantitativa dos nutrientes está determinada, especificamente, para crescimento. Mudanças fisiológicas seguidas de

diferentes condições de estresse (nutricional, físico, químico, dentre outros) são detectadas por meio da avaliação de parâmetros sanguíneos como: eritrograma, leucograma, proteína plasmática total, globulinas, imunoglobulinas, eletrólitos e hormônios. Eritropoiese e leucopoiese anormais têm sido detectadas na ausência e ou concentrações insuficientes de diversos nutrientes na ração (Barros et al., 2006).

O uso de parâmetros hematológicos, como indicadores de saúde, foi proposto por Hesser (1960). Porém, esta técnica tem sido modestamente utilizada em sistemas de produção. Contudo, Ranzani-Paiva e Silva-Souza (2004) ressaltaram que avaliações sanguíneas relacionadas à respostas fisiológicas dos peixes têm sido mais frequentemente adotadas por pesquisadores.

Vários autores encontraram relação direta entre variações do quadro hemático e temperatura da água. Assim, Ranzani-Paiva e Godinho (1986) constataram que, no rio Mogi-Guaçu – SP, *Prochilodus scrofa* apresenta valores mais altos para a porcentagem de hematócrito e número de eritrócitos no inverno. Embora a taxa de hemoglobina tenda a permanecer constante durante as estações do ano, a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) sofre acentuada redução no inverno. Pastor (1983) afirmou que o aumento do hematócrito, relacionado à diminuição da temperatura, pode significar resposta fisiológica ao estresse causado por essa diminuição com a reposição excedendo a taxa de mortalidade das células sanguíneas.

Val (1986), por outro lado, verificou que *Colossoma macropomum* do rio Solimões – AM apresenta aumento do número de eritrócitos e taxa de hemoglobina com a elevação da temperatura da água, e que a porcentagem de hematócrito e os índices hematimétricos não sofreram alteração. A elevação dos valores hemáticos em altas temperaturas pode representar necessidade de aumentar a captação de O₂ em períodos de baixas concentrações deste gás, prevalentes em águas mais quentes. Assim, a variação sazonal observada em peixes selvagens corresponde, nestas condições, ao padrão normal (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

Estresse em peixe

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

Na aquicultura variações de temperatura da água são frequentes e a adaptação a esta situação faz parte da fisiologia dos peixes. Porém, a intensificação da produção torna essas variações fator crítico relacionado ao estresse, com consequente supressão do sistema imune. Ao deparar com o agente estressor, os peixes são capazes de acionar diversos ajustes nos vários níveis de organização biológica, como forma de minimizar os efeitos orgânicos impostos e manter, assim, suas funções biológicas. Ao perceber alterações ambientais ou fisiológicas, o animal desencadeia ajustes, começando normalmente com mudança de comportamento. Em termos gerais, as respostas a agentes estressores podem ser classificadas em respostas primárias, secundárias e terciárias (Iwama et al., 1999).

O uso de estratégias nutricionais que favoreça o mecanismo de defesa dos peixes tem demonstrado grande importância para a obtenção de peixes saudáveis. Os animais resultantes desta técnica se tornam mais capazes em reagir ao impacto de alterações ambientais e ataque de agentes oportunistas, isto com maiores chances de sobrevivência (Torrecillas et al., 2007). Desta forma, é preciso que os peixes possuam condições nutricionais saudáveis para construir seu próprio sistema de defesa e, assim, torná-los aptos a responder aos desafios impostos.

São consideradas estratégias nutricionais, o uso de nutrientes e compostos, em quantidades adequadas, que possam permitir o crescimento desejado com melhores condições de higiene (Barros et al., 2006). O uso de estratégias nutricionais exige

conhecimento das exigências nutricionais, baseado na saúde e crescimento dos peixes. Evidências têm indicado que, a maioria, se não todos, nutrientes dietários essenciais, bem como, o manejo alimentar, influenciam a resistência às doenças (Webster, 2007).

Exigência e sinais clínicos de deficiência

A exigência de vitamina B₆ pode ser afetada por diversos fatores, tais como espécie, sexo, idade, estágio de maturação gonadal, função fisiológica, componentes dietários e flora intestinal, entre outros. Algumas espécies de peixes têm demonstrado exigência dietária de piridoxina para crescimento e hematopoiese normais, incluindo salmónídeos (Halver, 1957; Phillips e Livingston, 1965), bagre do canal (Dupree, 1966), carpa comum (Ogino, 1965), e yellowtail (Sakaguchi et al., 1969). Em peixes, a deficiência de vitamina B₆ tem sido associada à diminuição do ganho de peso, anorexia, edema, tetania, convulsões, forma epileptiforme e outras desordens neurológicas (Halver, 1989).

Lim et al. (1995) observaram que 3,0 mg de piridoxina/kg da dieta foi suficiente para máximo crescimento, eficiência alimentar, sobrevivência e prevenção de vários sinais de deficiência em tilápias híbridas vermelhas. Mohamed (2001) observou sinais de deficiência de vitamina B₆ como anorexia, letargia, tetania, convulsões e hemorragias no intestino e fígado em dietas ausentes de piridoxina em bagre indiano (*Heteropneustes fossilis*) e concluiu que a exigência deste peixe para o máximo crescimento foi de 3,21 mg de piridoxina/kg da dieta e para manutenção de parâmetros sanguíneo normais de 3,4 mg/kg da dieta.

Kissil et al. (1981) determinaram para o gilthead seabream (*Sparus auratas*) de tamanhos diferentes, o nível de 1,97 mg de piridoxina/kg da dieta. No entanto, estes autores observaram que este nível não proporcionou atividade suficiente da alanina aminotransferase, indicando que o nível proposto de exigência deva estar aquém das necessidades do animal, embora não apresentando sinais clínicos de deficiência. De acordo com Lovell (1998) sinais de deficiência desenvolvem-se rapidamente nos peixes, incluindo desordens nervosas como hipersensibilidade a ruídos, falta de coordenação no nado, convulsões, tetania quando manejados, desenvolvimento de

coloração azul-esverdeada da pele do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) e edema, exoftalmia e lesões na pele na carpa comum (*Cyprinus carpio*).

Andrews e Murai (1979), estudando a exigência de piridoxina para o bagre do canal, determinaram que esta espécie necessita aproximadamente 3,0 mg/kg da dieta para crescimento máximo. Estes autores observaram ainda, efeito deletério nos parâmetros hematológicos de níveis elevados de piridoxina (20 mg/kg da dieta) como anemia microcítica e normocrômica. Albrektsen et al. (1993) testaram dietas práticas com níveis crescente de vitamina B₆ para salmão do Atlântico e o desafiaram com a bactéria *Aeromonas salmonicida*. Concluíram que a vitamina não melhorou a resistência à bactéria e que o crescimento, mortalidade e hematologia também não foram afetados pela suplementação.

Segundo Devlin (1998), a necessidade de vitamina B₆ na dieta é diretamente proporcional ao conteúdo protéico, devido ao grande número de aminotransferases dependentes de piridoxal fosfato. Deste modo, Hilton (1989) sugeriu que, possivelmente, a interação entre a vitamina B₆ e os níveis de proteína na dieta poderia ocorrer em peixes, por estes animais possuírem maior exigência em proteína que a maioria das espécies de animais domésticos. Este autor enfatizou ainda, que os peixes, por possuírem maior exigência de proteína, possivelmente teriam maior exigência para a vitamina B₆. Shiau e Hsieh (1997) concluíram que para juvenis de tilápia híbrida quanto maior a concentração de proteína dietária, maior será a necessidade de suplementação de vitamina B₆.

Com base nessas informações, esta pesquisa se apresenta em um capítulo intitulado:

Capítulo II – “Suplementação de vitamina B₆ em dietas práticas e purificadas no desempenho produtivo e resposta hematológica da tilápia do Nilo submetida a estímulo térmico”. A redação deste capítulo foi realizada de acordo com as normas de publicação da revista *Journal of Applied Aquaculture*.

REFERÊNCIAS

ALBREKTSEN, S.; WAAGBO, R.; SANDNES, K. Tissue vitamin B₆ concentrations and aspartate aminotransferase activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed graded dietary levels of vitamin B₆. **Fish Dir. Skr. Ser. Ernær.**, v. 6, p. 21-34, 1993.

ANDREWS, J. W.; MURAI, T. Pyridoxine requirements of channel catfish. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 109, p. 553-537, 1979.

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

COMBS, G. F. **The Vitamins, fundamental aspects in nutrition and health**. New York: Academic, 1998. 616 p.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1998. 1007 p.

DUPREE, H. K. **Vitamin essential for growth of channel catfish, *Ictalurus punctatus***. Washington, DC: Bureau of Sports Fisheries and Wildlife, 1966. 12p. (Technical paper, n. 7).

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, , 2000. 1344 p.

HALVER, J. E. Nutrition of salmonoids fishes III: water-soluble vitamin requirements of Chinook salmon, **Journal of Nutrition**, Atlantic City, v. 62, p. 245-254, 1957

HALVER, J. E. The vitamins. In: HALVER, J. E. (Ed.). **Fish nutrition**. 2nd ed. New York: Academic, 1989. p. 31-109.

HESSER, E. F. Methods for routine on fish hematology. **The Progressive Fish Culturist**, Washington, v. 22, p. 164-171, 1960.

HILTON, J. W. The interaction of vitamins, minerals and diet composition in the diet of fish. **Aquaculture**, Netherlands, v. 79, p. 223-244, 1989.

IWAMA, G. K.; VIJAYAN, M. M.; MORGAN, J. D. The stress response in fish. In: SAKSENA, D. N. (Ed.) **Ichthyology**: recent research advances. Enfield: Science, 1999. p. 47-57.

KALASHNIKOVA, Z. M. On the classification of morphological elements in the blood of fish. **Journal of Ichthyology**, v. 3, n. 16, p. 459-472, 1976.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. New York: Academic, 1997. 932 p.

KISSIL, G. W. et al. Pyridoxine requirements of the gilthead bream, *Sparus aurata*. **Aquaculture**, Netherland, v. 23, p. 243-255, 1981.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Savier, 1995. 839 p.

LIM, C.; LEAMASTER, B. R.; BROCK, J. A. Pyridoxine requirement of fingerling red hybrid tilapia grown in seawater. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 5, p. 49-60, 1995.

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

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

MOHAMED, J. S. Dietary pyridoxine requirement of the Indian catfish, *Heteropneustes fossilis*. **Aquaculture**, Netherland, v. 194, n. 3, p. 327-335, 2001.

MURRAY, R. K. **Harper bioquímica ilustrada**. 27. ed. McGraw-Hill Brasil, 2008. 632 p.

OGINO, C. B vitamin requirements of carp, *Cyprinus carpio*: I. deficiency symptoms and requirements of vitamin B₆. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, v. 31, p. 546-551, 1965.

PASTOR, S. M. Observations on hematocrit and body form of hatchery-reared lake trout. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 45, n. 4, p. 191-195, 1983.

PHILLIPS, A. M. Jr.; LIVINGSTON, D. L. The effect of season of the year and fish size on the pyridoxine requirement of brook trout. **The nutrition of trout**. v.19, n. 3, p. 15-19, 1965.

RANZANI-PAIVA, M. J.; GODINHO, H. M. Hematological characteristics of curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae), stocked in experimental conditions. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 13, n. 2, p. 115-120, 1986.

RANZANI-PAIVA, M. J.; SILVA-SOUZA, A. T. **Hematologia de peixes brasileiros**. São Paulo: Varela, 2004. p. 89-120.

SAKAGUCHI, H.; TAKEDA, F.; TANGE, K. Studies on vitamin requirements by yellowtail: 1. Vitamin B₆ and vitamin C deficiency symptoms. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**, v. 35, p. 1201-1206, 1969.

SHIAU, S.Y.; HSIEH, H.L. Vitamin B₆ requirements of tilapia *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* fed two dietary protein concentrations. **Fish. Science**, v. 63, p. 1002-1007, 1997.

TORRECILLAS, S. et al. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 5, p. 969-981, 2007.

VAL, A. L. *Hemoglobinas de Colossoma macropomum, Cuvier, 1819 (Characoidei, Pisces): Aspectos adaptativos (Ilha de Marchantaria-Manaus-AM)*. 1986 112 p. Tese (Doutorado Biologia de Água Doce e Pesca Interior)-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, 1986.

VAL, A. L.; SILVA, M. N. P.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. **Estresse em peixes: ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos**. São Paulo: Varela, 2004. p. 75-88.

WEBSTER, C. Minerals and fish health. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 2., 2007, Botucatu, SP. **2º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes**

(Anais) Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2007. p. 21-34.

CAPÍTULO II

Suplementação de vitamina B₆ em dietas práticas e purificadas no desempenho produtivo e resposta hemática da tilápia do Nilo submetida a estímulo térmico

RESUMO – A pesquisa teve por objetivo avaliar a suplementação de vitamina B₆ em dietas práticas (Estudo – I) e purificadas (Estudo – II) sobre o desempenho produtivo e resposta hemática da tilápia do Nilo submetida a estímulo térmico. O período experimental foi de 91 dias, Estudo – I, e 84 dias, Estudo - II. No Estudo – I, 192 alevinos com peso médio inicial de $8,41 \pm 0,22$ g, foram distribuídos aleatoriamente em 32 tanques-rede de 200L (quatro tanques-rede/ aquário de 1000 L). No Estudo – II, 140 alevinos com peso médio inicial de $6,32 \pm 0,16$ g, foram distribuídos em 28 aquários de 50L. Foram avaliadas oito dietas, sendo quatro práticas e quatro purificadas com níveis crescentes de piridoxina (0,0; 5,0; 10,0 e 20,0 mg de piridoxal HCl /kg da dieta). Ao final do período experimental os peixes foram pesados e a ração quantificada para a avaliação do desempenho produtivo (ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar aparente, taxa de eficiência proteica, taxa de crescimento específico, taxa de retenção proteica e porcentagem de sobrevivência). Posteriormente, foram efetuadas as análises hematológicas dos peixes (contagem de eritrócitos, porcentagem de hematócrito, taxa de hemoglobina e confecção de lâminas de extensão sanguínea). Em seguida, 48 peixes foram transferidos para a sala de desafio, distribuídos em 24 aquários de 40 L (dois peixes/ aquário) e submetidos por três dias ao estímulo térmico (32°C). Após este período, foram realizadas as mesmas análises hematológicas feitas anteriormente. Os peixes alimentados com dietas não suplementadas de piridoxina apresentaram menor ganho de peso e baixa retenção de proteína na carcaça. Sinais clínicos de deficiência de piridoxina como apatia, natação errática e hipersensibilidade foram observados em peixes alimentados com dieta purificada não suplementada, que, além de estarem anêmicos, apresentaram baixa porcentagem de sobrevivência. A presença de níveis adequados de vitamina B₆ é essencial para o adequado crescimento e higidez da tilápia do Nilo e a exigência é de 5,0 mg de piridoxina /kg da dieta.

Palavras chave: desempenho produtivo, hematologia, piridoxina, proteína, temperatura

VITAMIN B₆ REQUIREMENT OF NILE TILAPIA FED PRACTICAL AND PURIFIED DIETS: PERFORMANCE AND HEMATOLOGICAL RESPONSES

ABSTRACT – The aim of this study was to evaluate the vitamin B₆ supplementation in practical and purified diets on growth performance and hematological response of Nile tilapia submitted to heat stress. The 91-day and 84-day trials were undertaken out, to evaluate the effect of vitamin B₆ on hematological parameters and plasma protein plasma of Nile tilapia. 192 Nile tilapia fingerlings with approximately 8 g weight were randomly stocked into 32 200L-aquaria and fed practical diets, and 140 fingerlings with 6 g weight were randomly stocked into 28 50L-aquaria fed diets containing graded levels of vitamin B₆ (0, 5, 10 and 20 mg pyridoxal HCl/kg diet). At the end of the experimental period, fish and diets were weighed to evaluate weight gain, feed intake, feed conversion ratio, survival, specific growth rate, protein efficiency ratio and protein retention. Afterward, fish were bled and sample collected to evaluate hematological parameters. After these analyses the fish were transferred to the challenge room and distributed into 48 aquaria, remaining at temperature of 32°C during three days. At the end, the same hematological analyses were performed. Fish fed the non-supplemented diet showed reduced weight gain and protein retention. Clinical signs of vitamin B₆ deficiency observed of fish fed purified diet non-supplemented resting and abnormal swimming, behavior and hypersensitivity, anemia and low survival were observed. Vitamin B₆ requirement of Nile tilapia is 5.0 mg pyridoxal/kg diet.

Key words: growth performance, hematology, pyridoxine, protein, temperature.

INTRODUÇÃO

A nutrição de peixes tem se desenvolvido globalmente, de forma a acompanhar o crescimento global da aquicultura. No entanto, o aumento no desenvolvimento desta área de conhecimento da Zootecnia tem se fixado principalmente na energia, proteína aminoácidos e ácidos graxos e suas respostas sobre o desempenho dos peixes mais cultivados no Brasil. Alia-se a isto, a necessidade de produzir dietas que proporcionem peixes com maior resistência a fatores estressantes, sendo comum considerar apenas as respostas sobre o desempenho produtivo nos estudos de determinação das exigências nutricionais.

Estudos abordando a exigência em vitamina têm sido conduzidos utilizando dietas purificadas ou semipurificadas de forma a reduzir a influência de fatores extrínsecos. Apesar de serem mais precisos, seus resultados geralmente são imprevisíveis quando extrapolados para condições práticas. Desta forma, a utilização de ingredientes convencionais e o processo de extrusão na confecção das dietas em estudos convencionais em vitaminas podem tornar as condições mais reais, visto as condições experimentais serem semelhantes àsquelas utilizadas no processo de produção comercial de tilápias (Guimarães, 2009).

Vários são os aspectos a serem avaliados numa ração os quais, em função da participação metabólica, podem determinar o preparo do peixe para transpor situações adversas. As vitaminas são elementos essenciais para a vida, e a maioria possui em sua estrutura compostos nitrogenados, os quais o organismo não é capaz de sintetizar. Portanto, a ausência ou concentrações inadequadas destes elementos na alimentação provocam manifestações de carência no organismo (Devlin, 1998).

A vitamina B₆ é uma vitamina hidrossolúvel, e suas formas de ocorrência natural são a piridoxina, piridoxal e piridoxamina. As três formas são eficientemente convertidas pelo organismo em piridoxal fosfato, forma metabolicamente ativa necessária para a síntese, catabolismo e interconversão de aminoácidos (Devlin, 1998). Dentre as vitaminas do complexo B essenciais para a eritropoiese, destacam-se a piridoxina, folato, riboflavina, niacina, tiamina e cianocobalamina (Feldman et al., 2000). O primeiro passo na síntese da hemoglobina é a formação do ácido aminolevulínico a partir do succinato (ciclo de Krebs) e da glicina. A vitamina B₆ atua,

nesta fase, como cofator da enzima aminolevulínico sintetase, ALA-sintetase (Kaneko et al., 1997). A exigência em piridoxina elucida a anemia responsiva na deficiência desta vitamina (Feldman et al., 2000). Portanto, a ausência ou a concentração inadequada da piridoxina, podem prejudicar a síntese deste composto, afetando à saúde do animal. A anemia é descrita, segundo Feldman et al. (2000), como sendo a diminuição da habilidade do sangue em suprir concentrações adequadas de oxigênio para os tecidos que permitam desenvolver as funções metabólicas adequadamente.

Mudanças fisiológicas seguidas de diferentes condições de estresse, nutricional, físico, químico, dentre outros, são detectadas por meio da avaliação de parâmetros sanguíneos como: eritrograma, leucograma, proteína plasmática total, globulinas, imunoglobulinas, eletrólitos e hormônios. Eritropoiese e leucopoiese anormais têm sido detectadas na ausência e ou concentrações insuficientes de diversos nutrientes na ração (Barros et al., 2006).

Com base no exposto, esta pesquisa teve por finalidade avaliar a suplementação de níveis crescentes de piridoxina, em dietas práticas e purificadas, no desempenho produtivo e na resposta hemática da tilápia do Nilo submetida a estímulo térmico.

MATERIAL E MÉTODOS

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

Foram utilizados alevinos de tilápia do Nilo, inicialmente alojados em aquários de 250 L, para seleção e distribuição nos aquários experimentais. Os peixes foram alimentados com dieta prática isenta de suplementação de piridoxina durante 15 dias antes do início do experimento com objetivo de depletar as reservas de vitamina B₆. No início da pesquisa, 20 peixes foram amostrados para a análise de matéria seca e proteína total da carcaça. Estes peixes foram anestesiados por imersão em solução alcoólica de benzocaína à 67 mg/L de água até completa sedação e morte.

No Estudo - I (dietas práticas), os alevinos com peso médio de $8,41 \pm 0,22$ g foram distribuídos em 32 tanques-rede (quatro tanques-rede/ aquário de 1000 L), com capacidade de 200 L e com densidade de seis peixes por tanque-rede. No Estudo – II (dietas purificadas), os alevinos com peso médio de $6,32 \pm 0,16$ g foram distribuídos em 28 aquários de 50 L com densidade de cinco peixes por aquário. Os aquários utilizados eram dotados de sistema de recirculação de água, com aquecimento controlado por sistema digital integrado e temperatura da água constante ($26,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). A água do sistema era acoplada a central de aeração e filtragem físico-biológica, a qual manteve sua qualidade e possibilitou dez renovações diárias. O arrazoamento foi feito até saciedade aparente quatro vezes ao dia (8h00, 11h00, 14h00, 17h00), de forma a não haver sobra nos aquários.

As dietas foram balanceadas de acordo com os valores de proteína e aminoácidos digestíveis determinados por Furuya et al. (2001) e Guimarães et al. (2008), sendo os demais valores utilizados de acordo com os coeficientes de digestibilidade da energia e nutrientes dos alimentos determinados por Pezzato et al. (2002). As rações práticas e purificadas foram formuladas para atender a exigência em 28,0% de proteína digestível e 3000 kcal/kg de ração em energia digestível. O suplemento vitamínico e mineral adicionado era isento de vitamina B₆, e a fonte utilizada da vitamina foi o cloridrato de piridoxina com 96% de atividade (Tabelas 1 e 2).

Foram avaliadas dietas práticas e purificadas com quatro níveis de suplementação de piridoxina, que constituíram os tratamentos: dieta controle ausente de suplementação de piridoxina; suplementada com 5,0 mg de piridoxina HCl/kg; suplementada com 10,0 mg de piridoxina HCl/kg da dieta e suplementada com 20,0 mg de piridoxina HCl/kg da dieta.

As dietas elaboradas, após a pesagem e homogeneização dos ingredientes, foram acrescidas de água a $55,0^{\circ}\text{C}$, na proporção de 25% do peso total da mistura. Posteriormente, a mistura foi processada em extrusor de rosca simples de forma a se obter grânulos com diâmetro aproximado de 4,0 mm e desidratada em estufa de ventilação forçada de ar à $55,0^{\circ}\text{C}$, durante 12h.

Diariamente foi medida a temperatura da água e, semanalmente, o pH, teor de oxigênio dissolvido e amônia total. Os aquários foram sifonados mensalmente nos dois

primeiros meses e depois de 60 dias foram sifonados quinzenalmente, para manter a qualidade da água. Ao final de 91 dias (Estudo – I), e 84 dias (Estudo – II), foram determinados os valores de ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de sobrevivência (SOB), taxa de eficiência protéica (TEP), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de retenção protéica (TRP). Após a pesagem dos animais, foram realizadas as análises hematológicas, antes e após o estímulo térmico. O conteúdo de proteína bruta, matéria seca, extrato etéreo e cinzas das dietas foram determinados de acordo com os protocolos da AOAC (1995). A vitamina B₆ nas dietas foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC.

Para a avaliação dos parâmetros hematológicos foram retirados aleatoriamente seis peixes por tratamento dentre os tanques-redes (Estudo - I) e aquários (Estudo - II). Os peixes foram anestesiados (benzocaína, 1g/15 L de água) e, após estarem completamente sedados, foram realizadas as coletas de sangue por punção vaso caudal, com seringa de 1,0 mL banhada com anticoagulante, EDTA a 3,0%.

A contagem do número de eritrócitos (Erit) foi realizada pelo método do hemocítmetro em câmara de Neubauer, utilizando-se Azul de Toluidina Merck® a 0,01%, diluído em solução fisiológica 0,9%, em pipeta de Thoma na proporção 1:200. A taxa de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se kit comercial Hemoglobina Analisa Diagnóstica®, para determinação colorimétrica. A porcentagem de hematócrito (Htc) foi obtido utilizando-se o método do microhematócrito. As variáveis acima apresentadas foram avaliadas utilizando-se as técnicas descritas por Jain (1986). Foram determinados os índices hematimétricos volume corpuscular médio [$VCM = (Htc/eritrócitos) \times 10$] e concentração de hemoglobina corpuscular média [$CHCM = (Hb/Htc) \times 100$], úteis na classificação morfológica das anemias e avaliação da resposta eritropoiética (Wintrobe, 1934).

A diferenciação dos leucócitos foi realizada em extensão sanguínea, corada com May-Grünwald Giemsa (Rosenfeld, 1947). Para tal, as lâminas foram previamente limpas, desengorduradas e devidamente identificadas (duas lâminas/peixe). Após a confecção essas foram acondicionadas em caixas apropriadas e posteriormente coradas utilizando-se técnica descrita por Jain (1986). A contagem diferencial foi realizada em microscópio utilizando-se aumento 100X. Foram contadas 200 células, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular de interesse.

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

Após as avaliações hematológicas, os peixes foram transferidos para a sala experimental de desafio por temperatura, que era composto de 24 aquários de 40 L, com filtros individualizados e aeração. Foram distribuídos aleatoriamente 48 peixes, na densidade de dois peixes por aquário. O delineamento experimental foi 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 aumentada gradativamente para 32,0°C, acima do conforto térmico para a espécie, permanecendo neste valor por três dias. Ao final desse período foram avaliados os mesmos parâmetros hematológicos do momento anterior ao estímulo.

Os dados de ganho de peso médio, taxa de crescimento específico, taxa de eficiência protéica e taxa de retenção protéica foram submetidos à técnica de análise de variância para o modelo com um fator, complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados de conversão alimentar aparente (CAA) e sobrevivência (SOB) foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado com as comparações múltiplas de Dunn (Zar, 1999). 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 físico-químicos da água: pH, oxigênio dissolvido (mg/L), amônia total (mg/L) , e alcalinidade (mg de CaCO_3 / L) foram: $7,0 \pm 0,5$; $7,05 \pm 0,15$; $0,11 \pm 0,07$; $100,00 \pm 10,00$, respectivamente. Os parâmetros de qualidade da água foram adequados e recomendados para a espécie em estudo de acordo com Boyd (1996).

Os valores de GP, CR, CAA, TEP, TRP e SOB, para as dietas práticas e purificadas, estão apresentados na Tabela 3. Os peixes alimentados com as dietas não suplementadas (prática e purificada) apresentaram menor ganho de peso em relação aos alimentados com as dietas suplementadas. Os peixes alimentados com dieta prática suplementada com 10,0 mg de piridoxina apresentaram maior ganho de peso. Os peixes alimentados com dietas práticas apresentaram maior ganho de peso e consumo de ração que os que alimentados com dietas purificadas.

Os peixes alimentados com dieta purificada isenta de suplementação apresentaram pior conversão alimentar aparente em relação aos peixes que receberam dietas purificadas suplementadas e dietas práticas, suplementadas ou não. A suplementação de vitamina B₆ não influenciou a taxa de eficiência proteica dos animais alimentados com dietas práticas. Já nos animais arraçados com dieta purificada ausente de suplementação estes índices foram menores.

A suplementação de piridoxina favoreceu a taxa de retenção proteica, sendo que a inclusão de 10,0 e 20,0 mg de piridoxina/kg nas dietas prática e purificada, respectivamente, determinaram maior retenção proteica nos peixes. Para porcentagem de sobrevivência, peixes alimentados com dieta purificada ausente de suplementação apresentaram menores valores em relação aos alimentados com dietas purificas e suplementadas com piridoxina e quando comparado com dieta prática não suplementada.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores médios de Erit, Htc, Hb, VCM e CHCM, na fase anterior (Fase I) e posterior (Fase II) ao estímulo térmico.

A suplementação de piridoxina nas dietas práticas não influenciou o número de eritrócitos dos peixes antes do estímulo térmico. Porém, peixes alimentados com dietas purificadas ausentes de piridoxina apresentaram menor número de eritrócitos, antes e após o estímulo térmico. A porcentagem de hematócrito aumentou em peixes

alimentados com dietas prática após o estímulo térmico; apenas os animais arraçoados com dieta suplementada com 20 mg de piridoxina/ kg apresentaram valores menores para este parâmetro. Os peixes alimentados com dieta purificada ausente de suplementação apresentaram baixa porcentagem de hematócrito em relação às dietas purificadas suplementadas e dieta prática ausente de suplementação.

A taxa de hemoglobina de peixes alimentados com dietas práticas não foi influenciada pela suplementação de piridoxina. Entretanto, os animais arraçoados com dieta purificada ausente de suplementação apresentaram menor valor, tanto quando comparados com os peixes alimentados com dietas purificadas suplementadas, como quando comparados com os alimentados com dieta prática ausente de piridoxina.

O índice hematimétrico, VCM, não foi influenciado pela suplementação de piridoxina nas diferentes dietas e momentos. Os animais alimentados com dietas práticas suplementadas apresentaram maior valores de CHCM apenas no momento anterior ao estímulo térmico. Quando alimentados com dietas purificadas houve aumento do CHCM após o estímulo, com exceção dos peixes alimentados com dietas suplementadas com 20 mg de piridoxina/kg.

A Tabela 5 apresenta a quantidade de PPT, ALB, GLOB e relação A:G de tilápias alimentadas com dietas práticas e purificadas suplementadas com vitamina B₆ antes e após o estímulo térmico. A suplementação de piridoxina não influenciou a proteína plasmática total, albumina, globulina e relação A:G dos peixes alimentados com dietas prática e purificada no momento anterior ao estímulo.

Após o estímulo térmico, os valores de PPT e ALB dos peixes alimentados com dieta prática suplementada com 20 mg de piridoxina/kg apresentaram-se menores. A ausência de suplementação na dieta prática causou aumento da PPT nos animais em relação ao momento anterior ao estímulo e aos peixes alimentados com dieta purificada isenta de suplementação. A GLOB e a relação A:G não foram influenciadas nem pela suplementação de vitamina B₆ nem pelo estímulo térmico.

Na Tabela 6 estão apresentadas as medianas da quantidade de leucócitos totais (LEUC), monócitos (MN), neutrófilos (NT) e linfócitos (LF) de tilápias alimentadas com dietas práticas e purificadas e níveis crescentes de piridoxina e submetidas a estímulo térmico. A suplementação de piridoxina não influenciou a quantidade de leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e monócitos. Após o estímulo térmico, peixes

alimentados com dieta prática e suplementada com 5,0 mg de piridoxina/kg apresentaram menor número de neutrófilos e monócitos. De modo geral, após estímulo térmico, peixes alimentados com dietas práticas apresentaram maiores valores de células brancas que peixes alimentados com dietas purificadas.

DISCUSSÃO

Em peixes, o metabolismo e armazenamento de glicogênio são limitados, a maioria da glicose necessária para a produção de energia provém das proteínas (De Silva e Anderson, 1995). A forma metabolicamente ativa da vitamina B₆, piridoxal fosfato (PLP), é essencial para a produção de energia a partir de aminoácidos, porque ativa inúmeras aminotransferases, e também pode ser considerada a vitamina de liberação de energia, pois atua como coenzima da glicogênio fosforilase. Esta enzima catalisa a primeira etapa de degradação de glicogênio, reação na qual o fosfato inorgânico (PLP) é usado na clivagem da ligação glicosídica α -1,4, gerando glicose 1-fosfato (Devlin, 1998).

O desempenho dos animais em ambos os estudos foram afetados pelo nível de vitamina B₆ suplementado na dieta. Os peixes alimentados com a dieta isenta de suplementação de piridoxina apresentaram menor ganho de peso, provavelmente, devido ao comprometimento do metabolismo de aminoácidos e catálise do glicogênio (Combs, 1998). Apesar do ganho de peso dos peixes alimentados com as dietas práticas e purificadas apresentarem comportamento semelhante os peixes alimentados com as dietas purificadas ganharam em média 51,0% menos peso que os alimentados com as dietas purificadas. Isto, provavelmente, ocorreu devido à baixa palatabilidade da ração, que diminuiu significativamente o consumo dos peixes por dietas purificadas (46,0% menor que o consumo das dietas práticas).

A conversão alimentar foi prejudicada em peixes alimentados com dietas purificadas isentas de vitamina B₆. Comportamento semelhante foi observado para a taxa de eficiência protéica, devido à menor deposição de proteína. A suplementação de piridoxina nas dietas (prática e purificada) proporcionou maior retenção de proteína na carcaça. Resultados similares foram observados para tilápia híbrida (Shiau e Hsieh,

1997) quando estudadas as exigências de piridoxina com diferentes concentrações de proteína dietária.

Apesar de não ter sido observado efeito significativo sobre a taxa de eficiência proteica, a suplementação de piridoxina em peixes alimentados com dietas práticas proporcionou melhores valores para estes parâmetros. A porcentagem de sobrevivência dos animais que receberam dietas purificadas foi significativamente afetada pela ausência da vitamina B₆, chegando a 20%. Baixas taxas de sobrevivência têm sido relatadas em peixes alimentados com dietas isentas de suplementação de piridoxina (Andrews e Murai, 1979; Mohamed, 2001; Huang et al., 2006).

A deficiência de vitamina B₆ em animais e humanos conduz a mudanças comportamentais, funções sensoriais como hipoacusia (perda de audição) e hipopselafesia (perda do tato) e outras desordens do sistema nervoso como convulsões e distúrbios motores (Schaeffer, 1987; Baxter, 2003). O desenvolvimento dessas anormalidades é consequência do mau funcionamento do sistema nervoso afetado pela deficiência de vitamina B₆ (Schaeffer, 1987; Groziak e Kirksey, 1990; Wei et al., 1999), que é evidenciado pelo fato de que neurotransmissores como dopamina, noraepinefrina, ácido γ -aminobutírico (GABA), serotonina e taurina serem sintetizados por enzimas dependentes de piridoxal fosfato (Guilarte, 1989; Dakshinamurti, 1990).

Na presente pesquisa, os animais arraçoados com dietas purificadas e ausentes de suplementação de piridoxina, após a segunda semana do início do período experimental, apresentaram sinais clínicos de deficiência tais como apatia, natação errática e hipersensibilidade. Tais sinais também foram observados por Huang et al. (2006) em *Epinephelus coioides* deficientes em vitamina B₆. Apesar das análises não acusarem a presença de piridoxina nas dietas práticas não suplementadas, o mesmo não ocorreu em animais arraçoados com estas dietas. Na literatura valores para maior desempenho produtivo e manutenção dos parâmetros hematológicos foram descritos para carpa comum, 5,4 mg/ kg (Ogino, 1965); red seabream (5,0 a 6,0 mg/ kg) (Takeda e Yone, 1971); turbot (1,0 a 2,5 mg/ kg) (Adron et al., 1978); bagre do canal (3,0 mg/ kg) (Andrews e Murai, 1979), gilthead seabream (1,97 mg/ kg) (Kissil et al., 1981) e bagre indiano (3,21 mg/ kg) (Mohamed, 2001).

Além dos sinais clínicos de deficiência de vitamina B₆ observados, alta taxa de infecção por organismos patogênicos foram notados nos animais na avaliação *post*

mortem. Esses efeitos podem ser relacionados às atividades diminuídas de várias enzimas dependentes de piridoxal fosfato, tais como serina transhidroximetilase e timidilato sintetase, diminuindo o metabolismo do carbono-1 e a síntese de DNA, que atua na diferenciação de células do sistema imune (Combs, 1998; Devlin, 1998).

Uma hipótese para a diferença na porcentagem de sobrevivência e detecção de sinais clínicos de deficiência entre os animais alimentados com a dieta prática e purificada ausente de suplementação de vitamina B₆ seria que, ainda que os sinais clínicos observados nos animais alimentados com a dieta ausente de suplementação de vitamina B₆ sejam correlatos a esta deficiência, é necessário ressaltar que, o consumo de ração por esses animais foi 46,0% menor se comparado com os animais que receberam a ração prática não suplementada com piridoxina. Isto demonstra que o baixo consumo de ração pode ter determinado não só a deficiência de vitamina B₆, porém dos demais nutrientes necessários para o crescimento e saúde dos peixes, o que culminou na baixa porcentagem de sobrevivência e possível infecção por agentes patógenos. O maior período de arraçoamento (15 dias) com a dieta prática ausente de suplementação de piridoxina invalida a hipótese de maior reserva desta vitamina para os peixes que receberam esta ração. Outra possível explicação para esta diferença seria a provável síntese desta vitamina pelas bactérias do trato digestório, porém a literatura descreve esta ação somente para animais que desenvolvem coprofagia (Combs, 1998), o que também invalida esta hipótese.

O estudo dos componentes do sangue e suas funções tem sido importante ferramenta para o conhecimento das condições de equilíbrio orgânico normal e patológico. Por meio da hematologia é possível determinar a influência de condições nutricionais e ambientais, que possam alterar a higidez dos peixes, colaborando no diagnóstico de condições adversas (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004) e na compreensão da relação entre as características sanguíneas e a saúde dos peixes e sua associação com o ambiente (Tavares-Dias et al., 1999).

As características hematológicas dos peixes hípidos apresentam ampla variação em função de fatores internos e externos. Desta forma, para se utilizar estes parâmetros como instrumento de diagnóstico de possíveis patologias é preciso, inicialmente, conhecer os valores normais, considerando-se a amplitude de variação fisiológica destes e as características de cada espécie em cada local (Ranzani-Paiva e Silva-Souza, 2004).

Nesta pesquisa, a suplementação com piridoxina, em dietas purificadas, manteve o eritrograma dos peixes dentro dos parâmetros normais, definido por Feldman et al. (2000) para a espécie: $1,91-2,83 \times 10^6/\mu\text{L}$, 27-37 % e 7,0-9,8 g/dL para número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito e taxa de hemoglobina, respectivamente. Em pesquisas realizadas, sob mesmas condições laboratoriais e com a mesma espécie, definiram a faixa de valores normais entre $1,82-1,98 \times 10^6/\mu\text{L}$, 26-29 % e 6,9-8,5 g/dL para número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito e taxa de hemoglobina, respectivamente (Barros et al., 2009).

Os peixes alimentados com dietas purificadas e não suplementadas com piridoxina apresentaram valores hematológicos abaixo do considerado normal para a tilápia sadia, caracterizando anemia normocítica hipocrômica. Esses resultados corroboram com os obtidos para garoupa (Mohamed et al., 2001; Huang et al., 2006), podendo-se admitir que a manutenção das funções hematopoiéticas normais exige níveis adequados dos nutrientes e micronutrientes, como a vitamina B₆, que é necessária para produção normal de células vermelhas (Feldman et al., 2000).

Patos, suínos e cães alimentados com dietas não suplementadas com vitamina B₆ apresentaram anemia (Scott et al., 1976). Em peixes, a marcada redução no número de eritrócitos foi observada em salmão Chinook (Halver, 1957), salmão coho (Smith, 1967), truta arco-íris (Smith et al., 1974) e *Heteropneustes fossilis* (Mohamed, 2001) alimentados com dietas isentas de piridoxina. Valores abaixo do considerado normal para a porcentagem de hematócrito também foram observados em tilápia vermelha híbrida (Lim et al., 1995) quando alimentada com dietas não suplementadas.

A enzima ALA sintetase, que é dependente de piridoxal fosfato, controla a velocidade da síntese do heme em todos os tecidos. A modulação da atividade da ALA sintetase determina a quantidade dos substratos que serão desviados para a biossíntese do heme (Devlin, 1998). Desta forma, a ausência de suplementação de vitamina B₆ na dieta purificada prejudicou a síntese de hemoglobina nos peixes, pela ativação insuficiente da enzima e, por consequência, queda na síntese do heme e diminuição significativa do número de eritrócitos sintetizados.

Em dietas purificadas as necessidades nutricionais dos animais são atendidas por meio de ingredientes de grau analítico puros. Desta forma é possível minimizar fatores da dieta que interferem na hipótese (Guimarães, 2009), o que não acontece quando são

utilizadas dietas formuladas com ingredientes integrais como farelos e grãos, que são ricos em vitamina B₆ (Lebiedzińska e Szefer, 2006), entretanto quando passam por processo de extrusão, os níveis podem diminuir consideravelmente (Lassen et al., 2002; Martin-Belloso e Lianos-Barriobero, 2001).

As análises de HPLC feitas na dieta prática ausente de suplementação de vitamina B₆, não detectaram a presença da vitamina e, apesar disto, o perfil hematológico dos peixes alimentados com essa dieta apresentou-se dentro da faixa de normalidade para a espécie. Uma hipótese para esta resposta seria que o tempo de 91 dias não foi suficiente para determinar anemia pela ausência de piridoxina. A diferença de perfil hematológico entre os peixes alimentados com a dieta purificada e prática ausente de suplementação de B₆ pode ser explicada pelo baixo consumo da ração purificada, o qual foi em média 46,0% inferior e, por consequência, refletiu na capacidade de manutenção do perfil hematológico.

Comparando-se o perfil hematológico antes e após o estímulo térmico, notou-se que, apesar da suplementação de piridoxina não o ter influenciado, ocorreu aumento da eritropoiese em 3,87% (prática) e 8,84% (purificada) em peixes alimentados com dietas não suplementadas, possivelmente na tentativa de compensar fisiologicamente o estresse sofrido devido à menor disponibilidade de oxigênio dissolvido na água (Val et al., 2004), em decorrência da alta temperatura (32°C), e na tentativa de retorno à homeostase.

A alta temperatura imposta aos peixes alimentados com as rações práticas e purificadas não determinou a liberação de células imaturas (VCM), demonstrando que os peixes, mesmo sob condições adversas, continuaram a liberar células de tamanho considerado normal para a tilápia segundo Feldman et al.(2000). A concentração de hemoglobina corpuscular média reflete as respostas da taxa de hemoglobina e porcentagem de hematócrito e, portanto, seguem a tendência destes e podem ser considerados constantes. Vale ressaltar que os valores apresentados pelos peixes são considerados normais para a espécie (Feldman et al., op. cit.).

Nesta pesquisa a série branca, apesar de não ter sido influenciada pelos tratamentos, diminuiu discretamente nos peixes alimentados com dietas ausentes de suplementação após o estímulo térmico. O número de leucócitos dos peixes alimentados

com dietas purificadas foi em média 56% menor do que os animais alimentados com dietas práticas, provavelmente causado pelo menor consumo de ração destes animais.

A imunidade inata é mais pronunciada em peixes, essa primeira linha de defesa é composta por neutrófilos e macrófagos (Tizard, 2002). Diminuição significativa no número de neutrófilos foi observada após o estímulo térmico em peixes alimentados com dieta isenta de suplementação de piridoxina. Porém, peixes alimentados com dieta prática não suplementada apresentaram discreto aumento deste parâmetro, provavelmente por estes animais se encontrarem em condição fisiológica melhor do que os alimentados com dietas purificadas. Isto demonstra que o baixo consumo de ração pode ter determinado não só a deficiência de vitamina B₆, mas também a baixa porcentagem de sobrevivência e possível infecção por agentes patógenos.

As moléculas de anticorpos (imunoglobulinas) são glicoproteínas com quatro cadeias polipeptídicas, sendo dois tipos de cadeias diferentes, com duas cópias idênticas de cada. No tipo mais comum de imunoglobulina, IgG, as cadeias H têm aproximadamente 440 aminoácidos, e as cadeias menores apresentam cerca de 220 aminoácidos (Devlin, 1998). Alguns dos aminoácidos que compõem essas cadeias têm como cofator enzimático o piridoxal fosfato, tais como: cisteína, serina, treonina e metionina (transmetilação), suprimindo, desta forma o sistema imune específico de animais deficientes em vitamina B₆ (Combs, 1998). A variação de temperatura da água é considerada um dos principais fatores estressores aos peixes. Como consequência, pode-se relatar ainda o aumento da suscetibilidade a patógenos oportunistas (Falcon, 2007).

O comprometimento da resistência orgânica em peixes sob condições de estresse tem sido também avaliado por meio da concentração de proteína plasmática. A proteína plasmática total refere-se à fração albumina e globulina presente no plasma ou soro sanguíneo. Estas duas classes de proteínas do soro são produzidas no fígado, sendo a primeira, a fração mais abundante e responsável pelo transporte de nutrientes e manutenção do equilíbrio osmótico do sangue, enquanto a fração globulina está envolvida nos mecanismos de defesa do animal. Em monogástricos, a restrição dietética de proteína pode causar hipoproteinemia e hipoalbumineia, mas as concentrações de globulina normalmente não sofrem alterações (Thomas, 2000). Alterações significativas nos valores de PPT e ALB após o desafio térmico podem refletir possível condição de

estresse dos animais. Isto possivelmente seria confirmado, por alterações significativas no leucograma dos peixes, se o período sob condições de alta temperatura fosse maior que três dias. Esta hipótese está embasada na tendência demonstrada pelos valores do leucograma após o desafio.

Conclui-se que a exigência de vitamina B₆ para o crescimento normal e higidez da tilápia do Nilo é de 5,0 mg de piridoxina /kg de dieta prática.

REFERENCES

- Adron, J.W., D. Knox, and C.B. Cowey. 1978. Studies on the nutrition of marine flatfish: the pyridoxine requirement of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Brazilian Journal of Nutrition* 40:261-268.
- Andrews, J.W., and T. MURAI. 1979. Pyridoxine requirements os channel catfish. *Journal of Nutrition* 109:533-537.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis (16th ed.). Arlington: Association of Official Analytical Chemists.
- Barros, M.M., L.E. Pezzato, D.R. Falcon, and I.G. Guimarães. 2006. Nutrição e saúde de peixes. Palestra Técnica do Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal p.1-15.
- Barros, M.M.; M.J.T. Ranzani-Paiva, L.E. Pezzato, D.R. Falcon, and I.G. Guimarães. 2009. Hematological response and growth performance of nile tilapia fed diets containing folic acid. *Aquaculture Research* 40:895-903.
- Baxter, P. 2003. Pyridoxine-dependent seizures: a clinical and biochemical conundrum. *Biochimical et Biophysica. Acta* 1647:36-41.
- Boyd, C.E. 1996. Water Quality in Ponds for Aquaculture. Songkhala: Shrimp Mart.
- Combs, G.F. 1998. The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. New York: Academic Press.
- Dakshinamurti, K. 1990. Vitamin B₆. *Annalsof the New York Academy of Sciences*, 585:1-570.
- De Silva, S.S., and T.A. Anderson. 1995. Fish Nutrition in Aquaculture. London: Chapman & Hall. Aquaculture Series, 1.

Devlin, T.M. 1998. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. São Paulo: Edgard Blücher.

Falcon, D.R. 2007. β -glucano e Vitamina C no Desempenho Produtivo e Parâmetros Fisiopatológicos em Juvenil de Tilápia do Nilo: nível de suplementação e tempo de administração. Jaboticabal, SP: CAUNESP, 58p. (Doutor em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Feldman, B.F.; J.G. Zinkl, N.C. Jain. 2000. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Furuya, W.M.; L.E. Pezzato; A.C. Pezzato; M.M. Barros; E.C. Miranda. 2001 Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* 30(4):1125-1131.

Groziak, S.M., and A. Kirksey. 1990. Effects of maternal restriction in vitamin B₆ on neocortex development in rats: neuron differentiation and synaptogenesis. *Journal of Nutrition* 120:485-492.

Guilarte, T.R. 1989. Effect of vitamin B₆ nutrition on the levels of dopamine, dopamine metabolites, dopa decarboxylase activity, tyrosine, and GABA in developing rat corpus striatum. *Neurochemistry Research* 14:571-578.

Guimarães, I.G. ; L.E. Pezzato, and M.M. Barros. 2008. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition* 14:396-404.

Guimarães, I.G. 2009. Vitamina A em Dietas para Tilápia do Nilo. Botucatu, SP: FMVZ, p. 92 (Doutor em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Halver, J.E. 1957. Nutrition of salmonoids fishes III: water-soluble vitamin requirements of Chinook salmon. *Journal of Nutrition* 62(2):225-243.

Huang, J.W., Z.Y. Tian, H.J. Yang, and Y.J. Liu. 2006. Pyridoxine deficiency of grouper, *Epinephelus coioides*: physiological and biochemical alteration. *Fish Physiology and Biochemistry* 31:331-337.

Jain, N.C. 1986. Schalm's Veterinary Haematology. 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiger.

- Johnson, R.A., and D.W. Wichern. 2002. *Applied Multivariate Statistical Analyses*. 5th ed. New Jersey: Prentice-Hall.
- Kaneko, J.J.; J.W. Harvey, and M.L. Bruss. 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic animals*. San Diego: Academic.
- Kissil, G.W., C.B. Cowey, J.W. Adron, and R.H. Richards. 1981. Pyridoxine requirements of the gilthead bream. *Spatrus aurata*. *Aquaculture* 23:243-255.
- Lassen, A.; M. Kall, and L. Ovesen. 2002. A comparison of the retention of vitamins B₁, B₂ and B₆, and cooking yield in pork loin with conventional and enhanced meal-service systems. *European Food Research and Technology* 215:194-199.
- Lebiedzińska, A., and P. Szefer. 2006. Vitamins B in grain and cereal-grain food, soy-products and seeds. *Food Chemistry* 95:116-122.
- Lim, C., B.R. Leamaster, and J.A. Brock. 1995. Pyridoxine requeriment of ingerling red hybrid tilapia grown in seawater. *Journal of Applied Aquaculture*. 5:49-60.
- Martin-Bellos, O., and E. Lianos-Barriobero, E. 2001. Proximate composition, minerals and vitamins in selected canned vegetables. *European Food Research and Technology* 212:82-187.
- Mohamed, J.S. 2001. Dietary pyridoxine requirement of the Indian catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Aquaculture* 194:327-335.
- Ogino, C. B. 1965. Vitamin requirements of carp, *Cyprinus carpio*: 1: deficiency symptoms and requirements of vitamin B₆. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 31:46-551.
- Pezzato, L.E.; E.C. Miranda; M.M. Barros; L.G.Q. Pinto; W.M. Furuya; A.C. Pezzato. 2002. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* 31(4):1595-1604.
- Ranzani-Paiva, M.J., and A.T. Silva-Souza. 2004. Hematologia de Peixes Brasileiros. Pages 89-120 in M.J. Ranzani-Paiva, R.M. Takemoto, and M.A.P Lizama, ed. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Varela.
- Rosenfeld, G. 1947. Corante pancrômico para a hematologia e citologia clínica: nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan* 20:329-334.

- Scott, M.L., M.C. Nesheim, and T.T. Young. 1976. The Vitamin. *in* Nutrition of the Chicken. 2nd ed. M.L. New York: Scott.
- Shaeffer, M.C. 1987. Attenuation os acoustic and tactile startle responses of vitamin B₆ deficient rats. *Physiology Behavior* 40:473-478.
- Shiau, S.Y., H.L. Hsieh. 1997. Vitamin B₆ requirements of tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus* fed two dietary protein concentrations. *Fisheries Science* 63(6):1002-1007.
- Smith, C.E. 1967. Progress in sport fishery research. Washington, DC: U.S. Fish Wildl. Serv. Bur. Sport Fish. Wildl. Report 54.
- Smith, C.E.; M. Brin, and J.E. Halver. 1974. Biochemical, physiological and pathological changes in pyridoxine-deficient rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal Fisheries Research Board Canadian* 31:1893-1898.
- Takeda, T., and Y. Yone. 1971. Studies of nutrition of red seabream. 2. Comparison of vitamin B₆ requirement level between fish fed a synthetic diet and fish fed beef liver during prefeeding period. *Rep. Fish. Res. Lab.* 1:37-47.
- Tavares-Dias, M.; R.A. Teneni, L.D. Gioli, and C.D. Faustino. 1999. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II: parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotâmicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. *Revista Brasileira de Zoologia* 16(2):423-431.
- Thomas, J.S. 2000. Overview of plasma proteins. *in* Feldman, B.F. et al. Schalm's Veterinary Hematology. Philadelphia: Lippincott.
- Tizard, I.R. 2002. Imunologia Veterinária: uma introdução. 6. ed. São Paulo: Roca.
- Val, A.L., M.N.P. Silva, and V.M.F. Almeida-Val. 2004. Estresse em Peixes: ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. São Paulo: Varela.
- Wei, I.L., Y.H. Huang, and G.S. Wang. 1999. Vitamin B₆ deficiency decreases the glucose utilization in cognitive brain structures of rats. *Journal of Nutrition and Biochemistry* 10:525-531.
- Wintrobe, M.M. 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica Leipzig* 51:32-49
- Zar, J. H. 1999. Biostatistical Analysis. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall.

Tabela 1. Composição químico-bromatológica e o percentual dos ingredientes das dietas experimentais práticas

Ingrediente (%)	0,0	5,0	10,0	20,0
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Farelo soja	62,20	62,20	62,20	62,20
Fubá milho	4,00	4,00	4,00	4,00
Quirera de arroz	24,00	23,995	23,99	23,98
Óleo de peixe	1,00	1,00	1,00	1,00
Óleo de soja	1,00	1,00	1,00	1,00
Celulose	0,70	0,70	0,70	0,70
Dl-metionina	0,45	0,45	0,45	0,45
Treonina	0,25	0,25	0,25	0,25
Fosfato bicálcico	5,99	5,99	5,99	5,99
Vitamina B ₆ (96%)	0,00	0,0048	0,0096	0,0192
Vitamina C (35,0%)	0,04	0,04	0,04	0,04
Sal comum	0,10	0,10	0,10	0,10
Suplemento vitamínico ^a	0,15	0,15	0,15	0,15
Suplemento mineral ^b	0,10	0,10	0,10	0,10
BHT ^c	0,02	0,02	0,02	0,02
Composição proximal ^d				
Energia Bruta (kcal/kg)	4414	4485	4525	4598
Proteína Bruta (%)	37,33	37,32	38,16	37,88
Umidade (%)	7,00	7,30	8,00	7,90
Extrato etéreo (%)	1,09	1,30	1,20	1,21
Cinzas (%)	10,22	10,43	10,15	10,34
Piridoxina (analisado)	nd	5,0	11,0	22,0
(mg/kg da dieta)				

^a Suplemento vitamínico, níveis de garantia por kg da dieta: vitamina A, 16060 UI; vitamina D3, 4510 UI; vitamina E, 250 UI; vitamina K, 30 mg; vitamina B1, 32 mg; vitamina B2, 32 mg; pantotenato de cálcio, 80 mg; niacina, 170 mg; biotina, 10 mg; ácido fólico, 10 mg; vitamina B12, 32 µg. ^b Suplemento mineral, níveis de garantia por kg da dieta: Na₂SeO₃, 0,7 mg; MnO, 50mg; ZnO, 150 mg; FeSO₄, 150 mg; CuSO₄, 20 mg; CoSO₄, 0,5 mg; I₂Ca, 1 mg. ^c antioxidante Butil hidroxitolueno. ^d analisado.

Tabela 2. Composição químico-bromatológica e o percentual dos ingredientes das dietas experimentais purificadas

Ingrediente (%)	0,0	5,0	10,0	20,0
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Albumina	30,00	30,00	30,00	30,00
Gelatina	6,75	6,75	6,75	6,75
Amido de milho	47,18	47,175	47,17	47,16
Óleo de peixe	3,00	3,00	3,00	3,00
Celulose	6,00	6,00	6,00	6,00
Sal mineral	0,10	0,10	0,10	0,10
Vitamina C (35%)	0,05	0,05	0,05	0,05
Fosfato bicálcico	6,65	6,65	6,65	6,65
Vitamina B ₆ (96%)	0,00	0,0048	0,0096	0,0192
Suplemento vitamínico ^a	0,15	0,15	0,15	0,15
Suplemento mineral ^b	0,10	0,10	0,10	0,10
BHT ^c	0,02	0,02	0,02	0,02
Composição proximal ^d				
Energia Bruta (kcal/kg)	4480	4581	4463	4452
Proteína Bruta (%)	35,19	36,29	35,82	36,25
Umidade (%)	6,10	5,90	5,70	6,00
Extrato etéreo (%)	1,95	1,75	2,09	2,29
Cinzas (%)	7,64	5,57	7,92	8,01
Piridoxina (analisado) (mg/kg da dieta)	nd	15,0	37,0	82,0

^a Suplemento vitamínico, níveis de garantia por kg da dieta: vitamina A, 16060 UI; vitamina D3, 4510 UI; vitamina E, 250 UI; vitamina K, 30 mg; vitamina B1, 32 mg; vitamina B2, 32 mg; pantotenato de cálcio, 80 mg; niacina, 170 mg; biotina, 10 mg; ácido fólico, 10 mg; vitamina B12, 32 µg. ^b Suplemento mineral, níveis de garantia por kg da dieta: Na2SeO3, 0,7 mg; MnO, 50mg; ZnO, 150 mg; FeSO4, 150 mg; CuSO4, 20 mg; CoSO4, 0,5 mg; I2Ca, 1 mg. ^c antioxidante Butil hidroxitolueno. ^d analisado.

Tabela 3. Média e desvio padrão de ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE), taxa de eficiência protéica (TEP), taxa de retenção protéica (TRP) e sobrevivência (SOB) de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas práticas e purificadas suplementadas com níveis crescentes de vitamina B₆.

<i>Vitamina B₆¹</i> (mg) <i>Prática</i>	GP (g)	CR (g)	CAA	TEP (%)	TRP (%)	SOB (%)
0,0	101,81 ± 7,18 aB	156,66 ± 2,62 aB	1,56 ± 0,27 aA	2,35 ± 0,32 aA	38,75 ± 1,32 aB	85,41 ± 28,77 aB
5,0	132,27 ± 23,16 abB	166,49 ± 7,21 aB	1,31 ± 0,33 aA	2,86 ± 0,56 aB	45,88 ± 1,65 bB	95,84 ± 11,77 aA
10,0	135,51 ± 31,60 bB	163,78 ± 4,50 aB	1,34 ± 0,64 aA	2,99 ± 0,77 aB	51,02 ± 1,68 cB	87,50 ± 29,20 aA
20,0	119,85 ± 27,49 abB	150,19 ± 9,09 aB	1,32 ± 0,31 aA	2,84 ± 0,62 aB	49,79 ± 1,19 cB	97,90 ± 5,90 aA

<i>Vitamina B₆¹</i> (mg) <i>Purificada</i>	GP	CR	CAA	TEP	TRP	SOB
0,0	49,68 ± 5,26 aA	87,06 ± 0,89 aA	1,95 ± 0,31 bB	2,04 ± 0,27 aA	27,79 ± 0,78 aA	28,57 ± 10,69 aA
5,0	62,54 ± 9,40 bA	86,99 ± 0,83 aA	1,41 ± 0,11 aA	2,56 ± 0,21 bA	37,64 ± 1,95 bA	82,86 ± 29,28 bA
10,0	62,07 ± 10,43 bA	83,37 ± 2,79 aA	1,38 ± 0,21 aA	2,64 ± 0,37 bA	39,98 ± 1,63 bA	94,29 ± 9,76 bA
20,0	65,74 ± 8,55 bA	87,25 ± 1,08 aA	1,34 ± 0,17 aA	2,69 ± 0,34 bA	43,94 ± 1,31 cA	97,14 ± 18,00 bA

¹Níveis de suplementação de vitamina B₆ em mg kg⁻¹ de dieta.
Letras minúsculas comparam os diferentes níveis de piridoxina.
Letras maiúsculas comparam as diferentes dietas dentro dos níveis de piridoxina.

Tabela 4. 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 juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas práticas e purificadas e suplementadas com níveis crescentes de vitamina B₆ e submetidos a estímulo térmico.

Vitamina B ₆ ¹ Prática	Erit (10 ⁶ /μL)		Htc (%)		Hb (dL)		VCM (fL)		CHCM (%)	
	Fase I ²	Fase II ³	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
0,0	2,23 ± 0,26 aAα	2,32 ± 0,27 aAα	30,00 ± 4,67 aAα	31,93 ± 2,47 abAα	6,76 ± 1,25 aAα	7,49 ± 0,66 aAα	134,45 ± 18,20 aAα	138,56 ± 11,00 aAα	22,28 ± 1,98 aAα	23,47 ± 1,06 aAα
5,0	2,30 ± 0,38 aAα	2,18 ± 0,40 aAα	31,31 ± 3,54 aAα	32,38 ± 3,55 abAα	7,04 ± 0,67 aAα	7,48 ± 0,74 aAα	138,15 ± 15,27 aAα	152,02 ± 29,20 aAα	22,57 ± 1,83 abAα	23,19 ± 1,50 aAα
10,0	2,16 ± 0,22 aAα	2,23 ± 0,33 aAα	30,86 ± 3,08 aAα	34,36 ± 6,35 bAα	7,52 ± 0,87 aAα	7,74 ± 1,11 aAα	143,54 ± 11,11 aAα	156,02 ± 32,58 aAα	24,37 ± 1,41 bAα	22,70 ± 2,14 aAα
20,0	2,18 ± 0,35 aAα	2,02 ± 0,36 aAα	30,00 ± 3,15 aAα	29,75 ± 6,16 aAα	7,15 ± 0,64 aAα	6,94 ± 1,79 aAα	139,03 ± 9,85 aAα	149,51 ± 29,83 aAα	23,91 ± 1,40 abAα	23,12 ± 1,85 aAα
Vitamina B ₆ ¹ Purificada										
0,0	1,65 ± 0,16 aAβ	1,81 ± 0,40 aAβ	23,90 ± 2,88 aAβ	25,40 ± 3,36 aAβ	5,42 ± 0,70 aAβ	5,88 ± 0,49 aAβ	144,62 ± 15,88 aAα	143,44 ± 20,94 aAα	22,70 ± 0,96 aAα	23,33 ± 1,81 abAα
5,0	2,24 ± 0,32 bAα	2,36 ± 0,41 aAα	30,13 ± 4,03 bAα	32,56 ± 5,75 bAα	7,05 ± 1,03 bAα	7,24 ± 0,95 bAα	135,48 ± 16,90 aAα	139,58 ± 20,72 aAα	23,39 ± 1,02 aAα	22,50 ± 2,38 aAα
10,0	1,86 ± 0,39 abAα	2,26 ± 0,20 aAα	26,07 ± 4,22 abAβ	31,00 ± 2,99 abAα	6,00 ± 0,94 abAβ	7,04 ± 0,58 abAβ	142,04 ± 18,34 aAα	137,43 ± 7,23 aAα	23,02 ± 1,00 aAα	22,78 ± 1,32 abAα
20,0	2,00 ± 0,24 abAα	2,22 ± 0,28 aAα	28,33 ± 2,07 abAα	27,92 ± 3,12 abAα	6,83 ± 0,67 abAα	6,84 ± 1,00 abAα	142,26 ± 8,95 aAα	126,65 ± 12,96 aAβ	24,13 ± 2,03 aAα	24,49 ± 2,01 bAα

¹ Níveis de suplementação de vitamina B₆ em mg kg⁻¹ de dieta.

² Fase I: antes do estímulo térmico.

³ Fase II: após o estímulo térmico.

Letras minúsculas: comparação de níveis de vitamina B₆ fixado o momento.

Letras maiúsculas: comparação de momento dentro de tratamento.

Letras gregas: comparação das diferentes dietas dentro dos níveis de piridoxina.

Tabela 5. Média e desvio padrão de proteína plasmática total (PPT), albumina (ALB), globulina (GLOB) e relação albumina/globulina (ALB:GLOB) de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas práticas e purificadas e suplementadas com níveis crescentes de vitamina B₆ e submetidos a estímulo térmico.

	PPT (mg/dL)		ALB (mg/dL)		GLOB (mg/dL)		ALB:GLOB	
	Fase I ²	Fase II ³	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
<i>Vitamina B₆¹ Prática</i>								
0,0	2,93 ± 0,49 aAα	3,50 ± 0,46 bBα	0,95 ± 0,27 aAα	1,06 ± 0,17abAα	1,98 ± 0,46 aAα	2,44 ± 0,44 aAα	0,51 ± 0,21 aAα	0,45 ± 0,11 aAα
5,0	2,89 ± 0,35 aAα	3,34 ± 0,40 abAα	0,95 ± 0,13 aAα	1,04 ± 0,26 abAα	1,94 ± 0,37 aAα	2,31 ± 0,51 aAα	0,51 ± 0,11 aAα	0,49 ± 0,25 aAα
10,0	2,96 ± 0,68 aAα	3,43 ± 0,45 abAα	0,99 ± 0,13 aAα	1,25 ± 0,47 bAα	1,97 ± 0,60 aAα	2,18 ± 0,55 aAα	0,55 ± 0,21 aAα	0,67 ± 0,52 aAα
20,0	2,71 ± 0,45 aAα	2,96 ± 0,59 aAα	0,99 ± 0,20 aAα	0,85 ± 0,21 aAα	1,72 ± 0,41 aAα	2,11 ± 0,66 aAα	0,61 ± 0,22 aAα	0,46 ± 0,26 aAα
<i>Vitamina B₆¹ Purificada</i>								
0,0	2,75 ± 0,86 aAα	2,98 ± 0,25 aAβ	0,81 ± 0,12 aAα	0,85 ± 0,09 aAα	2,22 ± 0,57 aAα	2,03 ± 0,33 aAα	0,38 ± 0,11 aAα	0,43 ± 0,11 aAα
5,0	3,25 ± 0,32 aAα	3,46 ± 0,51 aAα	0,75 ± 0,13 aAα	0,83 ± 0,09 aAα	2,51 ± 0,33 aAβ	2,63 ± 0,51 aAα	0,30 ± 0,07 aAα	0,33 ± 0,08 aAα
10,0	2,95 ± 0,41 aAα	3,29 ± 0,32 aAα	0,74 ± 0,14 aAα	0,83 ± 0,11 aAβ	2,21 ± 0,37 aAα	2,46 ± 0,31 aAα	0,34 ± 0,08 aAβ	0,34 ± 0,07 aAα
20,0	3,12 ± 0,40 aAα	3,36 ± 0,10 aAα	0,83 ± 0,11 aAα	0,85 ± 0,06 aAα	2,32 ± 0,38 aAβ	2,51 ± 0,09 aAα	0,37 ± 0,08 aAα	0,34 ± 0,03 aAβ

¹ Níveis de suplementação de vitamina B₆ em mg kg⁻¹ de dieta.
² Fase I: antes do estímulo térmico.
³ Fase II: após o estímulo térmico.
Letras minúsculas: comparação de níveis de vitamina B₆ fixado o momento.
Letras maiúsculas: comparação de momento dentro de tratamento.
Letras gregas: comparação das diferentes dietas dentro dos níveis de piridoxina.

Tabela 6. Mediana e valores mínimo e máximo de número absoluto leucócitos (LEUC), linfócitos (LF), neutrófilos (NT) e monócitos (MN) de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas práticas suplementadas com níveis crescentes de vitamina B₆ e submetidos a estímulo pelo calor.

LEUC (10 ⁴ céls/µL)			LF (10 ⁴ céls/µL)		NT (10 ⁴ céls/µL)		MN (10 ⁴ céls/µL)	
Vitamina B ₆ ¹ Prática	Fase I ²	Fase II ³	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
0,0	24,15 aAα (15,00 – 27,50)	21,85 aAα (16,50 – 30,60)	21,47 aAα (13,36 – 24,75)	18,15aAα (13,69 – 28,92)	1,75 aAα (0,90 – 3,66)	1,67 aAα (0,60 – 3,92)	0,82 aAα (0,24 – 2,22)	0,66 aAα (0,46 – 1,57)
5,0	22,60 aAα (15,30 – 28,40)	23,45 aAα (13,80 – 29,50)	17,87 aAα (12,39 – 24,75)	21,53 aAα (12,28 – 28,18)	2,14 aBα (1,21 – 4,19)	1,23 aAα (0,44 – 3,83)	1,14 aBα (0,12 – 1,86)	0,68 aAα (0,22 – 0,88)
10,0	19,98 aAα (13,10 – 22,80)	21,50 aAα (15,60 – 25,90)	18,54 aAα (12,12 – 21,09)	20,25 aAα (11,54 – 20,98)	1,18 aAα (0,39 – 2,65)	0,84 aAα (0,65 – 3,88)	0,59 aAα (0,26 – 1,57)	0,65 aAα (0,11 – 1,43)
20,0	18,40 aAα (12,90 – 29,10)	22,55 aAα (16,60 – 27,40)	15,14 aAα (10,97 – 24,34)	19,38 aAα (15,60 – 24,66)	2,72 aBα (1,04 – 5,53)	1,23 aAα (0,58 – 2,70)	0,57 aAα (0,09 – 2,91)	0,79 aAα (0,19 – 1,76)
Vitamina B ₆ ¹ Purificada								
0,0	12,35 aAα (8,80 – 19,00)	12,10 aAα (6,45 – 18,10)	11,42 aAβ (7,66 – 18,53)	11,68 aAβ (5,45 – 17,38)	0,88 aAα (0,19 – 1,80)	0,61 aAα (0,29 – 1,24)	0,31 aAα (0,26 – 0,45)	0,19 aAβ (0,09 – 0,39)
5,0	11,23 aAβ (5,15 – 21,30)	11,78 aAβ (7,70 – 18,60)	10,66 aAα (4,84 – 20,87)	11,30 aAβ (7,05 – 17,58)	0,36 aAβ (0,21 – 0,68)	0,40 aAα (0,27 – 0,65)	0,21 aAβ (0,10 – 0,43)	0,30 aAα (0,15 – 0,37)
10,0	13,95 aAα (8,25 – 21,05)	15,95 aAβ (8,55 – 19,00)	12,76 aAα (7,55 – 19,87)	13,80 aAα (7,74 – 18,24)	0,55 aAα (0,29 – 0,87)	0,59 aAα (0,17 – 1,28)	0,31 aAα (0,05 – 0,84)	0,69 aAα (0,09 – 1,11)
20,0	10,83 aAβ (7,90 – 16,00)	12,93 aAβ (6,15 – 18,10)	10,17 aAα (7,23 – 15,52)	11,83 aAβ (5,69 – 16,92)	0,42 aAβ (0,16 – 0,87)	0,72 aAα (0,18 – 0,81)	0,24 aAα (0,08 – 0,45)	0,36 aAα (0,22 – 0,57)

¹ Níveis de suplementação de vitamina B₆ em mg kg⁻¹ de dieta.

² Fase I: antes do estímulo térmico.

³ Fase II: após o estímulo térmico.

Letras minúsculas: comparação de níveis de vitamina B₆ fixado o momento.

Letras maiúsculas: comparação de momento dentro do tratamento.

Letras gregas: comparação das diferentes dietas dentro dos níveis de piridoxina.

IMPLICAÇÕES

➤ A piridoxina desempenha função importante no metabolismo de proteínas e na eritropoiese de peixes. Portanto, as rações devem atender as recomendações mínimas dessa vitamina para a manutenção da higidez e desenvolvimento da tilápia do Nilo;

➤ O processo de cozimento à alta pressão, umidade e temperatura pode causar degradação das vitaminas em suplementos e ingredientes, este processo frequentemente é utilizado por indústrias em rações comerciais para peixes. A maioria das pesquisas com vitamina B₆ para peixes são desenvolvidas utilizando-se rações purificadas. Nesta pesquisa, utilizou-se tanto rações purificadas como práticas, sendo que o uso de rações práticas aproximou-se da realidade das indústrias, possibilitando considerar a estabilidade da fonte de vitamina após o seu processamento, de forma que estivesse presente no produto final;

➤ Em toda a produção a relação custo/benefício do produto a ser utilizado deve ser considerada. No processo industrial de criação de peixes, a ração representa parte considerável do custo total de produção, e apesar de serem utilizadas em pequenas quantidades, as vitaminas são nutrientes onerosos. Portanto, as rações devem ser formuladas de acordo com a fase de vida do animal, melhorando desta forma, os índices zootécnicos e determinando o sucesso econômico da produção. Esta adequação representa valores maiores destes nutrientes, como a piridoxina, na fase larval, com posterior diminuição da exigência com o crescimento dos peixes.

➤ A ausência de sinais clínicos e anemia em peixes alimentados com dieta prática isenta de suplementação de piridoxina, provavelmente, deve-se ao período experimental (91 dias), levando-se em consideração a alta variabilidade da meia vida dos eritrócitos de peixes (50 a 150 dias). Possivelmente, estudos com períodos experimentais mais longos possam evidenciar sinais clínicos e anemia em animais alimentados com dietas práticas não suplementadas com vitamina B₆.