

Níveis de cobre em dietas para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*

Jeisson Emerson Casimiro Ferrari¹, Margarida Maria Barros^{2*}, Luiz Edivaldo Pezzato²,
Giovani Sampaio Gonçalves³, Hamilton Hisano¹ e Geisa Karine Kleemann¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da FMVZ, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu. ² Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, FMVZ, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu, CP 560, 18.618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. ³ Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura do Caunesp, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal. *Autor para correspondência e-mail: mbarros@fca.unesp.br

RESUMO. Os efeitos de diferentes níveis de cobre no desempenho produtivo e nos parâmetros fisiológicos da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) foram avaliados por um período de 120 dias. O experimento foi inteiramente casualizado com 5 níveis de suplementação de cobre (0,0; 4,0; 80,0; 160,0 e 320,0mg/kg como sulfato de cobre heptaidratado, 24,05% cobre) e seis repetições por tratamento. Foram utilizados 180 peixes com peso de $2,0 \pm 0,05$ g distribuídos aleatoriamente em 30 aquários de 60L cada, em uma lotação de 6 peixes/aquário. Os aquários foram dotados de sistema de filtragem individual de água e de sistema de aquecimento controlado por termostato ($25,0^\circ \pm 1,0^\circ\text{C}$). Confeccionou-se 5 rações purificadas, à base de albumina e gelatina, isoprotéicas (32,0% PB) e isoenergéticas (3200 kcal/kg de energia digestível), diferenciando do controle pela adição de sulfato de cobre. As concentrações de oxigênio dissolvido e de pH foram determinadas semanalmente. Determinou-se o ganho médio de peso, a conversão alimentar aparente e a porcentagem de sobrevivência. Como parâmetros hematológicos, avaliou-se o número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, porcentagem de hematócrito e o volume globular médio e a concentração de hemoglobina globular média. Determinou-se a concentração de cobre no fígado, ossos, carcaça e filé e avaliou-se a morfologia e coloração dos fígados. Concluiu-se que: para a tilápia do Nilo, a ausência e a utilização de superdosagem de cobre na ração não determinam alterações no desempenho produtivo e na hematologia; a concentração de cobre no fígado é responsiva à quantidade suplementada desse mineral na ração; a concentração elevada do cobre na ração determina alterações hepáticas e, o tempo é fator determinante da ação detrimental do cobre para respostas fisiológicas do peixe.

Palavras-chave: mineral, hematologia, toxicidade, sulfato de cobre.

ABSTRACT. Copper levels in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* diets. The effects of different levels of dietary copper on growth performance and physiological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) were analyzed for 120 days. The experimental design was completely randomized, with five treatments (0.0; 4.0; 80.0; 160.0 and 320.0mg cooper/kg diet as cooper sulfate hepahydrate, 24.05% copper) and six replicates. One hundred and eighty fish, with 2.0 ± 0.05 g average initial weight, were kept into 30 aquaria (60L) with individual filter and aeration; water temperature was kept at $25.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$. An albumin-gelatin diet was formulated to contain 32.0% crude protein and 3,200 kcal of digestible energy/kg. The oxygen concentrations and pH were measured weekly. At the end of the experiment, the weight gain, feed conversion ratio and survival rate were determined. Erythrocytes number, hemoglobin concentration, hematocrit ratio, mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin concentration were analyzed as hematological parameters. Liver, bones, carcass and muscle copper concentrations were also determined and the liver morphology and coloration were evaluated. Based on the results, it was concluded that either absence or high levels of dietary copper did not determine alterations in Nile tilapia growth performance and hematology; the liver copper concentration is responsive to dietary copper supplementation; high levels of dietary copper determine hepatic alterations and the experimental period is a determinant damage action factor for copper in fish physiological responses.

Key words: mineral, hematology, toxicity, copper sulphate.

Introdução

Assim como outros minerais, o cobre é elemento dietético essencial para peixes (Knox *et al.*, 1982). Sabe-se que tanto a deficiência quanto o excesso desse mineral podem ser prejudiciais, causando alterações nas funções fisiológicas e na resposta imunológica, aumentando a susceptibilidade do animal a infecções.

Adequado suprimento de nutrientes é indispensável ao normal funcionamento do organismo e conseqüentemente ao melhor desempenho zootécnico de peixes. Níveis recomendados de inclusão dietética do cobre têm sido descritos para algumas espécies de peixes (Ogino e Yang 1980; Murai *et al.*, 1981).

O cobre possui importantes funções no organismo dos peixes, sendo necessário no metabolismo de vários nutrientes e como constituinte de diversas enzimas (NRC, 1993). Destaca-se como referência de sua importância a participação como cofator, dentre outras, da enzima ALA-desidrogenase, a qual participa na síntese do heme em sua incorporação no pigmento hemoglobina (Feldman *et al.*, 2000). É indiretamente responsável também pela formação do colágeno e da elastina, pela conversão da tirosina em melanina em destruição de ânions superóxido que são espécies reativas do oxigênio, potencialmente destrutivos para as células.

O excesso desse mineral pode causar efeitos nocivos ao organismo, como intoxicação hepática e formação de complexos insolúveis junto a outros minerais, resultando na não absorção. A deficiência de cobre pode causar anemia, má formação óssea, queda no apetite e retardo no crescimento (NRC, 1993).

Dessa forma, a presente pesquisa objetivou caracterizar os efeitos fisiológicos dos diferentes níveis de cobre para alevinos de tilápia do Nilo por meio do desempenho produtivo, das variáveis hematológicas e das concentrações de cobre nos tecidos do fígado, ossos, carcaça e filé.

Material e métodos

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos - AquaNutri - da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Unesp, laboratório associado ao Centro de Aquicultura da Unesp, Estado de São Paulo.

Foi selecionado um lote homogêneo de 180 alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com peso aproximado de $2,00 \pm 0,05$ g, provenientes da mesma desova vinda do Caunesp - Centro de Aquicultura da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, os quais foram aleatoriamente distribuídos em 30 aquários de 60L (6 peixes/aquário), em um delineamento experimental inteiramente casualizado

com 5 tratamentos e 6 repetições. Cada aquário foi provido de biofiltro, aeração e aquecedores individuais, sendo a temperatura controlada por termostato e mantida na faixa de conforto térmico para a espécie ($25,0^\circ \pm 1,0^\circ\text{C}$). Os aquários foram sifonados semanalmente, para a retirada de eventuais sobras de rações e de excretas e, durante o período experimental, foi mantido o fotoperíodo de 12L:12E. A qualidade físico-química da água foi monitorada semanalmente avaliando-se a concentração de oxigênio dissolvido (Oxímetro Digimed DM4) e o pH (peagômetro Tecnopon MPA 210).

Foi confeccionada uma ração purificada referência (Tabela 1) à base de albumina e gelatina, com 32,0% de proteína bruta e 3.200kcal/kg de energia digestível, sem a adição de cobre. A essa dieta foram adicionados 0,0; 4,0; 80,0; 160,0 e 320,0mg de cobre/kg de ração, na forma de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em quantidades equivalentes às propostas para esse mineral. O suplemento vitamínico e mineral utilizado era isento de cobre, sendo considerado, como fonte do mineral, o adicionado à dieta.

Tabela 1. Composição percentual e químico-bromatológica, cobre suplementado e cobre dietético das dietas experimentais.

Ingrediente	T1	T2	T3	T4	T5
Albumina	27,80	27,80	27,80	27,80	27,80
Gelatina	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Amido de milho	45,95	45,94	45,91	45,88	45,81
Celulose	5,40	5,40	5,40	5,40	5,40
B.H.T. ¹	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Óleo de soja	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Fosfato Bicalcico	5,33	5,33	5,33	5,33	5,33
Supl. vitamínico e mineral ²	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ³	0,00	0,0016	0,0332	0,0665	0,1330
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Proteína bruta (%)	30,29	31,64	30,45	30,41	30,39
Extrato Etéreo (%)	4,86	3,89	3,87	4,43	4,53
Matéria Seca (%)	90,20	91,00	91,70	91,40	92,60
Cu suplementado (mg/kg) ⁴	0	4	80	160	320
Cu da dieta (mg/kg)	0,08	0,16	0,24	0,28	0,43

¹ Antioxidante; ² Suplemento vitamínico e mineral (Supre Mais): vitamina A, 1.200.000 IU; vitamina D₃, 200.000 IU; vitamina E 12.000mg; vitamina K₃, 2.400mg; vitamina B₁, 4.800mg; vitamina B₂, 4.800mg; Cianocobalamina, 4.800mcg; vitamina B₃, 4.800mg; vitamina C, 48.000mg; Pantotenato de cálcio, 12.000mg; Niacina, 24.000mg; Ácido fólico, 1.200mg; Biotina, 48mg; Cloreto de colina, 108g; Cobalto, 10mg; Sulfato de cobre pentahidratado, zero*; ferro, 10.000mg; Iodo, 100mg; Manganês, 20.000mg; Selênio, 100mg; Sulfato de zinco, 3.000mg; Veículo q.s.p., 1.000mg; *adequado à pesquisa; ³ Contém 24,05% de cobre; ⁴ Valor de cobre proveniente da suplementação com a fonte $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Para a confecção das rações, todos os ingredientes foram homogeneizados em misturador automático. Posteriormente, foi acrescentada à mistura 30% de água na temperatura de 55°C, visando auxiliar no processo de gelatinização do amido. As rações foram então peletizadas, secas em estufa de circulação forçada a 55°C e, posteriormente, fracionadas nos diâmetros de 1,00mm, entre 1,70 e 2,36mm, sendo utilizadas de acordo com o tamanho dos peixes. As dietas permaneceram armazenadas a -20°C até sua utilização.

Ao início e ao final do período experimental, os peixes foram pesados e o consumo de ração

quantificado para avaliação do ganho de peso e taxa de conversão alimentar aparente. Foram determinados os valores de proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta e matéria seca das rações segundo protocolo apresentado pela AOAC (1984).

Os peixes foram arraçoados diariamente no período da manhã, às 8h 30min, e no período da tarde, às 14h 30min. e 17h 30min. Durante o arraçoamento, as dietas foram oferecidas de 2 a 3 vezes na tentativa de se atingir a saciedade dos peixes.

Ao final do período experimental, foram retirados 3 peixes de cada tratamento para coleta de fígado, ossos, carcaça e filé. Os fígados retirados foram também avaliados quanto a coloração e à morfologia.

Para determinação dos parâmetros hematológicos, foram utilizados três peixes/aquário, 15/tratamento, os quais foram anestesiados com benzocaína e sangrados com auxílio de seringa de 1mL banhada com anticoagulante EDTA a 3,0% através do vaso caudal. A determinação do número de eritrócitos foi realizada pelo método do hemocítômetro, utilizando solução de azul de toluidina Merck® a 0,01%. A taxa de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se kit comercial Hemoglobina Analisa Diagnóstica® para determinação colorimétrica. A porcentagem de hematócrito foi determinada utilizando-se a centrifuga para microhematócrito. As variáveis acima descritas foram avaliadas utilizando-se as técnicas descritas por Jain (1986). Foram determinados os índices hematimétricos; volume globular médio (VGM) e a concentração de hemoglobina globular média (CHGM), necessários para a classificação morfológica das anemias e para a avaliação da resposta eritropoiética.

Os resultados de desempenho produtivo e análise hematológica foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos, procedeu-se à aplicação da regressão polinomial.

Resultados e discussão

As análises físico-químicas da água dos aquários revelaram que os parâmetros avaliados mantiveram-se, durante todo o período experimental, dentro da faixa considerada ótima para a espécie, segundo Boyd (1990). Foram determinados valores médios de $26,00 \pm 1,30^\circ\text{C}$ para a temperatura; $6,70 \pm 1,20\text{mg/L}$ para o O_2D e $7,10 \pm 0,50$ para o pH. Destaca-se, dessa forma, que esses parâmetros não influenciaram os demais resultados deste estudo.

A Tabela 2 apresenta os dados médios de ganho de peso, conversão alimentar aparente e porcentagem de sobrevivência de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados com as dietas contendo os diferentes níveis de suplementação de cobre por 18 semanas. A

análise de variância revelou que as porcentagens de suplementação de cobre não resultaram em efeito significativo sobre o ganho de peso dos peixes. Embora não de forma significativa, observou-se que o nível de exigência nutricional desse mineral ($4,0\text{mg/kg}$) determinou o melhor ganho, enquanto a superdosagem de 320mg cobre/kg de ração proporcionou o menor ganho, sendo este, semelhante ao ganho de peso dos peixes que receberam a ração isenta de suplementação de cobre.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão do ganho de peso, conversão alimentar aparente e porcentagem de sobrevivência de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de cobre por 18 semanas¹.

Tratamento	Cobre (mg/kg)	Ganho de peso (g)	Conversão alimentar aparente	Sobrevivência (%)
1	0	$46,96 \pm 5,29$	$1,16 \pm 0,07$	$89,48 \pm 0,00$
2	4,0	$55,20 \pm 3,22$	$1,13 \pm 0,07$	$80,57 \pm 10,95$
3	80,0	$51,93 \pm 7,31$	$1,09 \pm 0,05$	$89,49 \pm 0,00$
4	160,0	$49,19 \pm 5,00$	$1,20 \pm 0,03$	$80,57 \pm 10,95$
5	320,0	$45,64 \pm 3,48$	$1,12 \pm 0,07$	$85,02 \pm 8,94$
ANOVA P	ns	ns	ns	ns

¹Médias isentas ou seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de F ($P > 0,05$).

Destaca-se, ainda, que houve tendência de queda no ganho de peso com o aumento da suplementação de cobre nas rações. No sentido de melhor explicitar esses resultados, aplicou-se o índice relativo de comparação (IRC), sendo atribuído índice 100,0% ao tratamento que continha o nível de cobre recomendado para essa espécie. Assim, pode-se observar que a maior concentração de cobre na ração determinou queda de aproximadamente 18,0% ao ganho de peso. Ainda que não seja estatisticamente significativo, tal resultado deve ser considerado expressivo se avaliada a importância econômica e de produção.

A literatura descreve, como efeitos de doses elevadas de cobre, entre outros, a diminuição no ganho de peso, menor crescimento e a piora na conversão alimentar (Watanabe, 1997). De forma oposta ao observado na presente pesquisa, Murai *et al.* (1981) observaram queda significativa no ganho de peso para o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) quando arraçoado com dietas suplementadas com 16,0 e 32,0mg cobre/kg na 4ª e 10ª sexta semanas experimentais. Os autores determinaram que a concentração de 1,5mg/kg foi suficiente para determinar bom desempenho produtivo e prevenir anemia. Tais resultados demonstraram que o bagre do canal pode ser considerado mais sensível ao mineral cobre do que a tilápia do Nilo.

Berntssen *et al.* (1999) avaliaram a suplementação de superdosagens de cobre (35,0; 500,0; 700,0; 900,0 e 1750,0mg cobre/kg) em rações para larvas de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) por 12 semanas. Segundo esses autores, o ganho de peso foi estatisticamente diferente a partir da suplementação de 500,0mg cobre/kg, sendo que a máxima

suplementação determinou queda de aproximadamente 50,0% no ganho de peso. Nesse mesmo sentido, Lanno *et al.* (1985) avaliaram a suplementação de doses elevadas de cobre na ração e observaram queda significativa no ganho de peso da truta arco-íris após 16 semanas, quando arraçadas com 730mg cobre/kg de ração.

A análise dos dados de conversão alimentar aparente (Tabela 2), assim como para o ganho de peso, não demonstrou diferença estatística significativa. A média da conversão alimentar aparente apresentada pelos peixes que receberam a ração com doses elevadas do mineral cobre foi semelhante à dos animais arraçados com 4,0mg de cobre/kg de ração, enquanto que a ausência de suplementação determinou aproveitamento 2,6% pior. Mesmo que a suplementação com o nível de exigência não tenha determinado o melhor valor para a conversão alimentar, o índice de 1,13 pode ser considerado adequado em condições experimentais e de cultivo.

Gatlin e Wilson (1986) determinaram, como exigência em cobre pelo bagre do canal, o valor de 5,0mg de cobre/kg de ração. Semelhante ao ocorrido na presente pesquisa, esses autores também não encontraram efeito significativo na porcentagem de ganho de peso e na conversão alimentar e na porcentagem de sobrevivência com as diferentes concentrações, após 13 semanas experimentais. Entretanto, de forma oposta, Murai *et al.* (1981) demonstraram, com o bagre do canal, que a suplementação com níveis maiores que 17,5mg cobre/kg resultou em piora significativa na conversão alimentar após 16 semanas.

Os valores médios da porcentagem de sobrevivência (Tabela 2) igualmente ao ganho de peso e à conversão alimentar não foram estatisticamente significativos. Em função das observações efetuadas no decorrer do período experimental, pode-se inferir que a mortalidade média aproximada de 15,0% pode ser devido a confrontos agonísticos ocorridos entre os animais, comportamento este típico da tilápia do Nilo. Essa hipótese pode ser ainda reforçada pelos ferimentos observados nos peixes mortos.

Igualmente aos resultados desta pesquisa, Berntssen *et al.* (1999) não observaram efeito significativo na porcentagem de mortalidade de larvas de salmão do Atlântico, após 12 semanas, mesmo com valores aproximadamente seis vezes maior (1750,0mg de cobre/kg de ração) que a concentração mais elevada (320mg/kg) utilizada na presente pesquisa. Pode-se, ainda, destacar que para valores menores de suplementação (0 a 40mg cobre/kg ração), Gatlin e Wilson (1986) também não determinaram diferença estatística significativa na porcentagem de sobrevivência de alevinos de bagre do canal após 13 semanas.

Avaliando-se de forma conjunta os resultados obtidos no desempenho produtivo (ganho de peso, conversão alimentar aparente e de sobrevivência), pode-se inferir que o período de 126 dias pode não ter sido suficiente para refletir de modo significativo os efeitos da suplementação de cobre para tilápia do Nilo. Ainda que o período experimental desta pesquisa e dos demais trabalhos apresentados seja semelhante, as diferenças das respostas fisiológicas demonstraram que a sensibilidade a esse mineral pode ainda diferir principalmente em função da espécie de peixe em estudo e do seu estágio de desenvolvimento. Observa-se, ainda, que, embora a literatura apresente, dentre os valores de desempenho produtivo, o de ganho de peso como o mais sensível a este mineral para a maioria das espécies de peixes, os mesmos se mostraram resistentes à presença do cobre em rações em função dos resultados de mortalidade observados.

Na Tabela 3, estão apresentados os valores médios da contagem de eritrócitos, taxa de hemoglobina, porcentagem de hematócrito, volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo diferentes níveis de suplementação de cobre por 18 semanas. Observa-se, nesta tabela, que tanto os parâmetros sanguíneos quanto os índices hematimétricos não foram significativamente influenciados ($P > 0,05$) pelas diferentes concentrações de cobre suplementadas nas dietas.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão da contagem de eritrócitos (Erit), concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (Htc), volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com rações contendo diferentes níveis de suplementação de cobre por 18 semanas.

Tratamento	Cobre (mg/kg)	Erit (10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Htc (%)	VGM ² (fL)	CHGM ³ (%)
1	0	1,61 ± 0,17	6,28 ± 1,11	25,43 ± 1,95	157,95 ± 17,39	24,90 ± 4,81
2	4,0	1,60 ± 0,33	7,34 ± 0,87	26,94 ± 1,88	168,38 ± 14,93	25,91 ± 3,51
3	80,0	1,51 ± 0,27	7,00 ± 0,99	27,36 ± 0,54	171,07 ± 27,75	25,64 ± 0,75
4	160,0	1,48 ± 0,09	6,48 ± 0,85	26,11 ± 0,45	172,97 ± 19,25	26,23 ± 3,62
5	320,0	1,51 ± 0,20	6,90 ± 0,74	26,71 ± 0,42	180,38 ± 31,02	27,23 ± 1,77

ANOVA P

ns

ns

ns

ns

ns

¹ médias isentas ou seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de F ($P < 0,05$); ² VGM (fL) = hematócrito x 10³ / nº. eritrócitos x 10⁶; ³ CHGM (%) = (hemoglobina x 100)/hematócrito.

Ressalta-se, porém, que a ausência de suplementação de cobre determinou valores sanguíneos considerados abaixo do referencial para peixes sadios, segundo Feldman *et al.* (2000), principalmente se analisarmos o número de eritrócitos, taxa de hemoglobina e porcentagem de

hematócrito. Esses autores apresentaram, para a tilápia do Nilo, os intervalos de 1,91 a 2,83 x 10⁶/μL para eritrócitos, 7,0 a 9,8g/dL para hemoglobina e 27,0% a 37,0%, para hematócrito.

Nas mesmas condições experimentais da presente pesquisa, Barros *et al.* (2002), avaliando a inter-relação entre a vitamina C e o mineral ferro, observaram que peixes arraçoados com a dieta sem suplementação desses micronutrientes apresentaram anemia microcítica e hipocrômica, característica da deficiência de ferro, com valores médios de 1,60 x 10⁶ para eritrócitos, 6,20g/dL para hemoglobina, 27,0% para hematócrito, 156,0 para VGM e 18,76 para CHGM. Os valores encontrados nos peixes que foram arraçoados com a dieta ausente de suplementação de cobre, nesta pesquisa (Tabela 3), assemelham-se aos apresentados por Barros *et al.* (2002).

Segundo Coles (1984), para que haja produção de eritrócitos, é necessário que exista suprimento adequado de globina, de minerais como ferro, cobre e cobalto e do fator hematopoietico responsável pela maturação normal e adequada das células. Esse autor enfatizou que, a ausência de um ou de mais fatores pode determinar eritropoiese anormal, caracterizada como produção de eritrócitos com menor taxa de hemoglobina, ou células atípicas deficientes numericamente e com anormalidade morfológica.

Comparando-se os valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito encontrados nesta pesquisa (Tabela 3) com os apresentados pela literatura, podemos inferir que os peixes que receberam a ração isenta de suplementação de cobre desenvolveram anemia. Kleemann (2003) determinou a exigência em ferro pela tilápia do Nilo e observou anemia microcítica e hipocrômica nos peixes que receberam a dieta isenta de suplementação de ferro. O autor não determinou diferença significativa no número de eritrócitos (1,87 x 10⁶/μL) para os peixes anêmicos, porém os valores de hemoglobina (6,51g/dL) e hematócrito (25,18%) foram estatisticamente inferiores aos demais tratamentos. Entretanto os valores encontrados nesta pesquisa nos peixes que receberam a dieta ausente se mostraram semelhantes aos acima apresentados por Kleemann (2003).

Porém, os resultados apresentados (Tabela 3) pelos peixes que receberam a suplementação de 4,0mg de cobre/kg ração, cujo valor se apresenta como sendo a exigência da espécie, não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$). Ressalta-se, contudo, que, nesse tratamento-controle, a taxa de hemoglobina e a porcentagem de hematócrito estão aproximadamente 15,0% e 6,0% superiores, respectivamente, e que, excetuando-se o valor médio de eritrócitos, a taxa de hemoglobina e a porcentagem de hematócrito estão dentro do intervalo de valores obtidos por Kleemann

(2003), com a mesma espécie e sob mesmas condições experimentais a saber: eritrócito (1,73 a 2,03 x 10⁶/μL); hemoglobina (6,51 a 7,82g/dL) e hematócrito (26,5% a 30,0%).

Por ser o cobre um mineral com funções ligadas diretamente com o metabolismo do ferro, a anemia também pode ocorrer quando da ausência desse elemento. Segundo Feldman *et al.* (2000), o cobre é cofator da enzima ALA-desidrogenase necessária na síntese do heme, componente da hemoglobina. Está também relacionado com a maior absorção de ferro por meio da enzima ceruloplasmina (ferroxidase) que converte o ferro do estado ferroso ao estado férrico, o qual pode se ligar à transferrina, proteína plasmática transportadora, e, conseqüentemente, aumentar sua disponibilidade também para a produção de hemoglobina.

Dessa forma, na presente pesquisa, a ausência de suplementação de cobre na ração pode ter diminuído a concentração de ferro disponível para a formação de hemoglobina e de eritrócitos e, por conseqüência, decrescido a porcentagem de hematócrito no sangue dos peixes que receberam esta dieta. Tal hipótese pode ser reforçada por Baker e Ammerman (1995), segundo os quais a deficiência de cobre tem efeitos detrimenais em numerosos órgãos e tecidos, incluindo o sistema hematopoético.

Ainda que a literatura apresente esta ação da ausência de cobre no sistema hematopoietico, Murai *et al.* (1981) não detectaram anemia nos alevinos de bagre do canal arraçoados com a dieta ausente de suplementação de cobre após 16 semanas. O mesmo foi observado por Gatlin *et al.* (1989) em estudo com a mesma espécie de peixe por 12 semanas.

A não-significância entre as médias (Tabela 3) encontradas, neste estudo, pode ter ocorrido em conseqüência do tempo experimental adotado. Comparando-se com pesquisas realizadas por Barros *et al.* (2002) e Kleemann (2003) também com a tilápia do Nilo e com rações ausentes de ferro, principal mineral envolvido na eritropoiese, os autores determinaram anemia, em média, após 23 semanas experimentais. Dessa forma, pode-se ressaltar que os peixes, igualmente aos outros animais, necessitam de longo período para desenvolver anemia por deficiência nutricional.

Ainda que não seja de forma significativa, pode-se observar também que houve tendência de diminuição dos valores sanguíneos, comparando-se com a suplementação de 4,0mg cobre/kg, com o aumento da concentração de cobre na ração. Em média, essa queda foi de 7,0; 8,0% e 1,0% para eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, respectivamente.

O mineral cobre, juntamente com o ferro, é considerado catalisador de reações formadoras de espécies reativas do oxigênio (radicais livres), os quais podem iniciar a oxidação de lipídeos insaturados, com efeito direto na estrutura e na função

da membrana (Araújo, 2001). Segundo Jobling (1994), espécies de peixes que são expostas a altas concentrações de cobre na água podem manifestar sinais clínicos de intoxicação tais como, danos nas brânquias e em outros órgãos internos. O autor ainda resalta que o processo de peroxidação dos lipídeos, o qual envolve a deteriorização oxidativa de ácidos graxos poliinsaturados, pode ocasionar injúrias nos tecidos. Dessa forma, pode-se inferir que a superdosagem de cobre utilizada nesta pesquisa pode ter determinado a oxidação dos lipídeos de membrana das células sanguíneas, com possível rompimento destas, o que teria resultado na queda dos parâmetros avaliados. Semelhante ao observado nesta pesquisa, porém de modo significativo, Knox *et al.* (1982) observaram, em experimento realizado com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), queda dos valores de eritrócitos e de hemoglobina quando comparados com peixes que receberam ração suplementada com 15mg cobre/kg ração.

Do mesmo modo ao ocorrido com os parâmetros sanguíneos dos peixes que receberam a ração ausente de suplementação de cobre (Tabela 3), o tempo experimental pode ter sido decisivo para a não-deteção de diferença estatística. Considerando-se os resultados obtidos no desempenho produtivo juntamente com as avaliações hematológicas, pode-se observar que a ausência e a suplementação excessiva do mineral cobre podem prejudicar o estado nutricional dos peixes.

A Tabela 4 apresenta os valores médios dos minerais cobre, ferro, zinco e selênio no fígado, ossos, filé e carcaça de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de cobre por 18 semanas. Pode-se observar que houve aumento da concentração de cobre no fígado em consequência do aumento da suplementação, sendo este de aproximadamente 6,5 vezes maior quando comparado com a concentração apresentada no fígado dos peixes arraçoados com a ração ausente de cobre. De forma oposta, a concentração de zinco nesse mesmo órgão decresceu e o ferro e o selênio não apresentaram tendência de alteração.

Tabela 4. Valores de cobre, ferro, zinco e selênio no fígado, ossos, carcaça e filé de alevinos de tilápia do Nilo arraçoados com dietas contendo diferentes níveis de suplementação de cobre por 18 semanas.

Tratamento	Cobre suplementado (mg/kg)	Cobre mg/kg	Ferro mg/kg	Zinco mg/kg	Selênio mg/kg
Fígado					
1	0	0,305	1,033	0,223	0,869
2	4,0	0,411	0,998	0,235	0,716
3	80,0	0,784	0,947	0,129	0,877
4	160,0	0,966	1,071	0,070	0,757
5	320,0	1,925	0,775	0,025	1,038
Ossos					
1	0	0,033	0,145	0,100	0,346
2	4,0	0,033	0,077	0,111	0,310

3	80,0	0,033	0,190	0,122	0,332
4	160,0	0,022	0,210	0,133	0,266
5	320,0	0,044	0,255	0,122	0,368
Carcaça					
1	0	0,124	0,363	0,062	0,747
2	4,0	0,157	0,440	0,073	0,451
3	80,0	0,126	0,421	0,042	0,316
4	160,0	0,196	0,392	0,065	0,501
5	320,0	0,105	0,358	0,042	0,358
Filé					
1	0	0,095	0,738	0,127	0,601
2	4,0	0,190	0,433	0,127	0,623
3	80,0	0,116	0,370	0,116	0,613
4	160,0	0,107	0,385	0,096	0,600
5	320,0	0,106	0,404	0,096	0,648

Andriguetto *et al.* (1990) descreveram o fígado como principal órgão armazenador de cobre e destacaram que a concentração do mesmo pode variar de acordo com a espécie e quantidade desse mineral presente nas rações. Perkins *et al.* (1996) determinaram, após 10 semanas, que o aumento do cobre hepático do bagre do canal foi evidente conforme se aumentou a quantidade de cobre ingerido.

Ogino e Yang (1980) determinaram que os níveis de cobre no fígado de carpa comum (*Cyprinus carpio*) e truta arco-íris foram responsivos à concentração desse mineral na dieta. Entretanto Gatlin e Wilson (1986) não observaram diferença significativa na concentração de cobre no fígado e no coração, quando a suplementação variou de 1 a 10mg cobre/kg de ração.

Segundo Hill e Matrone (1970), o zinco possui efeito antagonístico ao cobre devido a sua similar natureza, competindo, assim, por sítios de ligação das proteínas responsáveis pela absorção do mineral. Pode-se observar, nos resultados desta pesquisa (Tabela 4), que a concentração de zinco no fígado diminuiu com o aumento de cobre na ração.

Berntssen *et al.* (1999) destacaram que, embora exista esse efeito antagonístico entre esses minerais, eles não detectaram diferença na concentração de zinco corpóreo de larvas do salmão do Atlântico com o aumento da suplementação de cobre na ração, mesmo em níveis elevados (1750mg/kg). Porém esses mesmos autores observaram queda significativa da concentração de selênio na carcaça para o nível de 500mg cobre/kg de ração. Os autores sugeriram que a formação de complexos insolúveis de cobre-selênio no lúmen intestinal reduzem a biodisponibilidade do selênio dietético.

Nos demais tecidos avaliados nesta pesquisa (Tabela 4), não determinou-se tendência de alterações nas concentrações, reforçando o conceito de que o fígado é o principal órgão de depósito desse mineral. A avaliação macroscópica desse órgão revelou aspecto comum, com coloração avermelhada característica e consistência normal para os órgãos dos peixes que receberam suplementação de 0,0; 4,0; 80,0 e 160mg de cobre/kg de ração.

No entanto a maioria dos fígados dos peixes arraçoados com a dieta suplementada com 320mg de cobre/kg de ração apresentaram-se em estado degenerativo, com coloração marrom-opaca, manchas enegrecidas e consistência friável. Segundo Tort *et al.* (1996), o fígado demonstra ser o primeiro órgão a estocar o cobre em peixes em consequência desse acúmulo, pode apresentar danos fisiológicos e histopatológicos causados por este elemento.

Somando-se os resultados da análise macroscópica dos fígados aos demais parâmetros avaliados nesta pesquisa, observou-se que as altas dosagens de cobre tendem a causar danos no organismo dos peixes, reforçando a hipótese de piora do desempenho produtivo e das características hematológicas. Soma-se, ainda, o período experimental prolongado o qual, certamente determinaria diferenças significativas aos resultados encontrados.

Com base nesses resultados pode-se concluir que a ausência e utilização de superdosagem de cobre em rações para tilápia do Nilo não determinaram alterações no desempenho produtivo e na hematologia; que a concentração de cobre no fígado é responsiva à quantidade desse mineral suplementado na ração; a concentração elevada de cobre em rações para peixes determina alterações hepáticas e o tempo é fator determinante da ação detrimenental do cobre para respostas fisiológicas do peixe.

Referências

- AOAC-ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 14. ed. Virginia, 1984.
- ANDRIGUETTO, J. M; *et al.* *Nutrição Animal*. São Paulo: Nobel, 1990.
- ARAÚJO, J. M. A. *Química dos alimentos*. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- BAKER, D.H.; AMMERMAN, C.B. Cooper Bioavailability. In: AMMERMAN, C.B. *et al.* Bioavailability of nutrients for animals. New York: Academic Press, 1995, cap.7, p.127-56.
- BARROS, M. M. *et al.* Effects of soybean meal replacement and iron supplementation on growth, immune response and resistance of Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 207, p.263-79, 2002.
- BERNTSEN, M.H.G. *et al.* Effects of elevated dietary copper concentrations on grown, feed utilisation and nutritional status of Atlantic salmon (*Salmo solar* L.) fry. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 174, p.167-181, 1999.
- BOYD, C. E. Water quality management for ponds fish culture. Development in aquaculture and fisheries science. New York: Elsevier Scientific Publishing Company, 1990.
- COLES, E. H. *Patologia Clínica Veterinária*. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984.
- FELDMAN, B. F.; *et al.* *Schalm's veterinary hematology*. 5. ed. Philadelphia: Donna Balado, 2000.
- GATLIN, D.M.; WILSON, P.W. Characterization of iron deficiency and the dietary iron requirement of fingerling channel catfish. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 52, p.191-198, 1986.
- GATLIN, D.M. *et al.* Effects of various levels of dietary copper and zinc of channel catfish. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 76, p.127-134, 1989.
- HILL, C. H.; MATRONE, G. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. *Feed. Proc.*, Bethesda, v. 29, p.1474-1481, 1970.
- JAIN, N.C. *Schalm's veterinary haematology*. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986.
- JOBLING, M. *Environmental stressors*. In: JOBLING, M. (Ed.). *Fish Bioenergetics*. London: Chapman and Hall, 1994. cap.5, p.285-8.
- KLEEMANN, G. K. *Exigência nutricional em ferro pela tilápia do Nilo Oreochromis niloticus*. 2003. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
- KNOX, D. *et al.* Effects of dietary copper and copper:zinc ratio on rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 27, p.111-119, 1982.
- LANNO, R.P. *et al.* Maximum tolerable and toxicity levels of dietary copper in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Richardson. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 49, p.257-268, 1985.
- MURAI, T. *et al.* Effects of dietary copper on channel catfish. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 22, p.353-357, 1981.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL Nutrient requirements of fish. Washington: National Academy Press, 1993.
- OGINO, C.; YANG, G. Y. Requirement for carp and rainbow trout for dietary manganese and copper. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, Tokyo, v. 46, p.455-458, 1980.
- PERKINS, E. J. *et al.* Sexual differences in mortality and sublethal stress in channel catfish following a 10 week exposure to copper sulfate. *Aquat. Toxicol.*, Amsterdam, v. 37, p.327-339, 1996.
- TORT, L. *et al.* The effect of cadmium exposure and stress on plasma cortisol, metallothionein levels and oxidative status in rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, New York, v. 114, p.29-34. 1996.
- WATANABE, T. *et al.* Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 151, p.185-207. 1997.

Received on April 05, 2004.

Accepted on December 09, 2004.