

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DA TILÁPIA-DO-NILO: EFEITO DA DIETA SUPLEMENTADA COM LEVEDURA E ZINCO E DO ESTÍMULO PELO FRIO

ALTEVIR SIGNOR,¹ LUIZ EDIVALDO PEZZATO,² DARIO ROCHA FALCON,³
IGO GOMES GUIMARÃES⁴ E MARGARIDA MARIA BARROS⁵

-
1. Docente da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste.
E-mail: altevirsignor@yahoo.com.br
2. Professor doutor da FMVZ, Unesp
3. Professor adjunto da Universidade Federal Rural de Pernambuco
4. Professor adjunto nível 1 da Universidade Federal de Goiás
5. Professora doutora da FMVZ, Unesp.

RESUMO

Objetivou-se avaliar os parâmetros hematológicos da tilápia-do-nilo alimentada com dietas suplementadas com níveis de levedura autolisada e zinco, anterior e posterior ao estímulo pelo frio. As dietas foram formuladas para conter 32,0% PD e 3.240 kcal ED/kg com adição de levedura autolisada (%) e zinco (mg/kg): 0,0:0,0; 0,0:79,5; 2,0:0,0; 0,795:79,5; 2,0:200; 4,0:400; 6,0:600; 12,0:1200 e 14,0:1400. Na fase I, 135 alevinos foram distribuídos em 27 aquários de 50L e alimentados quatro vezes/dia por 128 dias (26°C). Posteriormente, iniciou-se a fase II. Nove peixes/tratamento foram transferidos para 27 aquários de 40L (três/aquário) e submetidos à baixa temperatura (13,0°C) por sete dias. Antes e após o estímulo pelo frio avaliaram-

se: o número de eritrócitos, a porcentagem de hematócrito, a taxa de hemoglobina, o volume corpuscular médio, a concentração de hemoglobina corpuscular média, a proteína plasmática e leucócitos totais, a porcentagem de linfócitos, neutrófilos e monócitos. O número de eritrócitos foi influenciado ($p < 0,05$) pela adição de levedura autolisada e zinco nas dietas. Após o estímulo pelo frio o maior prejuízo na eritropoiese ocorreu nos peixes que receberam dietas 0,795:79,50 (Lev:Zn) e 14:1.400 (Lev:Zn). A ausência dos nutrientes-testes determinou queda significativa no hematócrito, leucócitos e proteína plasmática total. O estresse pelo frio determina leucopenia, linfopenia, neutrofilia e monopenia.

PALAVRAS-CHAVES: Estresse, hematologia, minerais, *Oreochromis niloticus*, saúde, pró-nutriente.

ABSTRACT

HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF NILE TILAPIA: EFFECT OF DIET AND COLD STRESS

Hematological parameters of Nile tilapia fed diets supplemented with increasing levels of autolysed yeast and zinc, before and after cold stress, were analyzed. The diets were formulated to contain 32.0% DP and 3,240 kcal/kg DE with increasing levels of autolysed yeast (%) and zinc (mg/kg), as: 0.0:0.0; 0.0:79.5; 2.0:0.0; 0.795:79.5; 2.0:200; 4.0:400; 6.0:600; 12.0:1.200; 14.0:1400. In phase I, 135 fingerlings were distributed into 27 50l-aquaria and fed *ad libitum* four times a day during 128 days (26°C). After that, phase II began and nine fish from each treatment were transferred to 27 40l-aquaria (three/aquarium) and submitted to cold temperature (13.0°C) during seven days. Before and after cold stress, the following parameters

were evaluated: erythrocytes number, hematocrit, hemoglobin, corpuscular volume, mean corpuscular volume, total plasmatic protein, total leucocytes, lymphocytes, neutrophils and monocytes percentage. The number of erythrocytes was significantly influenced by the addition of autolysed yeast and zinc to the diets. After cold stress, fish fed diets supplemented with 0.795:79.50 (Lev:Zn) and 14:1400 (Lev:Zn) presented impaired erythrocyte synthesis. Absence of test nutrients determined significant decrease in hematocrit, total leukocyte and total plasmatic protein. Cold stress determines leukopenia, lymphopenia, neutrophilia and monopenia.

KEYWORDS: Healthy, hematology, minerals, *Oreochromis niloticus*, pro-nutrient, stress.

INTRODUÇÃO

Os pró-nutrientes, por melhorarem o desempenho produtivo e o sistema de defesa, e os minerais, por participarem de diversas funções enzimáticas, tornaram-se objetos de estudos na área de nutrição e saúde animal. Segundo BARROS et al. (2009), o novo conceito de balanceamento de rações considera que, além de nutrir o animal, visando o máximo desempenho, é necessário nutrir, ainda, seu sistema de defesa. Tal prática, além de possibilitar as respostas zootécnicas almejadas e a saúde dos peixes, permite que se obtenha maior resistência orgânica para superar a ação de agentes estressores, componentes inevitáveis sob condições intensivas de cultivo.

A levedura apresenta, em sua composição, estimulantes naturais que proporcionam melhora no metabolismo (TOVAR et al., 2002) e bem-estar animal (BUTOLO, 2002), sendo uma fonte alternativa de pró-nutriente (LI & GATLIN III, 2004; PEZZATO et al., 2006). Entretanto, quando utilizada como única fonte proteica em dietas para peixes, tem resultado em prejuízo ao desenvolvimento e ao metabolismo, além de anemia microcítica hipocrômica (SÁNCHEZ-MUNIZ et al., 1982).

Pesquisas com zinco têm demonstrado melhora no desempenho produtivo (WATANABE et al., 1997; WATANABE et al., 2004; SÁ et al., 2004) e na saúde dos peixes (HISANO et al., 2007b). Em condições de deficiência desse mineral, relataram-se baixos índices de ganho de peso, piora na conversão alimentar e menor ingestão diária de alimento (HIDALGO et al., 2002), podendo, ainda, prejudicar as funções dos hormônios da tireoide (FREAKE et al., 2001; ROSSI et al., 2001) e a eritropoiese (SÁ et al., 2004). Foi também relatada a interação antagônica entre o zinco e outros minerais de mesmo caráter iônico bivalente (SANDSTRÖN, 2001; SÁ et al., 2005).

A ação benéfica aos processos metabólicos da levedura (LI & GATLIN III, 2004) e do zinco (SÁ et al., 2005) em peixes evidencia a necessidade de melhor investigação. No caso da levedura, pelas prováveis ações na microbiota intestinal dos peixes (RUNSEY et al., 1992), e do zinco, por apresentar-se como promotor de crescimento nos animais (ROSSI et al., 2001).

Dessa forma, o presente experimento objetivou avaliar a influência da suplementação de levedura autolisada e zinco e suas respectivas relações nas dietas, sobre os parâmetros hematológicos em alevinos de

tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos ao estímulo pelo frio.

MATERIAL e MÉTODOS

O experimento foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, DMNA, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos – AquaNutri –, Unidade integrada ao CAUNESP. O experimento constou de duas fases: anterior e posterior ao estímulo pelo frio.

Fase I – anterior ao estímulo pelo frio

Após período de adaptação de dez dias às condições experimentais, 135 alevinos com peso médio de $7,27 \pm 0,19$ g foram distribuídos aleatoriamente em 27 aquários retangulares com capacidade de 50L cada, numa densidade de cinco peixes/aquário. A estrutura experimental incluía filtro biológico, sistema de circulação e aeração. A renovação média de água foi de 13,19 mL/s ou renovação completa em 63,20 minutos. Manteve-se a temperatura da água dentro da faixa de conforto para a espécie, $26,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, sendo aferida às 8h00 e 17h00. Fez-se avaliação semanal do pH e do teor de oxigênio dissolvido da água por meio de peagâmetro e oxímetro digital e, quinzenalmente, com kits comerciais para controle de amônia e nitrito e a alcalinidade por soluções-padrões, respectivamente.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com nove dietas contendo níveis de levedura autolisada em percentual e zinco em mg/kg de dieta, tais como 0,0:0,0; 0,795:79,5; 2,0:200; 4,0:400; 6,0:600; 12,0:1.200 e 14,0:1.400, respectivamente. Confrontaram-se esses tratamentos com outros dois tratamentos, um contendo 79,50 mg de zinco suplementar/kg ausente da suplementação de levedura autolisada, como determinado por SÁ et al. (2004), e o outro suplementado com 2,0% de levedura autolisada ausente de zinco, fundamentado nos resultados obtidos por HISANO et al. (2007a) (Tabela 1). Como fonte de zinco, utilizou-se o sulfato de zinco heptaidratado, qualidade comercial analisada de 21,0%. A concentração de zinco nas dietas (Tabela 1) foi calculada com base na análise realizada sobre o composto de zinco utilizado para suplementação deste micromineral nas dietas.

TABELA 1. Composição percentual das dietas experimentais contendo níveis crescentes de levedura autolisada (Lev) e zinco (Zn) para a tilápia-do-nylo¹

Ingredientes	Lev:Zn ²								
	0,0:0,0	0,0:79,5	2,0:0,0	0,795:79,5	2,0:200	4,0:400	6,0:600	12,0:1200	14,0:1400
Farelo de soja	58,50	58,50	58,00	58,00	57,00	56,00	54,50	48,00	45,00
Glúten de milho	5,78	5,78	5,60	5,88	6,15	6,37	6,72	9,32	10,80
Fubá de milho	7,00	7,00	6,60	7,00	7,00	6,56	6,13	6,30	6,30
Farelo de trigo	7,50	7,50	5,90	7,30	7,30	5,75	5,80	4,90	4,50
Quirera de arroz	13,33	13,29	13,75	13,06	12,46	12,91	12,21	10,00	9,59
Levedura autolisada	0,00	0,00	2,00	0,80	2,00	4,00	6,00	12,00	14,00
Cloreto de sódio	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Fosfato bicálcico	3,70	3,70	3,70	3,70	3,65	3,60	3,50	3,40	3,30
Calcário calcítico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,15	0,18
Sulfato de zinco ³	0,00	0,04	0,00	0,04	0,10	0,19	0,29	0,57	0,67
Celulose	1,85	1,85	2,05	1,89	2,00	2,23	2,40	2,95	3,23
Óleo de soja	0,60	0,60	0,67	0,60	0,60	0,65	0,64	0,59	0,56
L-lisina	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,37	0,42
DL-Metionina	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,56	0,53	0,52
Triptofano	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,06
L-Treonina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Suplemento	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Antioxidante (BHT) ⁵	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

1 Formulação das dietas realizadas segundo: NRC (1993); PEZZATO et al. (2002); GONÇALVES et al. (2004; 2005); GUIMARÃES et al. (2008a, b).

2 Níveis de levedura autolisada em porcentual e zinco em mg/kg de dieta.

3 Fonte comercial de sulfato de zinco heptaidratado [ZnSO₄(7H₂O)] qualidade comercial 21,0% de zinco.

4 Suplemento vitamínico e mineral ausente de zinco (níveis de garantia por kg do produto): vit. A = 1.200.000 UI; vit. D3 = 200.000 UI; vit. E = 12.000 mg; 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; ácido fólico = 1.200 mg; pantotenato de cálcio = 12.000 mg; vit. C = 48.000 mg; biotina = 48 mg; colina = 65.000 mg; niacina = 24.000 mg; ferro = 10.000 mg; cobre = 600 mg; manganês = 4.000 mg; iodo = 20 mg; cobalto = 2 mg e selênio = 20 mg.

5 Antioxidante (BHT) = Butil hidróxi tolueno.

Nesta fase os peixes foram alimentados *ad libitum*, quatro vezes ao dia, às 8:00h, 11:00h, 14:00h e 17:00h, pelo período de 128 dias, com as dietas experimentais, as quais foram armazenadas em *freezer* a - 4,0°C. Ao final dessa fase experimental, os peixes apresentavam peso médio de 117,92 ± 25,47g. Quando

necessário, realizaram-se limpeza dos aquários e das demais estruturas por sifonagem, para a retirada do acúmulo de resíduos das fezes.

As avaliações hematológicas e metabólicas foram realizadas aos 128º dias, para investigar a influência das dietas, e após sete dias ao estímulo pelo frio,

para evidenciar possível ação das dietas com relação ao estresse provocado aos peixes. A coleta de sangue foi efetuada no vaso caudal com seringa de 1,0mL banhada em anticoagulante EDTA (3,0%) nos peixes anestesiados em benzocaína (100 mg/L de água).

Procedeu-se à contagem do número de eritrócitos e leucócitos totais pelo método do hemocitômetro em câmara de Neubauer, utilizando-se azul de toluidina a 0,01% em pipeta de Thoma como solução diluente e corante. A diferenciação dos leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo corado com May-Grünwald Giemsa.

A taxa de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se *kit* de determinação fotocolorimétrica (Analisa Diagnóstica®), segundo COLLIER (1944). Para determinação da porcentagem de hematócrito, utilizou-se centrífuga para micro-hematócrito numa rotação de 5.000 rpm durante cinco minutos (GOLDENFARB et al., 1971) e para mensuração da proteína plasmática empregou-se refratômetro manual de Goldenberg. As variáveis antes apresentadas foram avaliadas segundo as técnicas descritas por JAIN (1986). Posteriormente a essas análises, procedeu-se ao cálculo dos seguintes índices hematimétricos: volume corpuscular médio [$VCM = (Htc \times 10)/eritrócitos$] e concentração de hemoglobina corpuscular média [$CHCM = (Hb/Htc) \times 100$], segundo WINTROBE (1934).

Realizou-se a contagem diferencial de leucócitos nas extensões em lâminas. Estas foram previamente limpas com detergente e água, e desengorduradas com éter etílico PA e acetona PA, sendo seca com auxílio de gaze. Devidamente identificadas, foram confeccionadas três lâminas por tratamento, acondicionadas em caixas apropriadas e posteriormente coradas com corantes hematológicos May-Grünwald Giemsa, utilizando-se a técnica descrita por TAVARES-DIAS & MORAES (2004). Fez-se a contagem diferencial em microscópio com aumento de 100 vezes, contando-se 200 células e estabelecendo-se o percentual de cada componente celular (linfócitos, neutrófilos e monócitos).

Fase II – após estímulo pelo frio

Após as avaliações hematológicas aos 128° dias, os peixes permaneceram nas estruturas experimentais com o sistema de controle térmico desligado,

objetivando baixar gradativamente a temperatura, para posterior mudança dos animais para a sala de desafio. A partir do momento em que a temperatura da água dos aquários de ambas as estruturas experimentais se igualou, nove peixes de cada tratamento foram transferidos para a sala experimental climatizada constituída de 27 aquários de 40L com filtros individualizados e aeração. Distribuíram-se aleatoriamente 81 peixes, na densidade de três peixes/aquário, constituindo cada peixe uma unidade experimental, mantendo-se o mesmo delineamento experimental da Fase I com nove repetições por tratamento.

Após a distribuição dos peixes, a temperatura da água dos aquários foi gradativamente reduzida do conforto térmico para a espécie até 13,0° C durante o período experimental de sete dias. Alimentaram-se os animais *ad libitum*, porém não foi mensurado o alimento consumido. Ao final desse período, procedeu-se à avaliação dos mesmos parâmetros hematológicos da Fase I. Dividiu-se o estudo em duas fases, para avaliação da influência dos nutrientes suplementados às dietas antes e após ao estresse provocado com o estímulo pelo frio aos peixes com relação às variáveis hematológicas e metabólicas destes.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à técnica de análises multivariadas pelo modelo de medidas repetidas, considerando nove grupos independentes, complementada com os intervalos de confiança simultâneo (JOHNSON & WICHERN, 1992). Diferenças entre médias foram reportadas como significativas ao nível de 5,0%. Realizou-se a comparação entre grupos pela análise de contrastes ortogonais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade de água, monitorados na Fase I, mostraram-se dentro do considerado adequado para manutenção da condição de saúde dos peixes, segundo BOYD (1990).

O número de eritrócitos foi significativamente influenciado pelos níveis de suplementação de levedura e zinco nas dietas (Tabela 2). Na fase I, níveis elevados de suplementação de zinco (1.200 e 1.400 mg/kg dieta) na dieta determinaram os menores valores de eritrócitos nos peixes, independente

do nível de suplementação de levedura autolisada, sendo o mesmo resultado observado nos peixes que receberam a dieta isenta de suplementação de zinco e que continha 2,0% de levedura autolisada e naquela suplementada com 0,795Lev:79,5Zn (Lev:Zn; levedura autolisada em percentual e zinco em mg/kg de dieta, respectivamente).

A combinação de levedura autolisada e zinco nas dietas não determinou melhora no perfil hematológico dos peixes. Resultados semelhantes foram anteriormente descritos por HISANO et al. (2007b), com a suplementação de até 3,0% de levedura autolisada na dieta para a tilápia-do-nylo, porém o autor ressaltou tendência de aumento nos valores de eritrócitos. Alterações positivas no perfil hematológico de peixes foram anteriormente descritas por LI & GATLIN III (2003) para o híbrido Striped bass, com a inclusão de levedura *Saccharomyces cerevisiae* na dieta (1,0%; 2,0% e 4,0%), destacando-se tendência de melhora na saúde dos peixes com a suplementação de 1,0%, o que foi observado por meio de parâmetros imunológicos. Ação benéfica na saúde dos peixes com a suplementação dietária de levedura e zinco foi também descrita por HISANO et al. (2007b).

Os valores sanguíneos deste estudo demonstraram que a dieta ausente de suplementação de levedura autolisada e zinco (Tabela 2) apresentou níveis nutricionais disponíveis para suprir as exigências da tilápia-do-nylo, determinando *status* nutricional adequado. Isso pode explicar os valores próximos obtidos com a suplementação de levedura autolisada, zinco e levedura autolisada e zinco.

Melhora significativa na eritropoiese foi observada por SÁ et al. (2004), com a suplementação de níveis de 0,0 a 400,0 mg de Zn/kg na dieta para tilápia-do-nylo. Trata-se de resultados que não ficaram claramente evidenciados neste estudo. O zinco presente nas enzimas anidrase carbônica e superóxido dismutase (HAMBIDGE, 1986) tem função de proteção e manutenção da integridade da membrana dos eritrócitos (O'DELL et al., 1987), sendo que a deficiência deste resultou em baixa contagem de células (KRAUS et al., 1997).

A suplementação dos níveis acima da exigência nutricional poderia determinar inter-relação metabólica desse mineral com o ferro (DEVLIN, 1997;

SÁ et al., 2005) e comprometer o metabolismo dos peixes, com prejuízos na síntese de hemoglobina pela possível inibição da transferência do ferro da ferroquelatase a protoporfirina IX e consequente comprometimento da formação do grupo heme (DEVLIN, 1997). Entretanto, são necessárias informações mais aprofundadas para confirmar tal hipótese.

Considerando-se a ação benéfica de oligossacarídeos não digestíveis no estímulo à absorção de diversos minerais (SCHOLZ-AHRENS et al., 2001) e na capacidade de melhora da resposta inata (ORTUÑO et al., 2002; Li e GATLIN III, 2004; SELVA-RAJ et al., 2005) exercida pelo glucano que compõe em torno de 7,7% da célula de levedura (CABIB et al., 1982; RUNSEY et al., 1992), seria esperado que em níveis baixos de inclusão (pró-nutrientes) esta viesse a ter efeito benéfico na saúde dos peixes. Essa hipótese pode ser observada pela tendência de melhora nos parâmetros sanguíneos com a inclusão de levedura autolisada, principalmente quando os animais sofreram estresse pelo frio.

Após o estresse pelo frio, os peixes que demonstraram maior prejuízo na eritropoiese foram os que receberam dietas suplementadas com 0,795Lev:79,50Zn e 14,0Lev:1.400Zn, valores esses condizentes com a condição anterior ao estresse. A menor porcentagem de hematócrito foi igualmente determinada nos peixes desses mesmos tratamentos, o que também se observou para a taxa de hemoglobina. Já a menor concentração de proteína plasmática total foi observada nos peixes que receberam dieta suplementada com 14,0Lev:1.400Zn de levedura autolisada e zinco, respectivamente.

A avaliação do perfil hematológico é considerada ferramenta importante na análise do estado de saúde dos peixes (NOGA, 2000; FALCON et al., 2007), que, estimulados, seja pelo estresse causado por infecções e/ou variações ambientais, podem responder positiva ou negativamente às dietas fornecidas. Neste estudo, observou-se que, embora na fase I a ausência desses nutrientes (0,0Lev:0,0Zn) na dieta tenha mantido os parâmetros hematológicos dentro do considerado normal em condições adequadas de temperatura, abaixo do conforto térmico, a exigência de nutrientes pode ter sido maior, condição refletida na queda da porcentagem de células vermelhas ($P < 0,05$).

TABELA 2. Valores médios do número de eritrócitos (Erit), porcentagem de hematócrito (Htc), taxa de hemoglobina (Hb), número de leucócitos totais (Leuc) e proteína plasmática total (PPT) de alevinos de tilápia-do-nilo alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de levedura autolisada e zinco pelo período de 128 dias (Fase I) e submetidas ao estímulo a frio por sete dias (Fase II)

Lev:Zn ¹	Erit (10 ⁶ /μL)		Htc (%)		Hb (%)		Leuc (μL)		PPT (mg/dL)	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
0:0	2,26±0,22abA	1,90±0,19bA	29,00±4,00B	21,62±4,08bcA	7,00±1,04A	5,28±0,83bcA	91100±3150B	36600±18219A	3,98±1,28B	2,60±0,43bcA
0,0:79,5	2,36±0,21bB	1,70±0,16bA	28,30±3,19A	23,32±4,88cA	7,34±0,92A	5,50±1,43bcA	76300±29186B	30100±10871A	4,02±0,66B	2,74±0,42cA
2,0:0,0	2,16±0,24abA	1,78±0,29bA	26,20±2,84A	23,38±6,62cA	6,24±0,70A	5,76±1,09bcA	85400±16422B	29800±7719A	3,68±0,56B	2,50±0,31bcA
0,795:79,5	2,00±0,26aB	1,40±0,19aA	24,60±2,22B	17,52±1,74abA	6,56±1,06A	4,38±0,59abA	76300±17109B	30100±5952A	3,06±0,30A	2,36±0,29bA
2,0:200	2,36±0,26bB	1,68±0,34abA	28,30±2,05B	20,06±3,50bcA	7,02±0,67A	5,44±0,86bcA	83300±19276B	31400±8181A	3,22±0,30A	2,32±0,24bA
4,0:400	2,22±0,22abA	1,84±0,38bA	25,50±3,48A	22,32±2,12bcA	6,68±1,03A	5,88±0,96bcA	77800±31473B	35500±10416A	3,96±0,80B	2,88±0,19cA
6,0:600	2,36±0,23bA	1,96±0,42bA	29,20±3,05A	25,12±4,79cA	6,98±0,88A	6,14±1,24cA	72400±12959B	26800±8592A	4,08±0,95B	2,44±0,34bA
12,0:1.200	2,00±0,27aA	1,80±0,26bA	25,40±3,70A	24,32±4,61cA	6,06±0,98A	5,86±1,42bcA	82200±21647B	22800±4685A	2,88±0,67A	2,54±0,85bA
14,0:1.400	1,94±0,23aB	1,36±0,18aA	28,00±1,77B	14,48±1,87aA	7,76±0,80B	3,22±1,27aA	91200±18546B	21900±2903A	2,96±0,50B	1,92±0,31aA
Cont: Zn ²	P>0,05	-	-	P>0,05	-	P>0,05	-	-	-	P<0,05
Cont: Lev ³	P>0,05	-	-	P>0,05	-	P>0,5	-	-	-	P>0,05

¹ Níveis de levedura autolisada em porcentual e zinco em mg/kg de dieta.

² Contrastes ortogonais entre os níveis (0,0:79,5X0,795:79,5+2,0:200+4,0:400+6,0:600+12,0:1200+14,0:1400, Lev:Zn) de suplementação de zinco nas dietas.

³ Contrastes ortogonais entre os níveis (2,0:0,0X0,795:79,5+2,0:200+4,0:400+6,0:600+12,0:1200+14,0:1400, Lev:Zn) de suplementação de levedura autolisada nas dietas.

* Médias nas colunas seguidas por letras minúsculas iguais não representam diferenças entre tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05) no mesmo momento e maiúsculas não representam diferenças estatísticas (P<0,05) pela técnica de análises multivariada entre fases.

Embora não de forma significativa, observou-se redução de 15,92% no número de eritrócitos; 24,57% na taxa de hemoglobina e 11,50% no VCM. A avaliação do leucograma e da concentração de proteína plasmática total corroborou com a condição de saúde menos favorável para os peixes deste tratamento (0,0Lev:0,0Zn). O aumento da porcentagem de neutrófilos traduz o esforço do organismo em vencer possíveis condições patogênicas instaladas em função da queda de resistência do organismo. No entanto, VRUWINK et al. (1993) descreveram que a deficiência de zinco prejudica a função fagocítica do neutrófilo. Os resultados relatados após o estresse pelo frio foram anteriormente descritos por FALCON et al. (2007, 2008).

Comparando-se a condição anterior e posterior ao estímulo pelo frio observou-se que a ausência dos nutrientes-testes determinou queda significativa na porcentagem de hematócrito, número de leucócitos totais e proteína plasmática total. A não suplementação de levedura autolisada determinou queda na síntese de células vermelhas, número de leucócitos totais e proteína plasmática total. Já a ausência de suplementação de zinco determinou prejuízo signifi-

cativo na síntese de células brancas totais e proteína plasmática total.

Alteração significativa no volume do eritrócito (VCM) (Tabela 3) foi observada somente nos peixes alimentados com a dieta suplementada com 14,0Lev:1.400Zn de levedura autolisada e zinco, respectivamente. Esse menor valor reflete a taxa de hemoglobina e a porcentagem de hematócrito também encontradas nesses animais.

Na fase anterior ao estresse pelo frio, não foi observada influência dos nutrientes-testes na síntese dos diferentes tipos de leucócitos: linfócito, neutrófilo e monócito (Tabela 4). Porém, após o estresse, todos os três tipos avaliados foram significativamente alterados. Observou-se a menor porcentagem de linfócito nos peixes arraçoados com a dieta suplementada com 6,0Lev:600Zn. Registraram-se, no entanto, para esses animais, os maiores valores de neutrófilo e monócitos. A suplementação dietária 4,0Lev:400Zn determinou a maior porcentagem de linfócitos. Já as menores porcentagens de neutrófilo e monócito foram observadas para 0,795Lev:79,50Zn e 12,0Lev:1200Zn, respectivamente.

TABELA 3. Valores médios de volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de alevinos de tilápia-do-nylo alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de levedura autolisada e zinco pelo período de 128 dias (Fase I) e submetidas ao estímulo pelo frio por sete dias (Fase II)

Lev:Zn ¹	VCM (fL)		CHCM (%)	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
0:0	128,44±8,48A	113,62±17,67A	24,10±1,07	24,58±2,99
0,0:79,5	121,08±16,25A	137,00±24,82A	26,00±2,39	23,48±4,34
2,0:0,0	123,54±16,07A	132,10±27,04A	24,02±3,60	25,30±3,93
0,795:79,5	124,54±12,29A	124,78±10,83A	26,72±4,38	25,08±2,04
2,0:200	120,28±7,08A	122,08±22,57A	24,76±1,66	27,14±0,68
4,0:400	115,66±9,82A	124,98±23,46A	26,32±1,55	26,34±3,25
6,0:600	124,80±19,83A	128,98±19,93A	23,86±2,15	24,62±3,00
12,0:1200	127,26±11,13A	135,14±14,44A	23,94±2,13	24,08±3,96
14,0:1400	144,32±9,92B	108,04±3,56A	27,66±1,63	22,18±7,49

¹ Níveis de levedura autolisada em porcentual e zinco em mg/kg de dieta.

* Médias nas linhas seguidas por letras maiúsculas iguais não representam diferenças estatísticas (P<0,05) entre fases pela técnica de análises multivariadas.

TABELA 4. Porcentagem média do número de linfócitos (Linf), neutrófilos (Neut) e monócitos (Mon) de alevinos de tilápia-do-nylo alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de levedura autolisada e zinco pelo período de 128 dias (Fase I) e submetidas ao estímulo pelo frio por sete dias (Fase II)

Lev:Zn ¹	Linf		Neut		Mon	
	Fase I (%)	Fase II (%)	Fase I (%)	Fase II (%)	Fase I (%)	Fase II (%)
0,0:0,0	77,60±15,36A	62,75±8,02ceA	15,00±12,34a	33,38±9,59abcB	7,40±4,74A	3,88±1,78abcA
0,0:79,5	89,00±7,20A	71,00±4,78defA	6,50±4,43a	26,00±6,09abB	4,50±3,10A	2,63±2,53abA
2,0:0,0	94,30±7,40B	49,30±14,92abA	10,00±6,04a	44,90±14,39cdB	5,40±2,16A	5,20±1,99bcdA
0,795:79,5	83,60±11,48A	77,40±8,47fA	10,80±9,54a	19,60±8,97aA	5,40±2,30A	3,00±1,87abA
2,0:200	82,00±8,49B	55,13±7,21bcA	12,20±6,18a	40,25±5,49cB	5,80±3,05A	4,63±1,98bcdA
4,0:400	76,80±12,42A	76,10±12,97fA	16,20±9,14a	25,20±13,17abA	6,90±4,02A	2,70±1,79abA
6,0:600	84,70±9,87B	36,70±23,06aA	10,90±7,70a	55,20±20,32dB	4,40±4,11A	7,80±5,77dA
12,0:1200	79,10±11,33A	69,63±10,17defA	14,90±8,13a	29,13±9,99abA	6,00±3,76B	1,13±0,41aA
14,0:1400	78,80±9,35B	59,60±6,94bcdA	15,00±8,80a	34,40±5,52bcB	5,80±1,20A	6,00±3,16cdA
Cont ² : Zn	-	P>0,05	-	P>0,05	-	P>0,05
Cont ³ : Lev	-	P>0,05	-	P>0,05	-	P>0,05

¹ Níveis de levedura autolisada em porcentual e zinco em mg/kg de dieta.

² Contrastes ortogonais entre os níveis (0,0:79,5X0,795:79,5+2,0:200+4,0:400+6,0:600+12,0:1200+14,0:1400, Lev:Zn) de suplementação de zinco nas dietas.

³ Contrastes ortogonais entre os níveis (2,0:0,0X0,795:79,5+2,0:200+4,0:400+6,0:600+12,0:1200+14,0:1400, Lev:Zn) de suplementação de levedura autolisada nas dietas.

* Médias nas colunas seguidas por letras minúsculas iguais não representam diferenças entre tratamentos pelo teste de Tukey (P<0,05) no mesmo momento e maiúsculas não representam diferenças estatísticas (P<0,05) pela técnica de análises multivariada entre fases.

Neste estudo, os peixes que receberam dieta ausente de suplementação de levedura autolisada e zinco não desenvolveram anemia, embora a queda na taxa de hemoglobina e na porcentagem de hematócrito indique tendência desse quadro hematológico. No entanto, os peixes que receberam a dieta suplementada com 0,795Lev:79,50Zn a 14,0Lev:1.400Zn, respectivamente, desenvolveram quadro de anemia microcítica hipocrômica, característica da deficiência de ferro. Observaram-se níveis abaixo do normal para peixes hípidos no número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito e taxa de hemoglobina. Resultados semelhantes foram observados por SÁ et al. (2005), que, ao fornecerem dietas práticas e purificadas para alevinos de tilápia-do-nylo, observaram influência do zinco no metabolismo do ferro. Essa ação pode demonstrar a possível inter-relação dos minerais disponíveis, principalmente zinco-ferro, ao nível celular, e dos níveis de nitrogênio não proteico advindos da suplementação de

levedura autolisada. Nos demais tratamentos, os peixes podem ter sustentado o perfil hematológico em função da reserva corpórea de ferro, indicando possivelmente que o nível de zinco suplementado não estaria, no tempo avaliado, influenciando significativamente o metabolismo do ferro. A possível ação da levedura na eritropoiese foi descrita por SANCHEZ-MUNIZ et al. (1982), que, ao substituírem a proteína da dieta para truta arco-íris pela levedura *Hansenula anomala*, observaram possível ação degenerativa dos eritrócitos.

O prejuízo na manutenção dos parâmetros hematológicos dos peixes sob condições de baixa temperatura (estresse crônico) foi anteriormente descrito por FALCON et al. (2007), em avaliação do estado de higidez da tilápia-do-nylo alimentada com dietas contendo suplementação de vitamina C e lipídeos. Os valores determinados por esses autores não atingiram níveis tão baixos quanto os do presente experimento. Vale ressaltar que o estresse deste estudo foi agudo

com menor temperatura, quando comparado ao estudo citado. NOGA (2000) relatou que as respostas hematológicas dos peixes, aclimatados e submetidos à condição crônica de redução da temperatura, são menores.

Os peixes expostos à baixa temperatura apresentam redução do metabolismo, o que pode afetar a condição fisiológica e determinar redução do perfil hematológico. Observaram-se alterações significativas principalmente nas células do sistema de defesa, com leucopenia independente da suplementação ou não de levedura autolisada e zinco e, ainda, linfopenia, neutrofilia e monopenia. Quadro de leucopenia sob condições de estresse por temperatura foi anteriormente descrito por DUNN et al. (1989), para *Carassius auratus*, e por FALCON et al. (2008), para tilápia-do-nylo, os quais observaram ainda, como as respostas deste estudo, aumento significativo do número de neutrófilos. Dessa forma, é certo o prejuízo exercido pelo estresse pelo frio às condições de higidez dos peixes, mesmo em condições nutricionais adequadas.

CONCLUSÕES

A suplementação de levedura autolisada, zinco ou levedura autolisada e zinco nas dietas não reflete um padrão de melhora do perfil hematológico; níveis elevados de levedura autolisada e zinco na dieta determinam condições subótimas de saúde; o estresse pelo frio determina leucopenia, linfopenia, neutrofilia e monopenia.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa de estudo concedida (Processo 05/52232-6), à Usina São Luis, em nome do supervisor de Produção Industrial, Marcos F. Zimak, pelo apoio científico, ao Laboratório de Química do Instituto de Biociências, pelo auxílio nas análises, e ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pelas análises estatísticas.

REFERÊNCIAS

BARROS, M. M.; RANZANI, P. M. J. T.; PEZZATO, L. E.; FALCON, D. R.; GUIMARÃES, I. G. Hematological response and growth performance of Nile tilapia fed diets containing folic acid. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 895-903, 2009.

BOYD, C. **Water quality in ponds for aquaculture**. Alabama: Birmingham Publishing, 1990. 482 p.

BUTOLO, J. E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. Campinas, SP: Agro Comunicação, 2002. 430 p.

CABIB, E.; ROBERTS, R.; BOWERS, B.; Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. **Annual Review Biochemistry**, v. 51, p. 763-793, 1982.

COLLIER, H. B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Assistance Journal**, v. 50, p. 550-552, 1944.

DEVLIN, T. M. **Textbook of biochemistry with clinical correlations**. Wiley-Liss, New York: John Wiley & Sons, Inc. Copyright 1997. 1007 p.

DUNN, S. E.; MURAD, A.; HOUSTON, A. H. Leucocytes and leucopoietic capacity in thermally acclimated goldfish, *Carassius auratus* L. **Journal Fish Biology**, v. 34, p. 901-911, 1989.

FALCON, D. R.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; NARVÁEZ, W. V.; GUIMARÃES, I. G. Leucograma da tilápia-do-nylo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetidas a estresse por baixa temperatura. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 543-551, 2008.

FALCON, D. R.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E.; VALLE, J. B. Lipídeo e vitamina C em dietas preparatórias de inverno para tilápias-do-nylo. **Revista Brasileira de Zootecnia/Brazilian Journal of Animal Science**, v. 36, p. 1462-1472, 2007.

FREAK, H. C.; GOVONI, K. E.; GUDA, K. HUANG, C.; ZINN, S. A. Actions and interactions of thyroid hormone and zinc status in growing rats. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 4, p. 1135-1141, 2001.

GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal Clinical Pathology**, Baltimore, v. 56, n. 1, p. 35-39. 1971.

GONÇALVES, G. S.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; HISSANO, H.; FREIRE, E. S.; FERRARI, J. E. C. Digestibilidade aparente e suplementação de fitase em alimentos vegetais para a tilápia-do-nylo. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 3, p. 313-321, 2004.

GONÇALVES, G. S.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; KLEEMAN, G. K.; ROCHA, D. F. Efeitos da suplementação de fitase sobre a disponibilidade aparente de Mg, Ca, Zn, Cu, Mn e Fe em alimentos vegetais para a tilápia-do-nylo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2155-2163, 2005.

GUIMARÃES, I. G.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; TA-

- CHIBANA, L. Nutrient digestibility of cereal grain products and by-products in extruded diets for Nile tilapia. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, n. 6, p. 781-789, 2008a.
- GUIMARÃES, I. G.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M. Amino acid availability and protein digestibility of several protein sources for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 14, p. 396-404, 2008b.
- HAMBIDGE, K. M.; CASEY, C. E.; KREBS, N. F. Zinc. In: MERTZ, W. (Ed.). **Trace elements in human and animal nutrition**. San Diego, EUA: Academic Press, 1986. p. 1-137.
- HIDALGO, M. C.; EXPÓSITO, A.; PALMA, J. M.; HIGUERA, M. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 183-193, 2002.
- HISANO, H.; SOLARTE, W. N.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E. Desempenho produtivo de alevinos de tilápia-do-nylo alimentados com levedura e derivados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1035-1042, 2007a.
- HISANO, H.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E. Levedura desidratada de álcool e zinco como pró-nutrientes em rações para tilápia-do-nylo: aspectos hematológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 33, p. 35-42, 2007b.
- JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febeger, 1986.
- JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical methods**. 3. ed. New Jersey, USA: Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1992.
- KRAUS, A.; ROTH, H. P.; KIRCHGESSNER, M. Influence of vitamin C, vitamin E and β -carotene on the osmotic fragility and the primary antioxidant system of erythrocytes in zinc-deficient rats. **Archives for Tierernahrung**, v. 50, p. 257-269, 1997.
- LI, P.; GATLIN III, D. M. Evacuation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*). **Aquaculture**, v. 219, p. 681-692, 2003.
- LI, P.; GATLIN III, D. M. Dietary brewers yeast and the prebiotic GrobionicTMAE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* X *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Aquaculture**, v. 231, p. 445-456, 2004.
- NOGA, E. Fish leukocyte responses. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Veterinary hematology**. Hoboken: Wiley Blackwell. 5. ed. 2000. p. 436-439.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of fish**. Washington, D. C.: National Academy of Science, 1993. 114 p.
- Ci. Anim. Bras., Goiânia, v. 11, n. 3, p. 509-519, jul./set. 2010
- O'DELL, B. L.; BROWNING, J. D.; REEVES, P. G. Zinc deficiency increases the osmotic fragility of rat erythrocytes. **Journal of Nutrition**, v. 117, p. 1883-1889, 1987.
- ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Spaurus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 85, p. 41-50, 2002.
- PEZZATO, L. E.; MIRANDA, E. C.; BARROS, M. M. PINTO, L. G. Q.; FURUYA, W. M.; PEZZATO, A. C. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 4, p. 1595-1604, 2002.
- PEZZATO, L. E.; MENEZES, A.; MARROS, M. M.; GUIMARÃES, I. G.; SCHICH, D. Levedura em dietas para alevinos de tilápia-do-nylo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 13, n. 1, p. 84-94, 2006.
- ROSSI, L.; MIGLIACCIO, S.; CORSI, A.; MARZIA, M.; BIANCO, P.; TETI, A.; CABELLI, L.; CIANFARANI, S.; PAOLETTI, F.; BRANCA, F. Reduced growth and skeletal changes in zinc-deficient growing rats are due to impaired growth plate activity and inanition. **Journal Nutrition**, v. 131, p. 1142-1146, 2001.
- RUMSEY, G. L.; WINFREE, R. A.; HUGHES, S. G. Nutritional values of dietary nucleic acids and purine bases to rainbow trout. **Aquaculture**, v. 108, p. 97-110, 1992.
- SÁ, M. V. C.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PADILHA, P. M. Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. **Aquaculture**, v. 238, p. 385-401, 2004.
- SÁ, M. V. C.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PADILHA, P. M. Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 273-281, 2005.
- SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J.; HIGUERE, M.; VARELA, G. Alterations of erythrocytes of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by the use of *Hansenula anomala* yeast as sole protein source. **Compendium Biochemistry Physiology**, v. 72A, p. 693-696, 1982.
- SANDSTRÖM, B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. **British Journal of Nutrition**, v. 85, p. 181-185, sup. 2, 2001.
- SCHOLZ-AHRENS, K. E.; SCHAAFSMA, C.; HEUVEL, E. G.; SCHREZENMEIR, J. Effects of probiotic on mineral metabolism. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 73, p. 459S-464S, 2001.
- SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and spe-

cific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, p. 293-306, 2005.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto, SP: Willimpres Complexo Gráfico, 2004. 144 p.

TOVAR, D.; ZAMBONINO, J.; CAHU, C.; GATESOUBE, F. J.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; LÉSEL, R. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Aquaculture**, v. 204, p. 113-123, 2002.

VRUWINK, K. J.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E.; MARESCHI, J. P.; HURLEY, L. S. The effect of experimental zinc deficiency on development of the immune system. In: CUNNINGHAM-RUNDLES, S. (Ed.). **Nutrient modulation of the immune response**. New Work: Marcel Dekker Inc, 1993. p. 263-279.

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

WINTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, v. 51, p. 32-49. 1934.

tologica, v. 51, p. 32-49. 1934.

Protocolado em: 22 abr. 2009. Aceito em: 11 maio 2010.