

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

**Suplementação dietária de cobre no desempenho
produtivo da tilápia-do-Nilo e resposta hemática sob
estresse térmico**

FLÁVIA MOTA DAMASCENO

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

BOTUCATU - SP

2013

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

**Suplementação dietária de cobre no desempenho
produtivo da tilápia-do-Nilo e resposta hemática sob
estresse térmico**

FLÁVIA MOTA DAMASCENO

Zootecnista

ORIENTADORA: Prof.^a Dra. Margarida M. Barros

CO-ORIENTADORA: Prof.^a Dra. Luciana F. Fleuri

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

BOTUCATU - SP

Junho – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Damasceno, Flávia Mota.

Suplementação dietária de cobre no desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo e resposta hemática sob estresse térmico / Flávia Mota Damasceno. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Margarida Maria Barros

Coorientador: Luciana Francisco Fleuri

Capes: 50403010

1. Tilápia-do-Nilo. 2. Cobre na nutrição animal. 3. Fígado - Histopatologia. 4. Peixe - Alimentação.

Palavras-chave: Aquicultura; Minerais; Nutrição e saúde de peixes; Oreochromis niloticus; Toxidez.

Dedicatória

Aos meus pais, Rafael e Nilça, pelo exemplo de humildade, caráter, dedicação e por todo apoio nas minhas decisões. Desde cedo me ensinarem que é preciso lutar para alcançar nossos sonhos. Obrigada pai e mãe, amo muito vocês.

À minha irmã, Mariana, pelo carinho, amizade e amor.

Ao meu namorado, Pedro, pelo constante incentivo, cumplicidade e companheirismo. Você é meu exemplo de pessoa dedicada, estudiosa e responsável. Te amo.

Ao meu tio Tadeu, que me incentiva nos estudos desde quando eu ainda era criança. Para mim você sempre foi um exemplo a ser seguido, e eu espero um dia poder retribuir todo carinho e atenção que você me proporcionou todos estes anos.

Aos meus tios, Neto e Vera, por todo amor e carinho. Tenho muito amor e consideração por vocês.

Agradecimentos

À Deus por sempre guiar e colocar pessoas tão maravilhosas no meu caminho;

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Margarida M. Barros, pelo constante incentivo, dedicação, confiança e amizade. Grande exemplo de profissionalismo, dedicação e respeito;

À minha co-orientadora, Prof.^a Dra. Luciana F. Fleuri,, pela atenção, auxílio e confiança nas análises bioquímicas;

Ao Prof.^o Dr. Luiz Edivaldo Pezzato pela amizade, carinho e por toda atenção para que este trabalho pudesse ser realizado;

À Prof.^a Dra. Renée L. Amorim, Departamento de Patologia Veterinária – FMVZ/UNESP Botucatu, pelo auxílio nas análises histopatológicas;

Ao Prof.^o Dr. Pedro Padilha, Departamento de Química e Bioquímica – IBB/UNESP Botucatu, pelo auxílio nas análises químicas;

À Prof. Profa. Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, Centro de Isótopos estáveis – IBB/UNESP Botucatu, pelo auxílio nas analyses estatísticas;

Ao Prof.^o Dr. Carlos Roberto Padovani, Departamento de Bioestatística – IBB/UNESP Botucatu, pelo auxílio nas análises estatísticas;

À Prof.^a Dra. Edma Carvalho de Miranda pela amizade, carinho, atenção e apoio em todos os momentos;

À todos os amigos e colegas do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri Lara W. Genovez, Mariucha K. H. R. Rocha, Rafael Lopes da Silva, Vivian Gomes dos Santos, Jakeline M. A. De Freitas, Eric P. de Araújo, Renan de M. Botelho, Caroline P. Teixeira, Ademir C. Fernandes Júnior, João Fernando A. Koch, Pedro L. P. F. de Carvalho, Felipe Tenório Cintra, Graciela P. Martins, Rosangela do Nascimento Fernandes, Érica F. P. Martins, Mariana Roedel Peixoto, João Vitor Queiroz, Rodney Carmo, entre muitos outros que passaram pelo AquaNutri, agradeço à todos vocês pela ajuda, amizade e alegrias;

Ao meu namorado Pedro V. Ferrari Machado pela sua constante ajuda neste trabalho e por me dar todo suporte para o meu crescimento profissional e pessoal;

À minha querida amiga Aline C. Sanches da Silva pela sua amizade, carinho, ajuda e conselhos;

À minha amiga Paula Lima pela sua amizade, alegria e carinho em todos os momentos;

Aos professores e funcionários do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal por todo auxílio;

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da FMVZ, Carlos Pazini Júnior, Seila C. C. Vieira e Aline Couto;

À Gisele Setznagl, Laboratório de Bromatologia – FMVZ/UNESP Botucatu, pela atenção e auxílio nas análises químico-bromatológicas;

Ao José Carlos P. de Lima pela atenção e auxílio nas confecções das lâminas histológicas

À Guabi por confeccionar o premix utilizado neste estudo;

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

À todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

Muito obrigada à todos vocês.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1. NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES.....	2
2. MINERAL COBRE	4
3. ESTRESSE EM PEIXE	16
4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	20

CAPÍTULO II

SUPLEMENTAÇÃO DIETÁRIA DE COBRE NO DESEMPENHO PRODUTIVO DA TILÁPIA-DO-NILO E RESPOSTA HEMÁTICA SOB ESTRESSE TÉRMICO	32
RESUMO	33
ABSTRACT	34
INTRODUÇÃO.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
RESULTADOS	41
DISCUSSÃO.....	42
CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO PERCENTUAL E QUÍMICO BROMATOLÓGICAS CALCULADA DAS DIETAS EXPERIMENTAIS.	54
TABELA 2. VALORES MÉDIOS DE PESO INICIAL (PMI), PESO FINAL (PMF), GANHO DE PESO (GMP), CONSUMO DE RAÇÃO (CR), CONVERSÃO ALIMENTAR (CA), TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO (TCE), TAXA DE RETENÇÃO PROTEICA (TRP) E SOBREVIVÊNCIA (SOB) DA TILÁPIA- DO-NILO ARRAÇOADAS COM NÍVEIS DE INCLUSÃO DE COBRE (Cu) DURANTE 120 DIAS.	55
TABELA 3. MEDIANAS E VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS 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 ARRAÇOADOS COM NÍVEIS DE INCLUSÃO DE COBRE (Cu) DURANTE 120 DIAS, SEM E COM ESTRESSE TÉRMICO.	56
TABELA 4. MEDIANAS E VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS DE PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL (PPT), ALBUMINA (ALB), GLOBULINA (GLOB) E RELAÇÃO ALBUMINA:GLOBULINA DE JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO ARRAÇOADOS COM NÍVEIS DE INCLUSÃO DE COBRE (Cu) DURANTE 120 DIAS, SEM E COM ESTRESSE TÉRMICO.	57
TABELA 5. MEDIANAS E VALORES MÍNIMOS E MÁXIMOS DA CONTAGEM DO NÚMERO DE LINFÓCITOS TOTAIS (LF), NEUTRÓFILOS TOTAIS (NT) E MONÓCITOS TOTAIS (MN) DE JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO ARRAÇOADOS COM NÍVEIS DE INCLUSÃO DE COBRE (Cu) DURANTE 120 DIAS, SEM E COM ESTRESSE TÉRMICO.	58
TABELA 6. ANÁLISE DESCRITIVA DAS MÉDIAS DA ATIVIDADE OXIDATIVA DA CERULOPLASMINA SÉRICA DE JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO ARRAÇOADOS COM DIETAS CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE INCLUSÃO DE COBRE, ANTES E DEPOIS DE ESTRESSE TÉRMICO.	59

FIGURAS

FIGURA 1. PRINCIPAIS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NO FÍGADO DE TILÁPIA-DO-NILO EXPOSTAS A DIFERENTES NÍVEIS DE COBRE DIETÁRIO NO PERÍODO DE 120 DIAS.	60
---	----

CAPÍTULO III

IMPLICAÇÕES.....	63
------------------	----

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. Nutrição e saúde de peixes

Levantamentos realizados pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) mostram que a produção de pescado teve elevado crescimento nas últimas cinco décadas, sendo que isto foi possível devido à intensificação da aquicultura, atrelada a melhoria nos canais de distribuição. No período de 1980-2010 a produção aquícola aumentou doze vezes, a uma média anual de 8,8% (FAO, 2012).

Segundo levantamentos estatísticos divulgados pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2011), a piscicultura brasileira apresentou significativo crescimento nos últimos anos, atingindo 60,2% de crescimento apenas entre 2007 e 2009. A produção de tilápia aumentou 105% em sete anos (2003-2009). Em conjunto, a aquicultura cresceu 43,8%, entre 2007 e 2009, tornando a produção de pescado a que mais cresceu no mercado nacional de carnes no período.

Para possibilitar rápido crescimento dos peixes confinados, de modo a elevar o rendimento da atividade é necessária intensificação da produção, incluindo a implantação de boas práticas de manejo, tais como: controle da qualidade da água, uso de densidades adequadas e fornecimento diário de ração que atenda às exigências nutricionais da espécie.

Assim como em outras produções animais, a probabilidade de ocorrência de doenças em sistema de cultivo intensivo é maior (BONDAD-REANTASO et al., 2005). No caso de peixes criados confinados, sua saúde é dependente da dieta que está sendo oferecida, uma vez que os peixes neste tipo de sistema dependem exclusivamente da dieta para o crescimento e higidez, portanto para ótima condição de saúde é necessário que seja fornecido aos animais dieta apropriada e adequado regime alimentar (KIRON, 2012).

Os prejuízos na aquicultura em decorrência de doenças são consideráveis. A literatura apresenta dados que destacam este problema em alguns países. No ano de 1998-1999 na Tailândia houve prejuízo de US\$ 234,0 a 468,0 por tanque rede (ADB/NACA, 1991); a Tailândia no ano de 1992 teve prejuízo de US\$ 4,3 a 21,3 milhões (CHINABUT, 2002a); devido infestação de patógenos a China teve perdas

anuais de US\$ 120 milhões de 1990-1992 (WEI, 2002); em 2002 o Japão teve prejuízo de US\$ 16,4 milhões (SUNARTO et al., 2004; FHS/AFS, 2004).

De acordo com Gatlin III (2002), o desafio na aquicultura é manter os peixes em condição saudável, que possibilite rápido crescimento e maiores taxas de sobrevivência. Tal condição pode ser atendida com nutrição apropriada, formulação de dietas que forneçam não somente os nutrientes essenciais, mas que preparem os peixes às situações que podem afetar sua saúde.

Assim como outros animais, os nutrientes essenciais para os peixes são aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais, sendo que a falta, ou deficiência, de qualquer um destes nutrientes pode prejudicar as funções metabólicas e, conseqüentemente, afetar a saúde, tornando os peixes mais susceptíveis a agentes oportunistas causadores de doenças (GATLIN III, 2002).

Em decorrência do manejo implantado, tornou-se mais frequente a incidência de doenças nutricionais causadas por deficiência ou desequilíbrio de nutrientes, uma vez que os peixes dependem, exclusivamente, da dieta artificial para a obtenção de nutrientes essenciais em sistemas de cultivo intensivo. Por isto, a determinação das necessidades qualitativas e quantitativas dos nutrientes essenciais na dieta é fundamental para a adequada formulação de rações para peixes (PEZZATO et al., 2004).

Ao analisar o balanço nutricional em rações atenção especial deve ser dada aos minerais, uma vez que, ao se tratar de nutrientes essenciais, são indispensáveis ao metabolismo. Dentre as várias funções desempenhadas pelos minerais destacam-se: formação da estrutura esquelética, manutenção dos sistemas coloidais (pressão osmótica, viscosidade, difusão), manutenção do equilíbrio ácido base, são componentes de hormônios, enzimas e, ainda, ativadores de enzimas. Os minerais mais estudados em nutrição de peixes são: cálcio, fósforo, magnésio, sódio, potássio, ferro, cobre, magnésio, zinco, iodo e selênio.

Dentre os minerais, destaque deve ser dado ao cobre, elemento essencial para os animais, incluindo os peixes (O'DELL, 1984; MERTZ, 1986; LALL, 1989). É componente estrutural de inúmeras enzimas envolvidas em reações metabólicas de óxido-redução. Estas metaloenzimas estão envolvidas na produção de energia celular, proteção das células dos radicais livres, neurotransmissores do cérebro, síntese de

colágeno e produção de melanina (LALL, 2002). Devlin (1998) ressaltou a influência direta do cobre na formação do colágeno e elastina, sendo que sua deficiência pode causar desmineralização dos ossos e fragilidade dos vasos sanguíneos. Este mineral também possui íntima relação com o ferro, por ser componente de uma enzima, denominada ceruloplasmina, responsável pela oxidação do ferro estocado, forma ferrosa (Fe^{2+}) para forma férrica (Fe^{3+}), para que possa ser transportado aos tecidos pela proteína plasmática transferrina.

Desta forma, o cobre é usualmente suplementado em dietas comerciais em função de sua essencialidade para os peixes (LORENTZEN et al., 1998) e sua ação sobre o desempenho produtivo e saúde, ainda, é conflitante e pouco estudada, principalmente sob condições de estresse.

2. Mineral Cobre

Considerado essencial para os vertebrados, o cobre possui numerosas funções bioquímicas nas células, com papel vital à respiração celular e participa como cofator de mais de 30 enzimas do metabolismo (LINDER, 1991). Dentre estas, se destacam a citocromo oxidase, superóxido dismutase, dopamina hidroxilase, tirosinase, alfa⁹-dessaturase e a lisil oxidase (WATANABE et al., 1997).

Dentre suas funções diretas e indiretas no organismo, o cobre também está envolvido na absorção e metabolismo do ferro, age ainda na disponibilidade do ferro para intermédio de uma proteína cobre dependente, denominada ceruloplasmina; e também é responsável pela incorporação do ferro na molécula de hemoglobina. Quando a dieta é deficiente em cobre, ocorre diminuição nos níveis de ferro nos tecidos, devido à baixa atividade da ceruloplasmina, influenciando na hematopoiese (LOVEL, 1998).

2.1. Noções do metabolismo do cobre em peixes

A absorção do cobre ocorre no intestino, sendo o duodeno o principal sítio de absorção. Ao entrar no fluido intersticial este mineral é transportado no sangue por proteínas plasmáticas, albumina e transcupreína, de carga reversível (WINZERLING;

LAW, 1997), as quais carregam o cobre inicialmente ao fígado, principal órgão de sua estocagem e metabolismo. Nas células hepáticas este mineral é rapidamente deslocado para os sítios onde é necessário, no qual é liberado em partículas e subpartículas para a síntese hepática de proteínas cobre-dependentes como: ceruloplasmina, eritrocupreína e incorporação em diversas enzimas, como demonstrado na Figura 1.

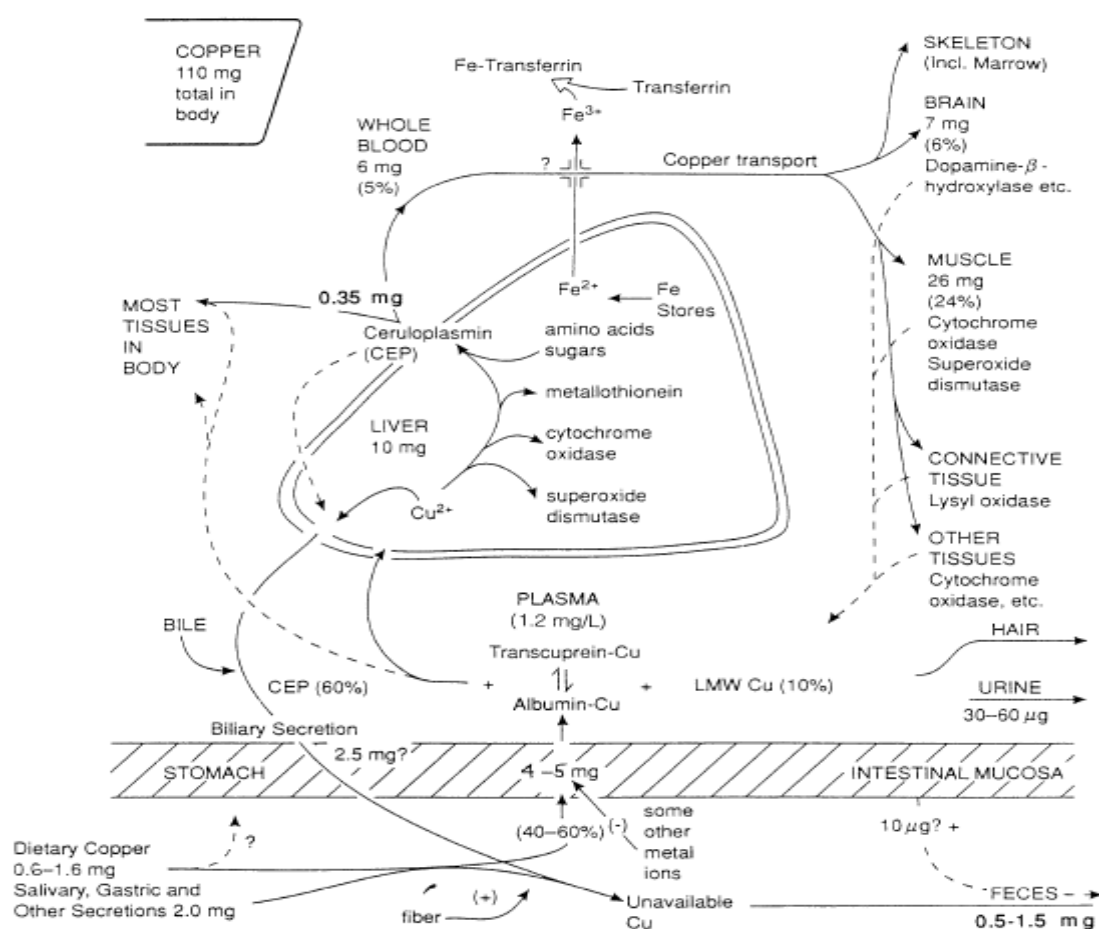


Figura 1. Absorção, transporte e metabolismo do cobre em humanos (LINDER e HAZEGH-AZAM, 1996).

À ceruloplasmina são incorporados seis átomos de cobre durante sua síntese, e esta é secretada no sangue, e atua como principal fonte do mineral para os tecidos extra hepáticos. Na maioria das espécies (exceção das aves), esta proteína é a principal forma do cobre presente no plasma e, acredita-se, ser a principal proteína que transporta cobre para os tecidos extra-hepáticos (HARRIS, 1997).

Recentes estudos em humanos sugerem que a atividade enzimática específica da ceruloplasmina é o indicador mais sensível do estado do cobre no organismo. Tal hipótese foi demonstrada por Shao et al. (2010), avaliando os efeitos de fontes de cobre para a *Carassius auratus gibelio*, os quais verificaram aumento da concentração da ceruloplasmina de acordo com a maior inclusão do mineral na dieta dos peixes, para todas as fontes de cobre avaliadas.

A exigência de cobre para juvenis de garoupa (*Epinephelus malabaricus*) foi estabelecida por Lin et al. (2008), e estes autores notaram que os peixes sujeitos as dietas cuja oferta de cobre foi baixa ($\leq 1,66$ mg de Cu.kg^{-1} da dieta) e aqueles sujeitos aos mais elevados níveis ($\geq 11,03$ mg de Cu.kg^{-1} da dieta) apresentaram as mais baixas atividades plasmáticas da ceruloplasmina, indicando efeito grave de inibição da enzima, quando a presença deste mineral na dieta não está de acordo com as exigências da espécie.

Além de ser o principal transportador de cobre aos tecidos, o papel da ceruloplasmina, também conhecida como ferroxidase, no organismo é bastante elucidado, a qual é responsável pelo transporte de ferro através da membrana (KANEKO, 1997). O ferro absorvido pelo organismo pode ser estocado nos hepatócitos no estado ferroso (Fe^{2+}) na forma de ferritina e hemossiderina, as principais proteínas envolvidas no armazenamento de ferro (HAYS e SWENSON, 1996). Na forma de ferritina o armazenamento ocorre, principalmente, nos hepatócitos, nas células do retículo endotelial e no músculo esquelético. O ferro presente em excesso pode determinar o depósito amorfo deste mineral, denominado hemossiderina, nas esferas adjacentes da ferritina (DEVLIN, 1998).

O transporte deste mineral para os demais tecidos é realizado pela proteína plasmática transferrina, a qual liga-se ao ferro no estado férrico (Fe^{3+}). Portanto, para ser transportado o ferro absorvido necessita ser oxidado. Este processo de oxidação é capacitado pela ceruloplasmina, proteína que intermedia sua liberação da ferritina e hemossiderina tornando-o disponível para ser transportado pela transferrina.

Este mineral também tem efeito direto no metabolismo do ferro e, portanto, indireto na biossíntese de hemoglobina (BAKKER e AMMERMAN, 1995). Para a síntese desta proteína é necessário que ocorra oxidação e incorporação do ferro, sendo a ceruloplasmina responsável por este processo. Além disto, o cobre é componente da

enzima ALA desidrase, atuando como catalizador necessário para a síntese do heme. Este atua como grupamento prostético da hemoglobina, sendo responsável pelo transporte e armazenamento de oxigênio (ANDERSON et al., 2009).

O cobre é constituinte normal e constante no organismo animal, sendo a concentração variável com espécie e idade. A maior concentração de cobre no organismo ocorre no fígado (ANDRIGUETO et al., 1981) e, em menores quantidades, no cérebro, medula óssea, baço, rins e coração (LLOYD et al., 1982). Altos níveis de cobre também são encontrados na íris dos olhos, onde o cobre, geralmente, está associado com melaninas e, em grande parte, ligado à proteínas (LALL, 2002).

A quantidade de cobre presente na dieta influencia diretamente na concentração deste mineral no fígado, isto foi observado no fígado do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), rockfish (*Sebastes schlegeli*), garoupa e yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidracus*) (KNOX et al., 1984; GATLIN et al., 1989; KIN e KANG, 2004; LIN et al., 2010; TAN et al., 2011).

Avaliando os efeitos da exposição dietária e recuperação da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) aos efeitos do cobre, Shaw e Handy (2006) observaram elevação das concentrações no fígado conforme aumentou-se a quantidade de cobre dietário. Resultados semelhantes foram encontrados por Ferrari et al. (2004), estudando a suplementação (0 a 320 mg kg⁻¹ de Cu₂SO₄.5H₂O) para a mesma espécie. Wu e Huang (2008) buscaram estimar a exigência de cobre na dieta de juvenis de tartaruga casca mole (*Pelodiscus sinensis*) de 4-5mg/kg da dieta, evidenciando efeito significativo das doses desse nutriente ofertadas na dieta nas concentrações de cobre no fígado. Todos autores verificaram que a concentração de cobre no fígado é responsiva à quantidade suplementada desse mineral. Segundo Kin e Kang (2004) o fígado é o mais importante tecido de reserva do cobre em relação aos demais (intestino, rim, brânquia e músculo) e concentrações maiores a 50 mg Cu.kg⁻¹ dieta reduziram a taxa de crescimento do rockfish.

A homeostase mineral é realizada pelas células do epitélio intestinal, as quais são responsáveis pela regulação da taxa de absorção de cobre pelo organismo, e pelas brânquias e vesícula biliar, os quais são responsáveis pela excreção do cobre. A absorção dos íons de cobre é realizada através de transporte passivo nas regiões média e posterior do intestino. Quando presente em níveis excessivos na dieta proteínas de baixo

peso molecular ligam-se ao cobre o impedido de ser absorvido , desta forma este pode então ser excretado junto com as fezes que são desprendidas da membrana epitelial (CLEARWATER et al., 2000; HANDY et al., 2000).

2.2. Cobre em dietas para peixes

A dieta é a principal fonte de cobre para peixes em ótimas condições de desempenho (HANDY, 1996; KAMUNDE et al., 2002a,b). De acordo com Abdel-Tawwab et al. (2007), existem poucos íons de cobre livre em águas naturais, pois este mineral está associado com íons inorgânicos e substâncias orgânicas.

Em função deste elemento ser essencial para todos os organismos, incluindo os peixes, o mesmo é suplementado em rações comerciais (LORENTZEN et al., 1998). Em peixes teleósteos a exigência nutricional é de 3,0 a 10 mg Cu.kg⁻¹ em base seca na ração, variando conforme a espécie, estágio de desenvolvimento, regime alimentar (NRC, 2011; CLEARWATER et al., 2002), quantidade de cobre presente na água e níveis de ferro, zinco, molibdênio e cádmio, os quais são antagonistas ao metabolismo do cobre por competirem por sítios de absorção (WATANABE et al., 1997).

As exigências de cobre para algumas espécies de peixes foram reportadas 3,0 mg.kg⁻¹ dieta para a carpa comum (*Cyprinus carpio*) e 3,0 mg.kg⁻¹ dieta para a truta arco íris, 5 mg.kg⁻¹ dieta para o bagre do canal, 5 mg.kg⁻¹ dieta para o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (NRC, 2011), 3,13 a 4,24 mg.kg⁻¹ dieta para o yellow catfish (TAN et al., 2011), 4,0 a 6,0 mg.kg⁻¹ dieta para a garoupa (LIN et al., 2008). Para a tilápia-do-Nilo os valores, ainda, não estão bem definidos. Na literatura são sugeridos entre 4,0 a 5,0 mg Cu.kg⁻¹ na ração para a tilápia-do-Nilo (FERRARI et al., 2004; NRC, 2011) e para o híbrido *O. niloticus* x *O. aureus* (SHIAU e NING, 2003).

De acordo com Gatlin III e Wilson (1986a), os parâmetros ganho de peso, conversão alimentar, enzimas dependentes de cobre (ceruloplasmina), enzimas dependentes de cobre e zinco (SOD e CCO) são indicadores para o estabelecimento da exigência de cobre para peixes. Desta forma Lin et al. (2010) estabeleceram a exigência de cobre para a garoupa em 2 a 3 mg Cu.kg⁻¹ com base no ganho de peso, atividade da enzima superóxido dismutase e TBARS.

A partir dos parâmetros de desempenho, concentração de cobre nos tecidos, atividade antioxidante, resposta imune e microflora intestinal, Shao et al. (2012) estabeleceram a exigência em cobre para o “snout bream” (*Megalobrama amblycephala*) em 3 a 6 mg Cu.kg⁻¹ da dieta. Tan et al. (2011) buscando estabelecer a exigência para juvenis de yellow catfish com base no ganho de peso determinaram que a exigência para esta espécie está entre 3,13 a 4,24 mg Cu.kg⁻¹ da dieta.

Da mesma forma, também, foram estabelecidas exigências em cobre para outras espécies. Wang et al. (2009) definiram a exigência para juvenis de abalone (*Haliotis discus hannai Ino*) em 3 a 5 mg de cobre.kg⁻¹ com base na atividade da enzima superóxido dismutase e fenol oxidase no hepatopâncreas e no soro. A exigência de 4 - 5 mg de cobre.kg⁻¹ na dieta da tartaruga de casca mole foi estabelecida por Wu e Huang (2008) a partir de parâmetros de desempenho e hematológicos. Lee e Shiau (2002) estabeleceram a exigência para o camarão tigre-gigante (*Penaeus monodon*) entre 15 a 30 mg Cu.kg⁻¹ da dieta a partir dos resultados de ganho de peso, conversão alimentar e taxa de eficiência proteica.

Devido à essencialidade do cobre no organismo, e as consequências da ausência, assim como a sub-dosagem e o excesso de cobre na dieta a saúde dos peixes, enfatiza-se a importância da determinação do nível adequado de cobre na dieta para a formulação de dietas balanceadas que irão contribuir para o funcionamento normal do organismo animal.

2.3. Deficiência por cobre em peixes

A deficiência de cobre tem efeitos detrimetais em vários órgãos e tecidos, incluindo o sistema hematopoiético, cardiovascular e nervoso. Os sinais clínicos de deficiência incluem anemia, leucopenia (diminuição do número de leucócitos no sangue), desmineralização dos ossos, hipercolesterolemia (aumento na razão entre os ácidos graxos saturados e monoinsaturados), fragilidade das grandes artérias e desmielinização do tecido nervoso (DEVLIN, 1998).

Devido à inter-relação do cobre com o metabolismo do ferro no organismo vários sinais clínicos da deficiência de cobre estão associados à deficiência funcional do ferro, demonstrando a estreita ligação desses minerais (HAYS e SWENSON, 1996).

Um dos sinais clínicos por deficiência em cobre é a anemia hipocrômica, a qual acarreta em diminuição da transferrina no plasma, acúmulo de ferro no fígado e aumento da atividade da enzima heme oxigenase (responsável pela degradação do heme). Isto ocorre quando o ferro da ferritina está indisponível em função da baixa atividade da ceruloplasmina.

Níveis desse mineral abaixo do recomendado para espécie também ocasionam falha na formação de colágeno e elastina, conseqüentemente, fragilidade dos vasos sanguíneos, pois o cobre ativa a enzima lisil-oxidase que permite a ligação cruzada entre fibras colágenas, conferindo rigidez estrutural e elasticidade (McDOWELL, 1992). Falha na ligação cruzada do colágeno e elastina e um defeito muscular resultam em aumento de tamanho do coração e falhas cardíacas em animais deficientes em cobre (NRC, 2011).

Além dessas características, segundo Lovell (1998), o cobre está envolvido em vários sistemas enzimáticos, tais como citocromo C oxidase e tirosinase e, segundo Babu e Failla (1990), esse mineral, aparentemente, afetou as propriedades básicas do sistema imune, por ser componente da enzima, superóxido dismutase. Sabe-se que a deficiência por cobre diminui a atividade desta enzima, responsável por catalisar a dismutação de O_2 para H_2O_2 , que é um grupo oxidante que participa nas reações de defesa dos neutrófilos (BABIOR et al., 1973), formado durante o burst respiratório.

Níveis de cobre na dieta abaixo da exigência produziram retardo no crescimento e baixas concentrações nos tecidos de carpa comum (OGINO e YANG, 1980); redução na atividade da citocromo C oxidase no coração e da superóxido dismutase no fígado do bagre do canal (GATLIN III e WILSON, 1986a). O cobre é amplamente distribuído no ambiente aquático e está presente nos alimentos, entretanto sua deficiência pode ocorrer sob condições extremas (LALL, 2002).

2.4. Toxidez por cobre em peixes

Mesmo sendo nutriente essencial para o metabolismo celular, o cobre se torna tóxico aos animais quando presente em elevados níveis, e na sua forma livre também é altamente tóxico às células. O excesso deste mineral na dieta acarreta, primeiramente, a formação de radicais livres nos tecidos onde é acumulado. Além disto, a toxidez por

cobre na dieta pode ocasionar severas lesões no intestino, incluindo inibição da atividade de enzimas digestivas e redução da motilidade intestinal (WOODWARD et al., 1995).

Diferente dos demais animais, a intoxicação por cobre nos peixes pode ocorrer, também, pelo ambiente em que vivem, pois este mineral é amplamente utilizado na aquicultura, na forma de sulfato de cobre, no controle de infestação de algas. Nos peixes o excesso de cobre na água é absorvido, principalmente, pelas células das brânquias e, de acordo com Bury et al. (2003), este processo pode ocorrer por duas vias: transportador de cobre e canal de sódio epitelial putativo. Para ser absorvido o íon de cobre é reduzido a Cu^+ , e dentro da célula liga-se à metaloproteínas dentro do complexo de Golgi e, então é liberado na corrente sanguínea via exocitose pela membrana basolateral, como demonstrado na Figura 2. Portanto, altas concentrações na água podem prejudicar as funções branquiais e alterar a homeostase do sódio.

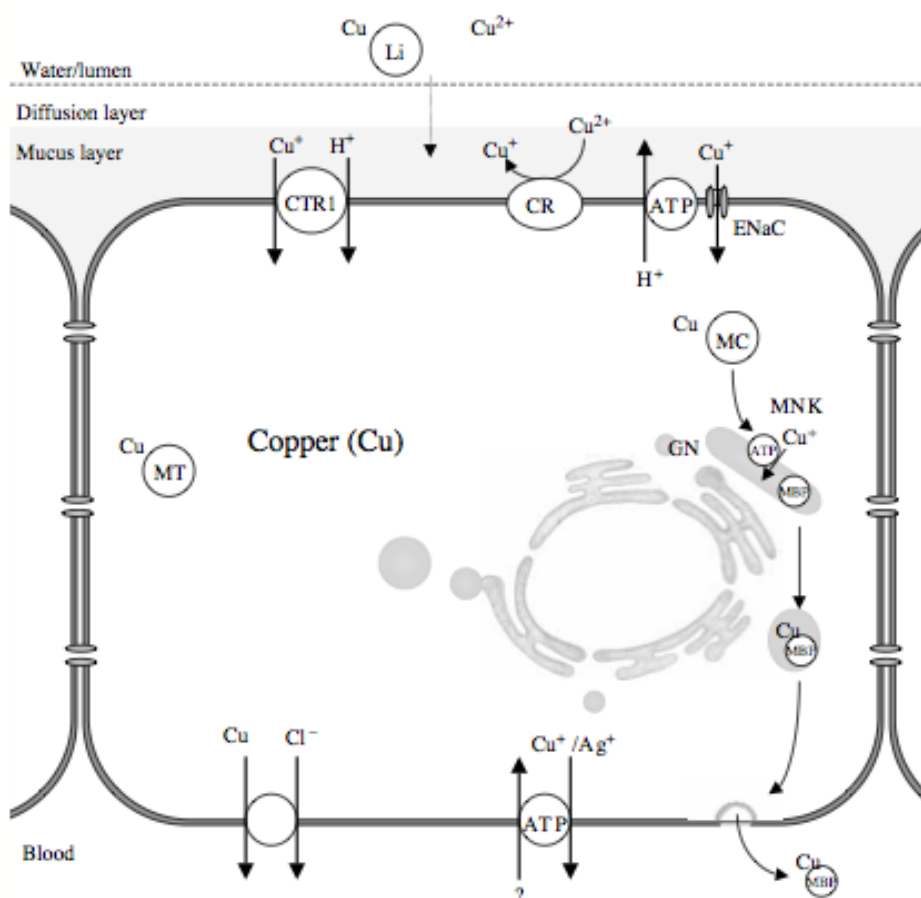


Figura 2. Representação hipotética das vias de absorção celular de cobre nos peixes, absorção intestinal e branquial (BURY et al., 2003).

Analisando as respostas fisiológicas de tilápias expostas a doses subletais de cobre, Pelgron et al. (1995) observaram que a primeira resposta fisiológica à exposição é o acúmulo nas brânquias e no plasma. Após dez dias houve proliferação das células clorídricas e aumento do diâmetro médio das células, além de distúrbios na regulação iônica. Buscando avaliar as interações entre a absorção do cobre dietário e da água no desempenho da truta arco-íris, Kamunde (2002b) afirmou que a dieta é a principal fonte de cobre para truta arco-íris, sob condições normais de cobre na dieta e na água, contribuindo com mais de 90% do estoque do mineral nos tecidos, e em situações de deficiência do mineral as brânquias contribuíram com até 60% do cobre estocado nos tecidos. Assim, este autor afirmou que as brânquias possuem papel fundamental de homeostase do cobre em peixes, e forneceu evidências de que elas atuaram como órgão de regulação nutricional, as quais absorvem cobre da água somente quando a exigência na dieta não estava adequada.

Segundo Fedeli et al. (2010) não há dúvidas que a exposição ao excesso de cobre pode ocasionar danos às células e tecidos, pois os íons de cobre e seus complexos podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio que podem danificar biomoléculas tais como lipídios, proteínas e DNA. Buscando avaliar os efeitos da exposição de cobre no trânsito osmorregulatório e no estresse oxidativo da truta arco-íris, Hoyle et al. (2007) observaram mudanças nos níveis de eletrólitos dos tecidos, atividade da Na^+K^+ -ATPase e distúrbios da peroxidação lipídica, devido à exposição de cobre, os peixes apresentaram distúrbios na osmorregulação e sofreram alterações no estresse oxidativo.

A intoxicação por cobre pode ocorrer de forma crônica ou aguda, acarretando diferentes sintomas. A primeira causa efeitos oxidativos aos tecidos. Normalmente o cobre livre na célula é mantido em baixas concentrações, porém quando sua concentração está acima da homeostase este mineral pode alterar as funções celulares ligando-se à proteínas, ácidos nucleicos e pela formação de espécies reativas de oxigênio e radical hidroxil. Estes radicais podem causar peroxidação lipídica na membrana das células, clivagem dos ácidos nucleicos e oxidação de proteínas celulares (VIARENGO et al., 2002).

Por sua vez a toxidez aguda por cobre causa náusea e vômitos em muitas espécies animais. Acredita-se que isto ocorra devido aos íons de cobre estimularem os

receptores do nervo vago, ocasionando o reflexo de náusea e vômito (ARAYA et al., 2002). De acordo com Who (1998), além destes sintomas também são observados diarreia, salivação excessiva, dor abdominal, convulsões, paralisias e morte.

Em casos de toxicidade aguda deste mineral em peixes as brânquias são severamente danificadas (BAKER, 1969; DAOUST et al., 1984), assim como o fígado e o rim também são afetados (BAKER, 1969). Quando expostos a doses subletais de cobre na água, foi encontrado acúmulo de cobre, primeiramente, nas brânquias, fígado e rim do linguado (*Paralichthys flesus* L.) (STAGG e SHUTTLEWORTH, 1982), perca (*Perca fluviatilis*) (COLLVIN, 1984) e da truta arco-íris (YAMAMOTO et al., 1981).

Excesso de cobre na dieta de peixes causa acúmulo deste mineral no fígado e intestino, concomitantemente com sérias lesões em ambos os tecidos. Em salmonídeos Bernetssen et al. (1999) observaram lesões e necrose das células do íleo, aumento da taxa de proliferação celular com indicações de morte celular e irritação no intestino grosso, devido ao acúmulo de cobre no tecido. Shaw e Handy (2006) avaliaram alterações morfológicas nas brânquias, fígado e intestino da tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas práticas suplementadas com 2000 mg Cu.kg⁻¹, e observaram, em comparação ao grupo controle, e não houve alterações na morfologia das brânquias e intestino. Estes autores também observaram diminuição de ingestão nos animais que receberam dieta com 2000 mg de Cu.kg⁻¹ da ração, quando comparados ao grupo controle e diminuição do ganho de peso diário após a exposição dietária de cobre para a tilápia-do-Nilo.

Em peixes, o excesso de cobre na dieta produz efeitos tóxicos chegando a reduzir o crescimento (CLEARWATER et al., 2002), também afeta os parâmetros sanguíneos, comportamento, atividade enzimática e reprodução (ROESIADI e ROBINSON, 1994; NUSSEY et al., 1995). Em salmonídeos os efeitos tóxicos desse mineral na alimentação podem incluir baixo crescimento (CLEARWATER et al., 2002), lesões severas no intestino nas inclusões acima de 20 mg Cu.kg⁻¹ (HANDY, 1996), ou leves mudanças na proliferação de células intestinais (BERNETSSEN et al., 1999; LUNDEBYE et al., 1999), deposição de gordura no fígado (HANDY et al., 1999), alteração hematológica (KNOX et al., 1982) e dificuldade na locomoção (CAMPBELL et al., 2002).

Bernetssen et al. (1999) avaliando os efeitos do aumento das concentrações de cobre na dieta de alevinos de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) notaram redução no

desempenho dos peixes alimentados com níveis a partir de 500mg Cu.kg⁻¹ na dieta. Hays e Swenson (1996) concluíram que o excesso desse mineral na dieta de animais resulta em acúmulo de cobre no fígado, com diminuição na concentração de hemoglobina sanguínea e porcentagem de hematócrito, sendo a função hepática prejudicada pelo envenenamento por cobre, o que resulta em icterícia provocada por hemólise dos eritrócitos.

Avaliando os efeitos tóxicos da exposição dietária de cobre para o bagre africano (*Clarias gariepinus*), Hoyle et al. (2007) notaram que elevadas concentrações deste mineral resultaram em depleção de glicogênio hepático devido à redução do consumo e, consequente, redução no desempenho. Em relação aos parâmetros bioquímicos os peixes apresentaram pequeno distúrbio no balanço osmótico, porém elevado índice TBARS que indicam que o excesso de cobre induziu estresse oxidativo, seguido de aumento da glutathione total no intestino, a qual oferece proteção ao estresse oxidativo.

Bernetssen et al. (1999) avaliaram os efeitos de níveis tóxicos de cobre para o salmão do Atlântico, e observaram que não houve aumento na concentração de cobre na água e nem acúmulo do mineral nas brânquias dos peixes que foram alimentados com a dieta suplementada de cobre. Desta forma, não houve dispersão significativa do cobre das dietas experimentais na água. De acordo com BurrIDGE et al. (2010), o cobre associado às dietas dos peixes geralmente é indisponível na coluna de água.

Elevadas concentrações de cobre na dieta influenciam parâmetros de interesse na aquicultura, como: deposição de lipídeos, proteínas, carboidratos e minerais nos tecidos, os quais dependem do consumo alimentar, uso metabólico e absorção intestinal e estes fatores podem ser influenciados pela concentração de cobre na dieta (BERNETSSEN et al., 1999).

2.5. Hematologia em peixes

Os parâmetros hematológicos são fundamentais para se diagnosticar doenças e eventuais problemas patológicos. Qualquer alteração fisiológica é, concomitantemente, refletida no sangue podendo afetar os parâmetros sanguíneos (HRUBEC et al., 1997).

A busca pelo melhor conhecimento da relação entre a nutrição e saúde de peixes ganha cada vez mais impulso com o aprimoramento e descobertas de novas tecnologias,

visando adequar os dados obtidos em pesquisas com as condições da produção. 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).

Mudanças na fisiologia do animal em situações de estresse podem ser, igualmente, detectadas pela avaliação hematológica. Hesser (1960) propuseram o uso de parâmetros hematológicos como indicadores de saúde. Ranzani-Paiva e Silva-Souza (2004) ressaltaram que avaliações sanguíneas relacionadas a respostas fisiológicas dos peixes têm sido, frequentemente, adotadas por pesquisadores.

Por meio de amostras de sangue é possível realizar exames hematológicos, bacteriológicos, parasitológicos, bioquímicos, toxicológicos, sorológicos, dentre outros. Neste sentido, a hematologia tem importância como análise fisiológica e no diagnóstico de doenças. Avaliando-se a homeostase sanguínea pode-se determinar a gravidade do quadro diagnosticado e avaliar a resposta ao tratamento. Além disso, as alterações morfológicas das células são úteis nas análises toxicológicas (RANZANI-PAIVA, 2006).

Segundo Coles (1984), para que haja produção de eritrócitos é necessário que exista suprimento adequado de globina, elementos como ferro, cobre e cobalto; e o fator hematopoiético, responsável pela maturação normal e adequada. Os eritrócitos tem função de transporte de oxigênio, dióxido de carbono e íon de hidrogênio tamponado, as quais estão inter-relacionadas (KANEKO, 1997).

Igualmente ao ferro, o cobre tem função importante na eritropoiese. A forma na qual o cobre é encontrado no sangue é conhecida como hemocupreína ou eritrocupreína (MANN e KEILIN, 1938). A eritrocupreína é uma proteína que se liga ao cobre e é encontrada nos eritrócitos (SHIELDS et al., 1962).

O cobre no plasma também ocorre ligado à proteína ceruloplasmina, cuproproteína que ligada à seis átomos de cobre, a qual é necessária para mobilização normal de ferro dos seus locais de armazenamento para o plasma. Em condições deficiência de cobre, o ferro não pode ser liberado, levando a baixos níveis séricos de ferro, mesmo na presença de reservas de ferro normais.

Como mencionado anteriormente, o cobre possui fundamental participação na síntese do grupamento heme e, conseqüentemente, na produção de hemoglobina.

Portanto, a deficiência em cobre e a má utilização dos íons de ferro acarretam em sérias alterações sanguíneas, como o desenvolvimento de anemias.

A síntese de eritrócitos cessa apenas quando a concentração de hemoglobina atinge determinado nível. Isto significa que, a prolongada deficiência de ferro acarreta produção de eritrócitos menores e com menor taxa de hemoglobina. Este quadro é denominado de anemia microcítica e hipocrômica. Neste tipo de anemia, os eritrócitos têm o seu tamanho reduzido e apresentam menor taxa de hemoglobina.

Avaliando o efeito do cobre dietário para o bagre do canal, Murai et al. (1981) notaram diminuição no número de eritrócitos e porcentagem de hematócrito para os peixes que receberam dietas suplementadas com níveis acima da exigência para a espécie. Contradizendo os resultados encontrados por Lanno et al. (1985) Gatlin e Wilson (1986a), Handy et al. (1999), Ferrari et al. (2004), Kin e Kang (2004) e Shaw e Handy et al. (2006), os quais não observaram diferenças nos parâmetros hematológicos dos peixes alimentados com dietas suplementadas com cobre.

Para outras espécies a influência de cobre nos parâmetros hematológicos também vêm sendo estudada. Wu e Huang (2008) estabeleceram a exigência dietária de cobre para tartarugas de casca mole e observaram diminuição no número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito para animais que receberam dietas com níveis abaixo de 0,8 mg Cu.kg⁻¹ e acima de 20,4 mg Cu.kg⁻¹ dieta. Em estudo com o camarão grass, Lee e Shiau et al. (2002) notaram que os animais alimentados com níveis de cobre abaixo ou acima da exigência apresentaram diminuição na contagem de hemócitos.

Por sua fundamental importância no metabolismo, com destaque à sua influência nos parâmetros hematológicos dos peixes, o estudo da relação do mineral cobre com a saúde dos peixes é de grande importância.

3. Estresse em peixe

O estresse pode ser considerado como conjunto de respostas não específicas do organismo a situações que ameaçam desequilibrar sua homeostase (BARTON, 2002), podendo ser considerado um dos principais fatores responsáveis pela ocorrência de doenças e altas mortalidades na aquicultura (CONTE, 2004). O sistema fisiológico dos

peixes pode ser desafiado ou estressado por vários fatores (JOBLING, 1994), que podem ser considerados indutores de estresse, e determinar alterações na condição fisiológica dos peixes. Dentre esses fatores, muitos estão correlacionados com as características físico-químicas da água, como temperatura, e outros estão relacionados ao manejo normal de produção.

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

A temperatura da água deve ser destacada como fator importante na indução ao estresse, sendo que temperaturas elevadas acarretam na diminuição do oxigênio dissolvido na água dificultando o processo de respiração dos peixes, conseqüentemente, ocorre o aumento do consumo de oxigênio e dos parâmetros respiratórios pelos animais (BOYD, 1996).

Desta forma, ressalta-se o papel do cobre no processo de respiração, pois a hemoglobina é o pigmento responsável pelo transporte de oxigênio pelo sistema circulatório. E como mencionando anteriormente, o cobre possui participação na formação da hemoglobina como componente da ALA desidrase, responsável pela formação do heme, e pela incorporação do ferro na molécula de hemoglobina, possibilitado pela ceruloplasmina.

As variações de temperatura da água de cultivo são frequentes e, acometem à saúde e o crescimento dos peixes, os quais tentam manter a homeostase frente à este agente estressor. Carvalho e Fernandes (2006) avaliando os efeitos da temperatura na toxicidade do cobre e respostas hematológicas do peixe neotropical *Prochilodus scrofa* em baixo e alto pH, relataram que os efeitos da temperatura da água sobre os parâmetros

hematológicos foram evidentes, e afirmam que em temperaturas elevadas (30° C) as mudanças nestes parâmetros demonstraram resposta do organismo na busca do melhor transporte de oxigênio para a manutenção da homeostase.

O uso de estratégias nutricionais que favoreçam o mecanismo de defesa dos peixes tem demonstrado importância para obtenção de peixes saudáveis tornando-os 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, esta pesquisa se apresenta em um capítulo intitulado:

Capítulo II: “Suplementação dietária de cobre no desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo e respostas hemáticas sob estresse térmico” teve por objetivo avaliar os efeitos de deficiência e toxicidade por cobre para juvenis de tilápia-do-Nilo submetidos ao estresse por calor, nos parâmetros de desempenho, hematológicos e bioquímicos; e avaliar os efeitos do excesso deste mineral no tecido hepático. A redação deste capítulo foi realizada de acordo com as normas de publicação do periódico **Aquaculture**.

4. Referência Bibliográfica

ABDEL-TAWWAB, M.; MAMDOUH, A. A.; MOUSA, F.; ABBASS, E. Growth performance and physiological response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.) fed organic selenium prior to the exposure to environmental copper toxicity. **Aquaculture**, v. 272, p.335–345, 2007.

ANDERSON, J.; FRAZER, D. M.; McLAREN, G. D. Iron absorption and metabolism. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, p.129-135, 2009.

ADB/NACA. Fish health management in Asia-Pacific. Report of a Regional Study and Workshop on Fish Disease and Fish Health Management. **ADB Agriculture Department Rep. Ser.** No. 1, Network of Aquaculture Centers in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand. 1991. 627p.

ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L. MINARDI, I.; GEMAEL, I.; FLEMMING, J. S.; SOUSA, G. A.; FILHO, A. B. **Nutrição Animal**. São Paulo: Nobel, 1981. 395p.

ARAYA, M.; GONZALEZ, M.; OLIVARES, M.; UAUY, R. Biological effects of chronic copper exposure. In: MASSARO, E. J. **Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology**, ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2002. p.385-396.

BABIOR, B. M.; KIPNES, R. S.; CURNUTTE, J. T. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bacterial agent. **Journal Clinical Investigation**, v.52, p.741-744, 1973.

BABU, U.; FAILLA, M. Copper status and function of neutrophils are reversibly depressed in marginally and severely copper deficient rats. **Journal of Nutrition**, v. 120, p.1700-1709, 1990.

BAKER, J. T. P. Histological and electron microscopical observations on copper poisoning in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 26, p.2785-2793, 1969.

BAKER, D. H.; AMMERMAN, C. B. Copper bioavailability. In: AMMERMAN, C. B.; BAKER, D.H.; LEWIS, A.J. **Bioavailability of nutrients for animals**. New York: Academic Press, 1995. p.127-156.

BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; FALCON, D. R.; GUIMARÃES, I. G. Nutrição e saúde de peixes. In: Congresso Latino-Americano de Nutrição animal, 2, 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. 2006. Cd-rom.

BARTON, B. A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p.515, 2002.

BERNTSEN, M. H. G.; HYLLAND, K.; WENDELAAR BONGA, S. E.; MAAGE, A. Toxic levels of dietary copper in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. **Aquatic Toxicology**, v. 46, p.87-99, 1999.

BONDAD-REANTASO, M. G.; SUBASINGHE, R. P.; ARTHUR, J. R.; OGAWA, K.; CHINABUT, S.; ADLARD, R.; TAN, Z.; SHARIFF, M. Disease and health management in Asian aquaculture. **Veterinary Parasitology**, v. 132, p.249-272, 2005.

BOYD, C. E. **Water Quality in Ponds for Aquaculture**. Shrimp Mart (Thai) Co. Ltd. Hatyai, Songkhla, Thailand, 1996. 482p.

BURRIDGE, L.; WEIS, J. S.; CABELLO, F.; PIZARRO, J.; BOSTICK, K. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**, v. 306, p.7-23, 2010.

BURY, N. R.; WALKER P. A.; GLOVER, C. N. Review Nutritive metal uptake in teleost fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p.11-23, 2003.

CAMPBELL, H. A., HANDY, R. D., SIMS, D. W. Increased metabolic cost of swimming and consequent alterations to circadian activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to dietary copper. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 59, p. 768-777, 2002.

CARVALHO, C. S; FERNANDES, M. N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. **Aquaculture**, v. 251, p.109-117, 2006.

CHINABUT, S. Jaundice disease in catfish, as case study demonstrating a decline in incidence as a result to research output. In: ARTHUR, J. R.; PHILLIPS, M. J.; SUBASINGHE, R. P.; REANTASO, M. B.; MACRAE, I. H. **Primary Aquatic Animal Health Care in Rural, Small-Scale, Aquaculture Development**. FAO Fisheries Technical Paper, No. 406, p.77-80, 2002a.

CLEARWATER, S. J.; FARAG, A. M.; MEYER, J. S. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132C, p.269-313, 2002.

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Manole, 1984. 566p.

COLLVIN, L. Uptake of copper in the gills and liver of perch, *Perca fluviatilis*. **Ecological Bulletins**, v. 36, p.57-61, 1984.

CONTE, F. S. Stress and welfare of culture fish. **Applied Animal Behavior Science**, v. 86, p.205, 2004.

DAOUST, P. -Y.; WOBSTER, G.; NEWSTEAD, J.D. Acute pathological effects of inorganic and copper in gills of rainbow trout. **Veterinary Pathology**, v. 21, p.93-101, 1984.

DEVLIN, T. M. **Textbook of biochemistry: with clinical correlations**. 4 ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1998. 1007p.

FAO. Fisheries Department. **The State of world fisheries and aquaculture 20012**. FAO Fisheries Technical Paper. Rome, FAO, 2012. 179p.

FEDELI, D.; CARLONI, M.; FALCIONI, G. Oxidative damage in trout erythrocyte in response to “in vitro” copper exposure. **Marine Environmental Research**, v. 69, p.172-177, 2010.

FERRARI, J. E. C.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; GONÇALVES, G. S.; HISANO, H.; KLEEMAN, G. K. Níveis de cobre em dietas para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. **Acta Scientiarum**. Animal Sciences Maringá, v. 26, No. 4, p. 429-436, 2004.

FHS/AFS, 2004. Electronic Newsletter of the Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Issue 3, January/February 2004.

GATLIN III, D. M.; WILSON, R. P. Dietary copper requirement of fingerling channel catfish. **Aquaculture**, v. 54, p.277-285, 1986a.

GATLIN III, D. M.; PHILLIPS, H. F.; TORRANS, E. L. Effects of various levels of dietary copper and zinc of channel catfish. **Aquaculture**, v. 76, p.127-134, 1989.

GATLIN III, D. M. Nutrition and Fish Health. In: Halver, J.E.; Hardy, R.W. **Fish Nutrition**. 3 ed. San Diego: Academic Press, 2002. p.671-702.

HANDY, R. D. Dietary exposure to toxic metals in fish. In: TAYLOR, E.W. **Toxicology of Aquatic Pollution**. Cambridge University Press, Cambridge, 1996. p.29-60.

HANDY, R. D.; SIMS, D. W.; GILES, A.; CAMPBELL, H. A.; MUSONDA, M. M. Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. **Aquatic Toxicology**, v. 47, p.23-41, 1999.

HARRIS, E. D. Copper. In: O'DELL B. L.; SUNDE R.A. **Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements**. New York: Marcel Dekker, 1997. p.231-273.

HAYS, V. W.; SWENSON, M. J. Minerais. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.471-487.

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

HOYLE, I.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Dietary copper exposure in the African walking catfish, *Clarias gariepinus*: Transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. **Aquatic Toxicology**, v. 83, p. 62-72, 2007.

HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A.; Robertson, J.L. Blood biochemical reference intervals for sunshine bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) in three culture systems. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, p.624-627, 1997.

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

KAMUNDE, C. N.; CLAYTON, C.; WOOD, C. M. Waterborne vs. dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. **American Journal of Physiology**, v. 283, R69-R78. 2002a.

KAMUNDE, C.; GROSELL, M.; HIGGS, D.; WOOD, C. M. Copper metabolism in actively growing rainbow, trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake. **Journal of Experimental Biology**, v. 205, p.279-290, 2002b.

KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. Florida: Academic Press, 1997. 932p.

KIM, S.- G.; KANG, J.- C. Effects of dietary copper exposure on accumulation, growth and hematological parameters of the juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Marine Environmental Research**, v. 58, p.65-82, 2004.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, p.111-133, 2012.

KNOX, D.; COWEY, C. B.; ADRON, J. W. Effects of dietary copper and copper:zinc ration on rainbow trout *Salmo Gairdneri*. **Aquaculture**, v. 27, p.111-119, 1982.

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

LALL, S. P. The Minerals. In: Halver, J. E.; Hardy, R.W. **Fish Nutrition**. 2 ed. San Diego: Academic Press. 1989, p.219.

LALL, S. P. The Minerals. In: Halver, J. E.; Hardy, R. W. **Fish Nutrition**. 3 ed. San Diego: Academic Press, 2002, p.289-290.

LANNO, R. P.; SLINGER, S. J.; HILTON, J. W. Maximum tolerable and toxicity levels of dietary copper in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Aquaculture**, v. 49, p.257-268, 1985.

LEE, M.-H.; SHIAU, S.-Y. Dietary copper requirement of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 13, p.259-270, 2002.

LIN, Y. -H.; SHIE, Y. -Y.; SHIAU, S. -Y. Dietary copper requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, v. 274, p.161-165, 2008.

LIN, Y. -H.; SHIH, C. -C.; KENT, M.; SHIAU, S. -Y. Dietary copper requirement reevaluation for juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*, with an organic copper source. **Aquaculture**, v. 310, p.173-177, 2010.

LINDER, M. C. **Biochemistry of Copper**. Plenum Press, New York, 1991. 544p.

LINDER, M. C.; HAZEGH-AZAM, M. Copper biochemistry and molecular biology. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 5, p.797S-811S, 1996.

LORENTZEN, M.; MAAGE, A.; FULSHAMN K. Supplementing copper to a fish meal based diet fed to Atlantic salmon parr affects liver copper and selenium concentrations. **Aquaculture Nutrition**, v. 4, p.67-72, 1997.

LORENTZEN, M.; MAAGE, A.; JULSHAMN, K. Supplementing copper to a fish meal based diet fed to Atlantic salmon parr affects liver copper and selenium concentrations. **Aquaculture Nutrition**, v. 4, p. 67-77, 1998.

LOVELL, R. T. **Nutrition and Feeding of Fish**. 2 ed. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 1998. 267p.

LOYD, L. E.; MCDONALD, B. E.; CRAMPTON, E. W. **Fundamentos de Nutrición**. Zaragoza: Acribia. 1982. p.253-256.

LUNDEBYE, A. K.; BERNTSEN, M. H. G.; WENDELAAR BONGA, S. E.; MAAGE, A. Biochemical and physiological responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following dietary exposure to copper and cadmium. **Marine Pollution Bulletin**, v. 39, p.137-144, 1999.

MANN, T.; KEILIN, D. Haemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. **Proceedings of Royal Society B: Biological Sciences**, v.126, p.303, 1938.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. San Diego: Academic Press, 1992. p.524.

MERTZ, W. **Trace Elements in Human Nutrition**, 5 ed. Academic Press, Orlando, 1986. 499p.

MPA. Participação da Aquicultura no setor pesqueiro nacional. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. 29 Agosto 2011. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/aquiculturampa/informacoes/producao>. Acesso em: 31 Janeiro 2013.

MURAI, T.; ANDREWS, J. W.; SMITH JR, R. G. Effects os dietary copper on channel catfish. **Aquaculture**, v. 22, p.353-357, 1981.

NRC. National Research Council. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, DC: Public Review Draft, 2011. 375 p.

NUSSEY, G.; VAN VUREN, J. H. J.; PREEZ, H. H. Effect of copper the hematology and osmoregulation of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 111C, p.369-380, 1995.

O'DELL, B. L. **Present Knowledge of Nutrition, Nutrition Reviews. Nutrition Foundation**, Washington, DC, 1984. 506p.

OGINO, C.; YANG, G. Y. Requirement for carp and rainbow trout for dietary manganese and copper. **Bulletin Japanese Society Scientific Fish**, v. 46, p.455-458, 1980.

PELGROM, S. M. G. J.; LOCK, R. A. C.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 32, p.303-320, 1995.

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

PICKERING, A.D. **Stress and Fish**. London: Academic Press, 1981. p.11-47.

RANZANI-PAIVA, M. J.; SILVA-SOUZA, A. T. Hematologia de Peixes Brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M. J., TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Varela Publishing, São Paulo, Brazil, 2004. p.89-120.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. **Hematologia de peixes: Técnicas hematológicas e pesquisa de hemoparasitos**. São Paulo: UNESP-BOTUCATU, 2006. 45p.

ROESIJADI, C.; ROBINSON, W. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. In: MALINS, D. C.; OSTRANDER, G. K. **Aquatic**

toxicology molecular, biochemical and cellular perspectives. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.387-420.

SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p.111-121, 2006.

SHAO, X-. P.; LIU, W-. B.; XU, W-. N.; LU, K-. L.; XIA, W.; JIANG, Y-. Y. Effects of dietary copper sources and levels on performance, copper status, plasma antioxidant activities and relative copper bioavailability in *Carassius auratus gibelio*. **Aquaculture**, v. 308, p.60-65, 2010.

SHAO, X-. P.; LIU, W-. B.; LU, K-. L.; XU, W-. N.; ZHANG, W-. W.; WANG, Y.; ZHU, J. Effects of tribasic copper chloride on growth, copper status, antioxidant activities, immune responses and intestinal microflora of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fed practical diets. **Aquaculture**, v. 338-341, p.154-159, 2012.

SHIAU, S. Y.; NING, Y. C. Estimation of dietary copper requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Animal Science**, v. 77, p. 287-279, 2003.

SHIELDS, G. S.; COULSON, W. F.; KIMBALL, D. A.; CARNESS, W. H.; CARTWRIGHT, G. E. WINTROBE, M. M. Studies of copper metabolism, XXXII. Cardiovascular lesions in copper deficient swine. Tokyo, **American Journal of Pathology**, v.41, p.603-621, 1962.

STAGG, R. M.; SHUTTLEWORTH, T. J. The accumulation of copper in *Platichthys flesus* L. and its effects on plasma electrolyte concentrations. **Journal of Fish Biology**, v. 20, p.491-500, 1982.

SUNARTO, A.; WIDODO; TAUKHID; KOESHARYANI, I.; SUPRIYADI, H.; GARDENIA, L.; SUGIANTI, B.; RUKMONO, D. IN: LAVILLA- PITOGO, C. R.;

NAGASAWA, K. Transboundary Fish Diseases. In Southeast Asia: Occurrence, Surveillance. **Research and Training**. Tigbauan, Iloilo, Philippines. SEAFDEC Aquaculture Department, p.91-121, 2004.

TAN, X. –Y.; LUO, Z.; LIU, X.; XIE, C. –X. Dietary copper requirement of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, p.170-176, 2011.

TORRECILAS, S; MAKOL, A.; CABALLERO, M. J.; MONTERO, D.; ROBAINA, L.; REAL, F.; SWEETMAN, J.; TORT, L.; IZQUIERDO, M. S. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 5, p. 969-981, 2007.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; BOLOGNESIS, C. Cellular responses to copper in aquatic organisms. In: MASSARO, E. J. **Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology**, Totowa, NJ: Humana Press, 2002. P.417-431.

WANG, W.; MAI, K.; ZHANG, W.; AI, Q.; YAO, C.; LI, H.; LIUFU, Z. Effects of dietary copper on survival, growth and immune response of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. **Aquaculture**, v. 297, p. 122-127, 2009.

WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v. 151, p.185-207, 1997.

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

WEI, Q. Social and economic impacts of aquatic animal health problems in aquaculture in China. In: ARTHUR, J.R., PHILLIPS, M.J., SUBASINGHE, R. P., REANTASO, M. B., MACRAE, I. H. **Primary Aquatic Animal Health Care in Rural, Small-Scale, Aquaculture Development**. FAO Fisheries Technical Paper No. 406. p.55-61, 2002.

WHO (World Health Organization). Copper. **Environmental Health Criteria 200**. Geneva: World Health Organization, 1998.

WINZERLING, J.; LAW, J. H. Comparative nutrition of iron and copper. **Annual Review of Nutrition**, v. 17, p.501-526, 1997.

WOODWARD, D. F.; FARAG, A. M. BERGMAN, H. L. Metals-contaminated benthic invertebrates in the Clark Fork River, Montana: effects on age-0 brown trout and rainbow trout. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 52, p.1994-2004, 1995.

WU, G. -S.; HUANG, C. -H. Estimation of dietary copper requirement of juvenile soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*. **Aquaculture**, v. 208, p.206-210, 2008.

YAMAMOTO, Y.; HAYAMA, K.; IKEDA, S. Effect of dietary ascorbic acid on copper poisoning in rainbow trout. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 47, p.1085-1089, 1981.

CAPÍTULO II

**Suplementação dietária de cobre no desempenho
produtivo da tilápia-do-Nilo e resposta hemática sob
estresse térmico**

Suplementação dietária de cobre no desempenho produtivo da tilápia-do-Nilo e resposta hemática sob estresse térmico

RESUMO – O mineral cobre é considerado essencial para peixes por ser componente de diversas enzimas e participar em importantes reações orgânicas. Entretanto, altos níveis deste mineral podem prejudicar a homeostase e causar sérios danos nos tecidos. Os efeitos de dietas contendo níveis crescentes de cobre no desempenho, respostas hematológicas, atividade da ceruloplasmina, histologia do fígado e resistência da tilápia-do-Nilo ao estresse térmico foram analisados, com o objetivo de avaliar as respostas fisiológicas sob condições de estresse e desempenho produtivo frente aos níveis de suplementação dietária de cobre. Duzentos e quarenta peixes (peso inicial $8,05 \pm 0,45$ g) foram, aleatoriamente, distribuídos em trinta aquários (250 L) e arraçoados com dietas práticas suplementadas com cinco níveis de $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4,0; 6,0; 8,0; 1000,0 e 1500 mg Cu.kg^{-1}) e uma dieta sem suplementação, pelo período experimental de cento e vinte dias. Ao fim do período experimental foi determinado o desempenho (ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, taxa de crescimento específico, taxa de retenção proteica e sobrevivência), e foram feitas análises histológicas dos fígados. Os parâmetros hematológicos e bioquímico (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, proteína plasmática total, albumina, globulina, relação albumina:globulina e atividade da ceruloplasmina) foram avaliados após o período experimental, e em seguida os peixes foram submetidos ao estresse térmico (32°C) por três dias e, posteriormente, determinados os mesmos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os dados de desempenho foram submetidos à técnica de análise de variância ($P < 0,05$), e os dados hematológicos foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis; e complementados com o teste de comparações de Mann-Whitney ($P < 0,05$). A toxicidade do cobre dietário prejudicou, significativamente, as variáveis de desempenho dos peixes arraçoados com dietas contendo 1000 e 1500 mg Cu.kg^{-1} , assim como ocasionou em alterações hematológicas após o período experimental. A ceruloplasmina apresentou aumento na atividade quando os peixes foram submetidos ao estresse térmico; entretanto esta proteína apresentou atividade oposta aos níveis de suplementação de cobre. Alterações histopatológicas foram observadas nos fígados dos peixes de todos os tratamentos, não sendo influenciadas pelos níveis de cobre. Altos níveis de cobre na dieta prejudicam o desempenho e a saúde; e a quantidade de cobre presente nos ingredientes de dietas práticas atende as exigências deste mineral da tilápia-do-Nilo.

Palavras chave: histologia, deficiência, toxidez, nutrição e saúde de peixes, *Oreochromis niloticus*

Levels of dietary copper on growth performance of Nile tilapia and haematological responses under heat stress

ABSTRACT - Copper is considered essential for fish for being component of several enzymes and to participate in important reactions of organism. However, high levels of this mineral can impair the homeostasis and cause serious damages on tissues. The effects of feeding diets containing graded levels of copper on growth performance, haematological response, activity of ceruloplasmin and histology of liver, and the resistance to a high temperature stress of Nile tilapia were analyzed, in order to evaluate the physiological responses under stress conditions and growth performance front the increasing levels of dietary supplementation of copper. Two hundred and forty juveniles of Nile tilapia (initial weight 8.05 g/fish) were randomly distribute in 30 250 L-aquaria and fed with five practical diets containing levels of $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4.0; 6.0; 8.0; 1000 and 1500 mg Cu.kg⁻¹ diet) and a diet without supplementation, for 120 days. At the end of experimental period growth performance (weigh gain, feed intake, feed conversion rate, specific growth rate, protein retention rate and survival) were calculated, and the liver of five fishes/treatment were collected to histological analyses. The haematological and biochemical parameters (red blood count, haematocrit, haemoglobin, mean corpuscular volume, mean corpuscular haemoglobin concentration, total plasmatic protein, albumin, globulin, albumin/globulin ratio and ceruloplasmin activity) were evaluated after the experimental period, and then the fishes were subjected to heat stress (32°C) for three days, after the same haematological parameters were evaluated. The data of growth performance were submitted to analysis of variance ($P < 0,05$). Haematological parameters were submitted to non-parametric test of Kruskal-Wallis; and complemented with comparasion test of Mann-Whitney ($P < 0,05$). The toxicity of dietary copper impaired significantly the growth performance of groups of fish fed with 1000 and 1500 mg Cu.kg⁻¹, as well influenced haematological after experimental period. Alterations on liver of fishes were observed in all treatments, thus levels of dietary copper did not influenced on alterations of liver. The ceruloplasmin showed higher activity after heat stress; however this protein showed opposite activity on copper supplementation. Therefore, the high levels of dietary copper impaired growth, and copper contained on ingredients of practical diets is enough to meet requirement of specie.

Key words: histology, deficiency, toxicity, nutrition and health, *Oreochromis niloticus*

1. Introdução

Os minerais são essenciais para o normal metabolismo do organismo dos animais, incluindo os peixes (WATANABE et al., 1997). Dentre os minerais, destaque deve ser dado ao cobre, nutriente essencial que possui diversas funções na bioquímica das células, com papel vital à respiração celular e como cofator de diversas enzimas (LINDER, 1991). Em decorrência da estreita relação com o ferro, o cobre participa indiretamente na eritropoiese, uma vez que por intermédio da ceruloplasmina (ou ferroxidase), proteína cobre dependente, o ferro é disponibilizado para ser carreado aos tecidos pela transferrina. De acordo com Harris (1997), esta proteína é a principal forma do cobre presente no plasma, sendo responsável pelo transporte de cobre para os tecidos extra-hepáticos.

Devido a importância deste mineral, sua exigência vem sendo reportada para algumas espécies de peixes entre 3 a 10 mg Cu.kg⁻¹, variando conforme a espécie, estágio de desenvolvimento e regime alimentar (CLEARWATER et al., 2002). Para tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) Shiao e Ning (2003) determinaram a exigência em 4 mg Cu.kg⁻¹ da dieta purificada, com base no ganho de peso e concentração de cobre na carcaça; resultado semelhante ao encontrado por Ferrari et al. (2004) para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Apesar da essencialidade do cobre, este se torna tóxico quando em elevados níveis na dieta ou, no caso de peixes, na água. O excesso deste mineral na dieta acarreta, primeiramente, a formação de radicais livres nos tecidos onde é acumulado, podendo causar severas lesões no intestino, fígado, rins, brânquias e cérebro, comprometendo a saúde e o desenvolvimento do animal.

As lesões causadas pelo excesso de cobre na dieta foram reportadas por Shaw e Handy (2006), que observaram alterações na morfologia dos fígados, tais como pequenos focos de hemorragia, aumento no teor de lipídeos nos hepatócitos e, concomitante, diminuição do espaço sinusoidal em tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas contendo 2000 mg Cu.kg⁻¹ dieta.

Devido à alta toxicidade deste mineral ao organismo, pesquisas relataram seus efeitos tóxicos na dieta de peixes (BERNETSSEN et al., 1999; CLEARWATER et al., 2002; NUSSEY et al., 1995; ROESIJADI e ROBINSON, 1994). Entretanto, não há na literatura trabalhos que avaliem os efeitos da toxicidade por cobre em peixes submetidos a fatores estressores. Em sistemas de produção, os peixes são, constantemente, submetidos à estresse, sejam estes provenientes do manejo ou intrínsecos ao ambiente. Dentre estes fatores, a temperatura da água é considerada a mais importante na indução ao estresse, uma vez que, quando inapropriada para a espécie, tende a afetar, diretamente, o desempenho e a saúde dos peixes. Em situações estressantes os animais redirecionam a energia, que seria utilizada para o crescimento e reprodução, para a manutenção da homeostase, tornando-os mais susceptíveis à doenças. Portanto, a formulação de dietas que atendam as exigências dos peixes, visando também a saúde, é ferramenta importante para tornar tais animais aptos a enfrentar situações estressantes, visando à higidez.

Desta forma, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos de deficiência e toxicidade por cobre para juvenis de tilápia-do-Nilo submetidos ao estresse por calor nos parâmetros de desempenho, hematológicos e bioquímicos; e avaliar os efeitos do excesso deste mineral no tecido hepático.

2. Material e Métodos

2.1. Dietas Experimentais

A pesquisa foi realizada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Univ. Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado composto por seis tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos consistiam em ausência de suplementação de cobre (controle negativo), três níveis próximos a exigência para crescimento e duas super dosagens (FERRARI et al., 2004). Considerando-se que a fonte

inorgânica utilizada, sulfato de cobre pentahidratado ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), possui em sua composição 25,01% de cobre, as dietas que constituíram os tratamentos foram:

0 Cu (controle) = dieta ausente da suplementação de sulfato de cobre pentahidratado;

4 Cu = dieta suplementada com $4,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ da dieta sulfato de cobre pentahidratado;

6 Cu = dieta suplementada com $6,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ da dieta sulfato de cobre pentahidratado;

8 Cu = dieta suplementada com $8,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ da dieta sulfato de cobre pentahidratado;

1000 Cu = dieta suplementada com $1000,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ da dieta sulfato de cobre pentahidratado;

1500 Cu = dieta suplementada com $1500,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ da dieta sulfato de cobre pentahidratado.

As dietas foram formuladas de forma a serem isoproteicas e isoenergéticas, contendo $26,81 \text{ g kg}^{-1}$ de proteína digestível e $3036 \text{ kcal kg}^{-1}$ de energia digestível, de acordo com o recomendado para espécie por Furuya et al. (2010), e foram balanceadas de acordo com os valores de energia digestível, proteína e aminoácidos digestíveis e fósforo disponível determinados por Pezzato et al. (2002), Boscolo et al. (2002), Guimarães et al. (2008) e Gonçalves et al. (2009). Foi utilizado suplemento vitamínico e mineral isento de cobre. A inclusão dos níveis de sulfato de cobre pentahidratado foi feita em substituição ao milho (Tabela 1).

Previamente à extrusão, os ingredientes foram moídos (peneira com diâmetro de 0,70 mm) e submetidos à peneira Tyler-35 para que apresentassem diâmetro inferior a 0,7 mm; e os micro-ingredientes foram, previamente, misturados com o milho em moinho tipo Y. As dietas foram submetidas ao processo de extrusão em equipamento de rosca simples, obtendo-se péletes com diâmetro geométrico médio (DGM) aproximado de 3,0 mm. Posteriormente a extrusão, as rações foram secas em estufa de ventilação forçada, a temperatura de 55°C por 24h, e armazenadas à temperatura de 5°C .

2.2. Desempenho Produtivo

Os alevinos machos (invertidos sexualmente) de tilápia-do-Nilo, da linhagem Supreme, foram obtidos da piscicultura Fernandes (Palmital/SP). Após a chegada no laboratório, os peixes permaneceram em sistema de quarentena durante quinze dias, e foram alimentados com a dieta prática isenta de suplementação de cobre.

O desempenho produtivo foi avaliado em decorrência de níveis de suplementação de cobre. Grupos de oito peixes/aquário, com peso médio inicial de $8,05 \pm 0,45$ g foram, aleatoriamente, distribuídos numa estrutura experimental de 30 aquários com capacidade de 250 L. Os peixes foram mantidos em sistema de recirculação e filtragem de água por meio de biofiltro e sistema de aquecimento, controlado por termostato mantendo temperatura de conforto para a espécie ($26,3 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$).

Os peixes foram alimentados *ad libitum* quatro vezes ao dia, nos horários 8:00, 11:00, 14:00 e 17:00h e, semanalmente, foi avaliado o consumo de ração. Ao início e final do período experimental, 120 dias, os peixes foram pesados em balança digital (0,01g), para determinação do ganho de peso. Posteriormente foram calculados oito índices de desempenho zootécnico: PMI (g/peixe), peso médio inicial; PMF (g/peixe), peso médio final; GMP (g/peixe) = PMF – PMI, ganho médio de peso; CR (g/peixe), consumo de ração; CA (ganho:consumo) = (GMP/CR), conversão alimentar; TCE (%/dia) = $(100 \times (\ln(\text{PMF}) - \ln(\text{PMI}))/\text{dias})$, taxa de crescimento específico; TRP (% ingestão de nitrogênio (IN)) = $((\text{PMF} \times \text{N carcaça final})/100 - (\text{PMI} \times \text{N carcaça inicial})/100)/\text{ingestão de proteína} \times 100$, taxa de retenção proteica e SOB (%), porcentagem de sobrevivência.

2.3. Análises histolópáticas

Ao final do desempenho produtivo foram coletados cinco peixes/tratamento, os quais foram sedados em solução anestésica (benzocaína, 1g/15L de água) até completa dessensibilização e óbito. Em seguida, foram coletados o fígado dos animais de cada tratamento, que foram fixados em solução tamponada de formol a 10%, e processados para

inclusão em parafina. Foram confeccionados cortes histológicos em micrótomo rotativo em 5µm e corados por Hematoxilina e Eosina (HE). Foi realizada análise descritiva das alterações histopatológicas observadas no tecido hepáticos para os diferentes tratamentos.

2.4. Estresse por calor

Após o desempenho produtivo foram coletadas amostras de sangue de oito peixes/tratamento para avaliação do perfil hematológico e da atividade oxidativa da ceruloplasmina sérica. Após esta análise hematológica preliminar ao estresse, os animais restantes foram submetidos ao estresse pelo calor. Para isto foi efetuado o aumento gradual da temperatura até atingir 32,0°C, para que ocorresse a diminuição da concentração e saturação de oxigênio, atingindo 2,3 mg L⁻¹ e 20%, respectivamente. Ao final de três dias foram avaliados os mesmos parâmetros hematológicos iniciais de oito peixes/tratamento, sendo mantido o mesmo arraçoamento efetuado para o estudo do desempenho produtivo. Durante este período foi avaliado, diariamente, a concentração de oxigênio dissolvido na água (YSI®).

2.5. Hematologia

Os parâmetros hematológicos foram avaliados na condição de ausência e sob estresse térmico. No momento anterior ao estresse, último dia após o desempenho produtivo, oito peixes/tratamento foram anestesiados (benzocaína, 1g/15 L de água) e, após estarem sedados, foi realizada coleta de sangue por punção da veia caudal, com seringa de 1,0 mL internamente umedecida de EDTA a 3,0%.

Os parâmetros hematológicos foram avaliadas utilizando-se as técnicas descritas por Jain (1986). A contagem do número de eritrócitos foi realizada pelo método do hemocítômetro em câmara de Neubauer, utilizando-se Azul de Toluidina Merck® a 0,01% diluído em solução fisiológica 0,9% em pipeta de Thoma, na proporção 1:200. A taxa de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se kit

comercial Hemoglobina Analisa Diagnóstica[®] para determinação colorimétrica. O hematócrito foi obtido utilizando-se o método do microhematócrito. A partir destes resultados, foram determinados os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), úteis na classificação morfológica das anemias e avaliação da resposta eritropoiética.

A proteína plasmática total (PPT) foi mensurada por meio 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. A quantidade de albumina foi determinada pelo método do verde de bromocresol utilizando-se kit comercial Albumina Analisa Diagnóstica[®] para determinação colorimétrica. De posse dos resultados de albumina e proteína plasmática total foi determinado a quantidade de globulina plasmática por diferença.

2.6. Análise enzimática

A atividade oxidativa da ceruloplasmina sérica foi quantificada no soro dos peixes nas condições de ausência e sob estresse térmico. Para isto, foi utilizado a o-dianisidina como substrato do meio reacional que recebeu como fonte da enzima uma alíquota do soro coletado. Por meio de medições no decorrer de tempo específico por espectofotometria visível, determinou-se a formação do composto específico resultante da reação da enzima com o substrato, pelo método adaptado de Schoslnsky et al. (1974).

2.7. Análise Estatística

Os resultados de desempenho produtivo foram avaliados utilizando-se a técnica de análise de variância (ANOVA) para o modelo de comparações múltiplas de Tukey (ZAR, 2009), considerando o nível de 5% de significância. Os dados hematológicos foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis; e complementados com o teste de

comparações de Mann-Whitney, ao nível de 5%. As análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico Minitab® 16.1.1.0 (Minitab Inc. 2010). A atividade da ceruloplasmina sérica foi submetida a análise descritiva, devido ao número de repetições.

3. Resultados

Os resultados de peso inicial, peso final, ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, taxa de retenção proteica, taxa de crescimento específico e sobrevivência estão apresentados na Tabela 2. A suplementação de 1000 e 1500 mg Cu.kg⁻¹, influenciaram negativamente o ganho médio de peso, além disto houve também menor consumo de ração e taxa de crescimento específico dos animais arraçoados com dietas suplementadas com 1000 e 1500 mg Cu kg⁻¹ da dieta. Os peixes que receberam 0, 4, 6 e 8 mg Cu kg⁻¹ na dieta não apresentaram diferenças significativas nas variáveis de desempenho produtivo. A taxa de sobrevivência não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos.

As medianas da contagem de eritrócitos, taxa de hemoglobina, porcentagem de hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, proteína plasmática total, albumina, globulina de tilápia-do-Nilo apresentaram alterações significativas nos peixes arraçoados com 1000 e 1500 mg Cu kg⁻¹ ($p < 0,05$), como mostram as Tabelas 3 e 4. O estresse térmico influenciou os parâmetros proteína plasmática total, albumina e globulina ($p < 0,05$), Tabela 4. Não foram observadas diferenças significativas nas medianas das contagens de linfócitos, neutrófilos e monócitos, entre os diferentes níveis de suplementação de cobre, sem e com estresse térmico, Tabela 5.

A atividade da ceruloplasmina sérica está apresentada na Tabela 6. Observou-se que a enzima teve maior atividade quando os animais foram submetidos ao estresse pelo calor; e que os animais que receberam dietas ausentes de suplementação de cobre apresentaram maior atividade da ceruloplasmina sérica quando submetidos ao estresse pelo calor.

As análises histopatológicas mostraram incidência de degeneração hidrópica difusa, degeneração glicogênica, lipidose hepática e focos de necrose nos fígados dos peixes de todos os tratamentos, Figura 1.

4. Discussão

Níveis elevados de cobre na ração determinaram prejuízo no desempenho produtivo, podendo ser este quadro de toxidez após quatro meses de exposição dietária de cobre. Alguns autores atribuem a redução no desempenho devido ao menor consumo da ração com elevados níveis de cobre (GATLIN III e WILSON, 1986; LANNO et al., 1987; BERNETSEN et al., 1999; KIM e KANG, 2004; SHAW e HANDY, 2006).

Houve pronunciada recusa da dieta pelos peixes que receberam dietas suplementadas com 1000 e 1500 mg Cu.kg⁻¹, os quais abocanhavam os péletes e em seguida expeliam-os, ou simplesmente não ingeriam. Este comportamento também foi observado em truta arco-íris (LANNO et al., 1985) e em tainhas (*Chelon lanbrosus*) (BAKER et al., 1998). Baker et al. (1998) atribuíram este comportamento à ação pró-oxidante do cobre dietário, que ocasionou a peroxidação lipídica da dieta e, conseqüentemente, diminuiu sua palatabilidade. Outro fator que pode ser atribuído à recusa da dieta contendo altos níveis de cobre foi reportado por Araya et al. (2002) que afirmaram que a toxicidade aguda de cobre em muitas espécies, incluindo os humanos, resulta em náusea e vômitos, em decorrência dos íons de cobre estimularem os receptores do nervo vago.

Além de interferir no consumo da dieta a toxicidade do cobre dietário pode ocasionar severas alterações intestinais, inibição das enzimas digestivas, redução da motilidade do intestino (BURY et al., 2003) e aumento de proliferação celular e apoptose (ROBERTS, 1989). Isto ocorre devido ao intestino ser o principal sítio de absorção de cobre nos peixes, sendo os enterócitos responsáveis pela regulação da taxa de absorção dos minerais. Autores atribuem estas alterações como sendo responsáveis por prejudicar o desempenho dos peixes (LUNDEBYE et al., 1999). Neste sentido, pode-se inferir que o menor ganho de peso e menor taxa de crescimento específico dos animais arraçados com

níveis 1000 e 1500 Cu. kg⁻¹ da dieta pode ser devido às alterações intestinais causadas pelo excesso do mineral.

Não observou-se sinais de deficiência nos peixes, isto pode ser explicado pelo fato dos ingredientes da dieta, possivelmente, suprirem a exigência de cobre. De acordo com Clearwater et al. (2002) dietas práticas contém fontes proteicas que podem conter ácidos graxos e outros minerais, que dificultam a interpretação de estudos. Segundo Lall (2002), o cobre é amplamente distribuído no ambiente aquático e está presente nos alimentos, entretanto sua deficiência pode ocorrer sob condições extremas.

A taxa de sobrevivência dos animais não foi influenciada pelos tratamentos, contudo as mortalidades observadas no decorrer do experimento foram em decorrência de confrontos agonísticos, muito comuns em espécies territorialistas como a tilápia-do-Nilo. Entretanto, os peixes que receberam a dieta suplementada com 1500 mg Cu.kg⁻¹ não resistiram ao estresse pelo calor e, devido a debilidade causada pela toxicidade do cobre não foi possível determinar os parâmetros hematológicos e a atividade da ceruloplasmina sérica destes animais.

A análise hematológica é importante ferramenta para avaliar a influência da nutrição no estado de saúde dos peixes (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004). Isto pode ser observado nos peixes arraçados com 1500 mg Cu.kg⁻¹ na dieta, que não mantiveram a eritropoiese. Estes animais apresentaram diferenças significativas no número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito; valores que estão abaixo da faixa de normalidade para tilápias sadias de acordo com Hrubec e Smith (2010), e por Teixeira et al. (2012), Barros et al. (2009), Falcon et al. (2007). Com base nestes parâmetros pode-se inferir que 1500 mg Cu.kg⁻¹ ocasionou anemia microcítica e hipocrômica nos peixes, e isto também pode ser observado pelos baixos valores de VCM e CHCM, mesmo de forma não significativa. Este tipo de anemia é caracterizada por apresentar células de menor volume (microcítica) e baixa concentração de hemoglobina (hipocrômica).

Este quadro pode ter sido ocasionado pela competição por sítios de absorção nas membranas dos enterócitos pelos metais bivalentes. No presente estudo, o excesso de cobre na dieta pode ter prejudicado a absorção de ferro ocasionando deficiência em ferro no organismo e, consequentemente, o desenvolvimento do quadro de anemia.

Estes resultados corroboram Murai et al. (1981) que notaram significativa diminuição no número de eritrócitos e porcentagem de hematócrito para os peixes que receberam dietas suplementadas com níveis acima da exigência para o catfish (*Ictalurus punctatus*); e contradizem os resultados encontrados por Lanno et al. (1985), Ferrari et al. (2004), Gatlin III e Wilson (1986), Handy et al. (1999), Kin e Kang (2004) e Shaw e Handy (2006), os quais não observaram alterações no perfil hematológico dos peixes alimentados com dietas suplementadas com altos níveis de cobre.

Os animais arraçados com 0,0; 4,0; 6,0 e 8,0 Cu.kg⁻¹ na dieta apresentaram os parâmetros hematológicos mantidos dentro da faixa de normalidade para peixes sadios (HRUBEC E SMITH, 2010; TEIXEIRA et al., 2012; BARROS et al., 2009; FALCON et al., 2007) para a mesma espécie nas mesmas condições.

A proteína plasmática total compreende a fração albumina e globulina no sangue. Sendo a primeira mais abundante e responsável pelo transporte de nutrientes e manutenção do equilíbrio osmótico, e a fração globulina está envolvida nos mecanismos de defesa dos animais (THOMAS, 2000). Altos níveis de cobre na dieta também causaram, ainda, diminuição nas variáveis proteína plasmática total e globulina, ressaltando em possível efeito tóxico. Pode-se inferir que a toxicidade foi severa debilitando o sistema de defesa dos peixes. A alta mortalidade dos peixes arraçados com dietas suplementadas com 1500 mg Cu.kg⁻¹ e a diminuição da globulina dos peixes arraçados com a dieta isenta de suplementação quando submetidos ao estresse térmico, suporta esta hipótese. No entanto, seria necessária a análise da fração globulina (α , β e γ -globulinas) para avaliar qual tipo que foi afetado, devido aos altos níveis de suplementação de cobre e ao estresse por temperatura.

Outro efeito do estresse térmico foi observado no aumento significativo da albumina e na relação albumina:globulina, dos animais arraçados com 8 mg Cu.kg⁻¹ na dieta. Isto pode ter sido causado pela tentativa do organismo dos peixes em manter a homeostase, uma vez que em situações estressantes o organismo redireciona a utilização das reservas para manter a homeostase.

Outro efeito do estresse observado foi a diminuição da globulina dos peixes arraçados com a dieta isenta de suplementação de cobre. Isto pode ser devido ao estresse exercer efeito depressivo sobre as respostas imunológicas dos peixes.

Além de causar estresse, o aumento da temperatura da água acarreta a diminuição do oxigênio dissolvido na água (BOYD, 1996). Nesta condição o organismo sintetiza mais hemoglobina buscando enfrentar situação de hipóxia. No presente estudo foram observados aumento da taxa de hemoglobina, após os peixes serem submetidos ao estresse térmico, porém não de forma significativa.

A variação da temperatura da água é considerada um importante fator de indução ao estresse e, conseqüentemente, debilita o sistema de defesa (TEIXEIRA et al., 2012), no entanto os leucócitos não apresentaram diferenças significativas quando os animais foram submetidos ao estresse térmico, assim como não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de suplementação de cobre, mesmo nos peixes arraçados com níveis muito aquém da exigência.

A atividade da ceruloplasmina sérica apresentou-se oposta à suplementação de cobre pois quando os animais foram submetidos ao estresse a maior atividade da proteína foi verificada nos peixes que receberam dietas ausentes de suplementação de cobre. No intuito de evidenciar estes resultados foi calculado o índice relativo de comparação (IRC %), sendo atribuído a média da atividade da ceruloplasmina (41,74 U/L) para os animais que receberam dietas próximas a exigência de cobre o índice de 100%. Assim, os animais arraçados com dietas ausente de suplementação de cobre apresentaram maior atividade da ceruloplasmina sérica (+20,53%), quando submetidos ao estresse térmico; e aqueles que receberam dietas com 1000 mg Cu.kg⁻¹ apresentaram menor atividade da ceruloplasmina (-7,91%), quando submetidos ao estresse.

Isto evidencia o fato de que o cobre presente nos ingredientes foi suficiente para o metabolismo normal da tilápia. O excedente do mineral influenciou, negativamente, a atividade da enzima, pois pode ter competido por sítios de ligação com outros minerais da ceruloplasmina, e isto pode ter desestabilizado a estrutura terciária da proteína. Segundo Fedeli et al. (2010), os íons de cobre e seus complexos podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio que podem danificar lipídeos e proteínas.

Níveis aquém da exigência da garoupa resultaram em baixas atividades plasmáticas da ceruloplasmina quando a oferta de cobre estava abaixo ou acima da exigência da garoupa, indicando efeito grave de inibição da enzima, quando este mineral na dieta não atende as exigências da espécie (LIN et al., 2008). Contrariamente ao presente trabalho, Lin et al. (2008) utilizaram dieta semi-purificada para garoupas, havendo nessa dieta cobre apenas da suplementação.

Alterações histopatológicas foram observadas nos fígado dos peixes. No entanto, estas alterações foram encontradas para todos os tratamentos podendo-se inferir que estas alterações não foram decorrentes dos níveis de cobre na dieta. Dentre as alterações observadas estão degeneração hidrópica difusa, lipidose hepática, degeneração glicogênica e áreas de necrose.

Degenerações celulares ocorrem quando há acúmulo de substâncias químicas no interior da célula, classificadas de acordo com o tipo de substância acumulada (água, proteína, glicose ou gordura). Este dano celular é reversível, no entanto prejudica as funções celulares, diminuindo o metabolismo normal da célula; também podem ocorrer necroses celulares, este tipo de dano é irreversível caracterizado pela morte celular.

A degeneração hidrópica difusa, caracterizada pelo acúmulo de água e eletrólitos no interior da célula, é um tipo de degeneração reversível e ocorre quando há danos nas membranas celulares em decorrência do desequilíbrio do controle osmótico. De acordo com Miranda e Santos (2008), este tipo de degeneração é comum quando os animais estão em estresse resultando do excesso de cortisol. Este tipo de degeneração foi encontrada nos fígados dos peixes de todos os tratamentos, podendo-se inferir ser este quadro resultado de constantes confrontos agonísticos.

A dieta também pode ter sido responsável por desencadear alterações nos fígados dos peixes de todos os tratamentos. Estes apresentaram lipidose hepática e degeneração glicogênica, que são caracterizados pelo depósito de lipídeos e glicogênio nos hepatócitos, respectivamente. Estas alterações são reversíveis e ocorrem quando há excesso de carboidratos na dieta. As dietas utilizadas no presente estudo foram extrudadas. Para que este tipo de processamento ocorra é necessário que a dieta contenha quantidade considerável de amido para o processo de extrusão. Em decorrência disto, no presente

estudo, as dietas foram formuladas para conter 30% de amido. Portanto, pode-se inferir que a maior quantidade de carboidratos presente nas dietas atenderam a exigência em energia para a tilápia-do-Nilo, e o excedente foi estocado na forma de gordura e glicogênio no tecido hepático. Esta hipótese suscita novos estudos para que se possa melhor entender a utilização do amido pela tilápia-do-Nilo.

5. Conclusão

Considerando-se o desempenho, higidez, atividade da ceruloplasmina dos peixes conclui-se que os níveis de cobre próximos à exigência são suficientes para o crescimento e saúde dos peixes, mesmo sob condições de estresse, e que o excesso deste mineral na dieta compromete o crescimento e a saúde da tilápia do Nilo.

6. Referências Bibliográficas

- Araya, M., Gonzalez, M., Olivares, M., Uauy, R., 2002. Biological effects of chronic copper exposure, in: Massaro, E.J. (Eds.), Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology, ed. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 385-396.
- Baker, R.T.M., Handy, R.D., Davies, S.J., Snook, J.C., 1998. Chronic dietary exposure to copper affects growth, tissue lipid peroxidation, and metal composition of the grey mullet, *Chelon labrosus*. Marine Environmental Research 45, 357-365.
- Barros, M.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Pezzato, L.E., Falcon, D.R., Guimarães, I.G., 2009. Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed diets containing folic acid. Aquaculture Research 40, 895-903.
- Berntssen, M.H.G., Hylland, K., Wendelaar Bonga, S.E., Maage, A., 1999. Toxic levels of dietary copper in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. Aquatic Toxicology 46, p.87-99.

Boscolo, W.R., Hayashi, C., Meurer, F., 2002. Apparent digestibility of the energy and nutrients of conventional and alternatives foods for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Revista Brasileira de Zootecnia 31, 539-545.

Boyd, C.E., 1996. Water Quality in Ponds for Aquaculture. Shrimp Mart (Thai) Co. Ltd. Hatyai, Songkhla, Thailand. 482p.

Bury, N.R., Walker P. A., Glover, C. N., 2003. Review Nutritive metal uptake in teleost fish. The Journal of Experimental Biology 206, 11-23.

Clearwater, S.J., Farag, A.M., Meyer, J.S., 2002. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. Comparative Biochemistry and Physiology, 132C, 269-313.

Falcon, D.R., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Sampaio, F.G., Hisano, H., 2007. Physiological Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Fed Vitamin C- and Lipid-Supplemented Diets and Submitted to Low-Temperature Stress. Journal of the World Aquaculture society 38, 287-295.

Fedeli, D., Carloni, M., Falcioni, G., 2010. Oxidative damage in trout erythrocyte in response to “in vitro” copper exposure. Marine Environmental Research 69, 172-177.

Ferrari, J.E.C., Barros, M.M., Pezzato, L.E., Gonçalves, G.S., Hisano, H., Kleeman, G. K., 2004. Níveis de cobre em dietas para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Acta Scientiarum. Animal Sciences Maringá, 26, no. 4, 429-436.

Furuya, W.M., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Boscolo, W.R., Cyrino, J.E.P., Furuya, V.R.B., Feiden, A., 2010. Tabelas brasileiras de nutrição de tilápias. GFM, Gráfica & Editora. Toledo.

Gatlin III, D.M.; Wilson, R.P., 1986. Dietary copper requirement of fingerling channel catfish. *Aquaculture* 54, 277-285.

Gonçalves, G.S., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Rocha, D.R., Kleemann, G.K., Santa Rosa, M.J., 2009. Digestible nutrients of Nile tilapia feed. *Boletim do Instituto de Pesca* 35, 201-213.

Guimarães, I.G., Pezzato, L.E., Barros, M.M., Tachibana, L., 2008b. Nutrient digestibility of several grain products and by-products in extruded diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the Aquaculture Society* 39, 781-789.

Handy, R.D., Sims, D.W., Giles, A., Campbell, H.A., Musonda, M.M., 1999. Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquatic Toxicology* 47, 23-41.

Harris, E.D., 1997. Copper, in: O'Dell B.L., Sunde R.A. (Eds.) *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements*. Marcel Dekker, New York. pp. 231–273.

Hrubec, T.C., Smith, S.A., 2010. Hematology of fishes, in: Weiss, D.J., Wardrop, K.J. (Eds.) *Schalm's veterinary hematology*. 6 ed. Blackwell Publishing Ltd., pp. 994-1003.

Jain, N.C., 1986. *Schalm's veterinary haematology*. 4 ed. Lea e Febiger, Philadelphia.

Kim, S.-G., Kang, J.-C., 2004. Effects of dietary copper exposure on accumulation, growth and hematological parameters of the juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Marine Environmental Research* 58, 65-82.

Lall, S.P., 2002. The Minerals, in: Halver, J.E., Hardy, R.W. Fish Nutrition. 3 ed. Academic Press, San Diego. pp. 289-290.

Lanno, R.P., Slinger, S.J., Hilton, J.W., 1985. Maximum tolerable and toxicity levels of dietary copper in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Aquaculture 49, 275-268.

Lanno, R.P., Hicks, B., Hilton, J.W., 1987. Histological observations on intrahepatocytic copper-containing granules in rainbow trout reared on diets containing elevated levels of copper. Aquatic Toxicology 10, 251-263.

Lin, Y.-H., Shie, Y.-Y., Shiau, S.-Y., 2008. Dietary copper requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture 274, 161-165.

Linder, M.C., 1991. Biochemistry of Copper. Plenum Press, New York, 544p.

Lundebye, A.K., BERNTSEN, M.H.G., WENDELAAR BONGA, S.E., MAAGE, A., 1999. Biochemical and physiological responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following dietary exposure to copper and cadmium. Marine Pollution Bulletin 39, 137-144.

MINITAB, INC: Minitab: Data analysis software, release 16.1.1.0., 2010. State College, Pa, Minitab Inc.

Miranda, P.C., Santos, P.C.G. dos., 2008. Degeneração hidrópica. Revista Científica Eletrônica da Medicina Veterinária 10.

Murai, T., Andrews, J.W., Smith Jr, R.G., 1981. Effects of dietary copper on channel catfish. Aquaculture 22, 353-357.

Nussey, G., Van Vuren, J.H.J., Preez, H.H., 1995. Effect of copper the hematology and osmoregulation of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). Comparative Biochemistry and Physiology, v. 111C, p.369-380.

Pezzato, L.E., Miranda, E.C., Barros, M.M., Pinto, L.G.Q., Furuya, W.M., Pezzato, A.C., 2002. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Revista Brasileira de Zootecnia 31, 1595-1604.

Ranzani-Paiva, M.J., Silva-Souza, A.T., 2004. Hematologia de Peixes Brasileiros, in: Ranzani-Paiva, M.J., Takemoto, R.M., Lizama, M.A.P. (Eds.) Sanidade de Organismos Aquáticos. Varela Publishing, São Paulo. pp. 89-120.

Roberts, R.J., 1989. The pathophysiology and pathology of teleosts, in: Roberts, R.J. Fish Pathology, 2 ed. Baillière Tindal, London. pp. 89-90.

Roesijadi, C.; Robinson, W., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release, in: Malins, D.C.; Ostrander, G.K. Aquatic toxicology molecular, biochemical and cellular perspectives. Boca Raton: CRC Press, p.387-420.

Schosinsky, K.H., Lehmann, H.P., Beeler, M.F., 1974. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dionisidine dihydrochloride. Clinical Chemistry 20, 1556-1563.

Shaw, B.J., Handy, R. D., 2006. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquatic Toxicology 76, 111-121.

Shiau, S.Y., Ning, Y.C., 2003. Estimation of dietary copper requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. Animal Science. 77, 287-279.

Teixeira, C.P.; Barros, M.M.; Pezzato, L.E.; Fernandes Júnior, A.C.; Koch, J.F.; Padovani, C. R., 2012. Growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fed diets containing levels of pyridoxine and haematological response under heat stress. *Aquaculture Research* 43, 1081-1088.

Thomas, J.S., 2000. Overview of plasma proteins, in: Feldman, B. F. et al., *Shalm's veterinary hematology*, Philadelphia: Lippincott, p.891-898.

Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S., 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151, 185-207.

Zar, J.H., 2009. *Biostatistical analysis*. 5 ed. Prentice Hall, New Jersey.

TABELAS

Tabela 1. Composição percentual e químico bromatológicas calculada das dietas experimentais.

Ingredientes (%)	0 mg Cu	4 mg Cu	6 mg Cu	8 mg Cu	1000 mg Cu	1500 mg Cu
Far. Soja	46,25	46,25	46,25	46,25	46,36	46,41
Glúten Milho	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Milho	38,03	38,02	38,02	38,02	37,17	36,75
Far. Trigo	6,89	6,89	6,89	6,89	7,02	7,09
Óleo Soja	0,09	0,09	0,09	0,09	0,30	0,41
Lisina	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Metionina	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
Treonina	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Triptofano	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Fosfato bicálcico	1,99	1,99	1,99	1,99	1,99	1,99
Vitamina C ¹	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Premix Vit/Min ²	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
BHT ³	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Sal	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Sulfato de Cobre ⁴	0,00000	0,0016	0,0024	0,0032	0,4000	0,6000
ED (kcal) ⁵	3036	3036	3036	3036	3036	3036
PB (%) ⁶	29,59	28,65	28,28	29,71	28,98	28,42
EE (%)	4,97	5,75	5,94	5,08	4,37	4,54
MM (%)	5,32	5,12	5,17	5,23	5,63	5,68
FB (%) ⁷	3,57	3,46	3,58	3,78	5,17	4,21
MS (%)	93,39	93,55	93,62	93,38	93,90	93,12
Lys (%)	1,53	1,53	1,53	1,53	1,53	1,53
Met (%)	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52
Thr (%)	1,18	1,18	1,18	1,18	1,18	1,18
Trp (%)	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
Ca (%) ⁸	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
P Disp (%) ⁹	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51

¹ Vitamina C Rovimix® Stay-35®, DSM Nutritional Products, Suíça; ² Suplemento mineral e vitamínico (kg de produto): Vit. A = 1.200.000 UI; vit. D3 = 200.000 UI; vit. E = 12.000mg; vit. K3 = 2.400 mg; vit.B1= 4.800 mg; vit. B2 = 4.800 mg; vit. B6 = 4.000 mg; vit. B12 = 4.800 mg; ác. Fólico = 1.200mg; pantotenato de cálcio = 12.000 mg; vit. C = 48.000 mg; biotina= 48 mg; colina = 65.000 mg; ácido nicotínico= 24.000 mg; Mn= 4.000 mg; Zn= 6.000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg e Se = 20 mg; ³ B-hidroxi tolueno – antioxidante; ⁴ Sulfato de cobre = 25,01% de Cu; ⁵ Energia digestível (mg.kg⁻¹); ⁶ Proteína digestível (mg.kg⁻¹); ⁷ Fibra bruta (%); ⁸ Cálcio total (%); ⁹ Fósforo Disponível.

Tabela 2. Valores médios de peso inicial (PMI), peso final (PMF), ganho de peso (GMP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), taxa de crescimento específico (TCE), taxa de retenção proteica (TRP) e sobrevivência (SOB) da tilápia-do-Nilo arraçadas com níveis de inclusão de cobre (Cu) durante 120 dias.

Cu (mg.kg ⁻¹)	Variável							
	PMI (g)	PMF (g)	GMP (g)	CR (g)	CAA	TCE (%)	TRP (%)	Sob (%)
0	8,01 ± 0,51	139,12 ± 33,69 a	131,12 ± 33,24 a	188,16 ± 36,89 a	1,26 ± 0,06	2,36 ± 0,17 a	35,42 ± 1,49	82,5 ± 11,2
4	8,10 ± 0,50	130,44 ± 18,18 a	122,34 ± 18,33 a	184,92 ± 36,35 a	1,35 ± 0,05	2,31 ± 0,13 a	36,85 ± 2,94	87,5 ± 8,8
6	8,38 ± 0,23	147,02 ± 34,89 a	138,64 ± 34,70 a	234,83 ± 60,34 a	1,31 ± 0,04	2,37 ± 0,18 a	32,09 ± 5,86	72,5 ± 16,3
8	8,41 ± 0,38	132,27 ± 50,63 a	123,86 ± 50,34 a	236,17 ± 23,09 a	1,53 ± 0,27	2,24 ± 0,32 a	27,72 ± 13,31	72,5 ± 25,6
1000	8,42 ± 0,13	67,92 ± 12,91 b	59,49 ± 13,03 bc	95,62 ± 21,43 b	1,38 ± 0,13	1,73 ± 0,17 bc	35,23 ± 7,98	82,5 ± 16,8
1500	7,76 ± 0,30	47,02 ± 12,72 b	39,27 ± 12,74 c	85,91 ± 29,78 b	1,55 ± 0,29	1,48 ± 0,22 c	26,69 ± 9,13	67,5 ± 19,0
P	0,05	0,01	0,001	0,001	0,05	0,001	0,05	0,05

Médias seguidas de letras distintas, minúsculas nas colunas, diferem (P<0,05) entre si, pelo teste de Tukey.

Tabela 3. Medianas e valores mínimos e máximos 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 arraçoados com níveis de inclusão de cobre (Cu) durante 120 dias, sem e com estresse térmico.

Cu (mg.kg ⁻¹)	Erit (10 ⁶ /μL)		Hemoglobina (g dL ⁻¹)		Hematócrito (%)		VCM (fL)		CHCM (%)	
	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse
0	2,07 a (1,83-2,24)	1,93 (1,73-2,13)	6,74 ab (6,03-7,50)	7,33 (5,95-8,09)	26,50 ab (23,30-29,30)	26,35 (20,5-32,0)	130,4 (117,71-138,79)	128,0 (111,41-150,23)	33,92 (29,15-37,02)	37,36 (32,2-39,48)
4	2,04 ab (1,85 -2,13)	2,10 (1,82-2,22)	7,28 a (6,45-7,61)	7,48 (6,68-7,86)	27,70 a (25,20-28,0)	27,25 (25,2-30,5)	145,2 (128,11-140,61)	137,1 (119,66-145,60)	36,79 (33,0-37,55)	37,41 (33,59-38,37)
6	1,99 ab (1,88 -2,16)	2,06 (1,76-2,14)	6,48 ab (5,98-7,50)	7,58 (7,33-7,63)	25,00 ab (23,0-28,0)	28,60 (26,2-29,5)	142,1 (113,52-142,11)	130,2 (131,94-146,04)	33,75 (30,82-36,9)	36,32 (35,39-36,73)
8	1,96 abc (1,78 -2,19)	2,02 (1,74-2,14)	6,96 ab (6,27-7,06)	7,94 (7,02-9,05)	26,95 a (21,7-28,0)	30,60 (24,0-34,2)	150,3 (116,44-141,33)	134,5 (135,06-159,81)	34,58 (31,14-36,02)	38,73 (36,44-42,43)
1000	1,83 bc (1,83-2,00)	1,77 (1,68-1,77)	6,63 bc (5,00-6,87)	6,68 (6,26-6,95)	22,20 bc (16,50-26,0)	23,85 (20,7-24,5)	138,3 (115,39-137,89)	127,0 (111,89-138,42)	35,49 (33,17-37,47)	38,79 (33,84-41,37)
1500	1,47 c (1,15-1,90)	-	5,03 c (3,40-6,09)	-	20,50 c (13,60-24,90)	-	127,1 (109,42-141,16)	-	31,22 (28,06-35,33)	-
P	0,044	0,316	0,005	0,680	0,006	0,275	0,716	0,655	0,282	0,664

Letras minúsculas comparam níveis de cobre (mg.kg⁻¹ da dieta) diferem (P<0,05) entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Letras maiúsculas comparam os animais em conforto ou estresse térmico dentro do mesmo tratamento diferem (P<0,05) entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 4. Medianas e valores mínimos e máximos de proteína plasmática total (PPT), albumina (Alb), globulina (Glob) e relação albumina:globulina de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçoados com níveis de inclusão de cobre (Cu) durante 120 dias, sem e com estresse térmico.

Cu (mg.kg ⁻¹)	PPT (mg dL ⁻¹)		Alb (mg dL ⁻¹)		Glob (mg dL ⁻¹)		A:G	
	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse
0	4,35 aA (3,80-5,10)	3,78 B (2,80-4,00)	0,89 (0,77-1,00)	0,96 (0,66-1,15)	3,41 aA (2,99-4,17)	2,72 B (2,05-3,10)	0,24 (0,22-0,27)	0,40 (0,22-0,42)
4	4,68 ab (3,30-5,00)	3,98 (3,10-4,50)	0,95 (0,65-1,04)	0,69 (0,59-0,74)	3,82 a (3,30-4,14)	3,10 (2,46-3,65)	0,24 (0,17-0,27)	0,23 (0,10-0,26)
6	4,00 ab (3,78-4,58)	3,60 (3,35-3,95)	0,98 (0,86-1,09)	1,01 (0,94-1,23)	3,05 ab (2,15-3,20)	2,46 (2,36-3,56)	0,30 (0,19-0,34)	0,38 (0,30-0,47)
8	4,10 ab (3,35-4,45)	3,88 (3,30-4,20)	0,67 B (0,65-0,82)	0,90 A (0,75-1,01)	3,33 ab (2,86-3,48)	3,32 (2,24-3,37)	0,21 B (0,14-0,24)	0,31 A (0,27-0,33)
1000	3,50 b (3,00-4,20)	2,90 (2,50-3,15)	0,86 (0,78-0,94)	0,86 (0,69-0,87)	2,59 bc (1,72-3,04)	2,05 (1,73-3,04)	0,36 (0,27-0,48)	0,39 (0,38-0,39)
1500	3,00 c (2,53-3,15)	-	0,89 (0,49-0,96)	-	1,93 c (0,85-2,33)	-	0,56 (0,18-0,70)	-
P	0,001	0,269	0,287	0,282	0,002	0,253	0,090	0,216

Letras minúsculas comparam níveis de cobre (mg kg⁻¹ da dieta) diferem (P<0,05) entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Letras maiúsculas comparam os animais em conforto ou estresse térmico do mesmo tratamento diferem (P<0,05) entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 5. Medianas e valores mínimos e máximos da contagem do número de linfócitos totais (LF), neutrófilos totais (NT) e monócitos totais (MN) de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçados com níveis de inclusão de cobre (Cu) durante 120 dias, sem e com estresse térmico.

Cu (mg.kg ⁻¹)	LF (/mm ³)		NT(/mm ³)		MN(/mm ³)	
	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse	Sem estresse	Com estresse
0	48365,00 (38615,0-86874,0)	50726,00 (28261,0-79607,0)	2777,20 (1446,0 -269,0)	4689,00 (2541,0-21337,0)	1239,00 (943,0-1996,0)	2103,00 (1723,0-2731,0)
4	45005,00 (33873,0-69879,0)	44751,00 (35735,0-53067,0)	1694,20 (1006,0-9422,0)	3485,00 (2483,0-4259,0)	1515,80 (666,0-2530,0)	1620,00 (1009,0-2498,0)
6	44407,00 (37999,0-4657,0)	38892,00 (36631,0-52977,0)	626,10 (278,0-8421,0)	2443,00 (1157,0-7909,0)	1247,00 (1039,0-3753,0)	1040,00 (732,0-3389,0)
8	57549,00 (32932,0-120495,0)	57810,00 (48533,0-69761,0)	2385,40 (1299,0-4329,0)	2473,00 (1923,0-6580,0)	1823,30 (829,0-2256,0)	2513,00 (1576,0-5568,0)
1000	49146,00 (24446,0-67295,0)	46975,00 (18768,0-51487,0)	1437,90 (829,0-2256,0)	2231,00 (1341,0-2396,0)	798,00 (386,0-1449,0)	2909,00 (2234,0-4927,0)
1500	62356,00 (27383,0-112552,0)	-	1283,60 (581,0-3562,0)	-	704,50 (290,0-1450,0)	-
P	0,878	0,391	0,542	0,478	0,298	0,296

Letras minúsculas comparam níveis de cobre (mg kg⁻¹ da dieta) diferem (P<0,05) entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Letras maiúsculas comparam os animais em conforto ou estresse térmico do mesmo tratamento diferem (P<0,05) entre si, pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 6. Análise descritiva das médias da atividade oxidativa da ceruloplasmina sérica de juvenis de tilápia-do-Nilo arraçados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de cobre, antes e depois de estresse térmico.

Cu (mg.kg ⁻¹)	Atividade Enzimática	
	Sem estresse	Com estresse
0	25,21	50,31
4	38,75	43,13
6	14,38	44,58
8	45,00	30,31
1000	35,94	38,44
1500	33,44	-

FIGURAS

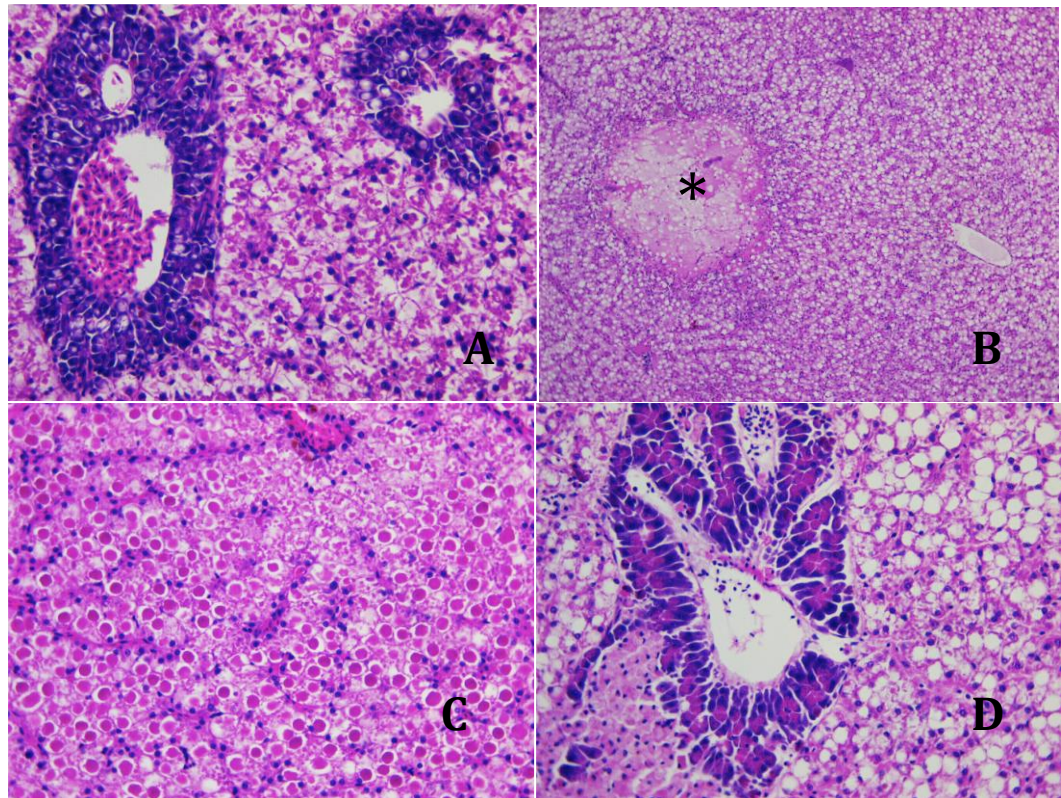


Figura 1. Principais alterações histopatológicas no fígado de tilápia-do-Nilo expostas a diferentes níveis de cobre dietário no período de 120 dias. (A) Presença de degeneração hidrópica difusa e degeneração glicogênica; (B) Área de Necrose (*); (C) Degeneração glicogênica, observar o acúmulo de material amorfo, eosinófilo no interior dos hepatócitos; (D) Degeneração hidrópica difusa e lipidose hepática (canto superior direito). Os corte possuem 5 μ m de espessura e foram corados com hematoxilina e eosina, 40X.

CAPÍTULO III

Implicações

Em virtude dos níveis de cobre na dieta próximos a exigência não influenciarem nos parâmetros de desempenho, hematológicos e bioquímicos, e também pela ausência de sinais clínicos de deficiência por cobre, pode-se dizer que os ingredientes utilizados em dietas práticas atendem a exigência deste mineral para a tilápia-do-Nilo.

Este estudo mostrou os efeitos deletérios que o excesso de sulfato de cobre pode acarretar aos peixes, prejudicando severamente o desempenho e a saúde. Além disso, os peixes não conseguiram resistir quando foram submetidos ao estresse por temperatura. Por este mineral ser amplamente utilizado na aquicultura como algicida ressalta-se a importância na cautela de sua utilização na água, pois uma vez utilizado em excesso pode acarretar sérios prejuízos ao piscicultor, principalmente em pisciculturas intensivas em que os animais são constantemente desafiados por condições atípicas.

Como forma de elucidar melhor os efeitos tóxicos do cobre dietário sob os tecidos e, conseqüentemente, na saúde e desempenho dos peixes, há necessidade de mais pesquisas que avaliem como o excesso de cobre danifica as vilosidades intestinais, e como este mineral influencia na estrutura de proteínas importantes ao metabolismo. Uma vez que, estes efeitos causados pela intoxicação por cobre prejudicam alguns parâmetros de interesse zootécnico.