

## PERFIL HEMATOLÓGICO DE TILÁPIAS-DO-NILO ALIMENTADAS COM DIETAS CONTENDO DIFERENTES LIPÍDEOS E ESTIMULADAS POR BAIXA TEMPERATURA<sup>1</sup>

DANIEL DE MAGALHÃES ARAUJO<sup>2\*</sup>, ADEMIR CALVO FERNANDES JUNIOR<sup>3</sup>, CAROLINE PELEGRINA TEIXEIRA<sup>3</sup>, LUIZ EDIVALDO PEZZATO<sup>3</sup>, MARGARIDA MARIA BARROS<sup>3</sup>

**RESUMO** – O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da adição de lipídeos e suas misturas nas rações sobre a hematologia da tilápia-do-nilo antes e após estímulo pelo frio. Foram utilizados 112 juvenis invertidos sexualmente para machos, com peso médio inicial de 30g ( $\pm 2,65$ ), distribuídos em 28 aquários de 40L e alimentados com 7 dietas contendo: óleo de soja (OS); óleo de peixe (OP); sebo bovino (SB); e as misturas de OS+OP, OS+SB, OP+SB e OS+OP+SB. O arraçoamento foi feito quatro vezes ao dia até a saciedade aparente. Ao final de 35 dias e após 7 dias de estímulo pelo frio (13,0°C) foram determinados os parâmetros hematológicos. No período anterior ao estímulo pelo frio, os peixes que consumiram a dieta contendo SB apresentaram a maior concentração de leucócitos e os que consumiram OP+SB a menor concentração de leucócitos. A proteína plasmática total foi maior nos peixes que consumiram a dieta com a mistura de OS+OP+SB, sendo menor nos que consumiram OS no período anterior ao estímulo pelo frio. Nenhuma das fontes de ácidos graxos promoveram mudanças na saúde e resistência ao frio, sendo que o estímulo pelo frio não causou depressão severa do estado de saúde dos peixes.

**Palavras-chave:** Nutrição de peixes. Óleo de peixe. Óleo de soja. *Oreochromis niloticus*. Saúde de peixes.

### HEMATOLOGICAL PROFILE OF NILE TILAPIA FED DIETS WITH DIFFERENT LIPIDS AND CHALLENGED BY COLD

**ABSTRACT** – The goal of this paper was to determine the effects of seven diets with different fatty acids sources in hematology of Nile tilapia before and after cold stimulus. Seven diets, with 3% of fatty acid source, were formulated: soybean oil (OS); fish oil (OP); beef tallow (SB) and mixtures of OS+OP; OS+SB; OP+SB e OS+OP+SB. Fish (112 male of Nile tilapia of 30,0  $\pm$  2,65g) were totally randomly distributed, with four replicates, into 28 plastic aquaria (40 L; 4 fish per aquarium). Fish were fed four times per day for 35 days. At 35th day and also after seven days cold stimulus blood was collected and the profile hematological was evaluated. Leucocytes numbers were reduced in fish fed a SB and fish oil combination diet and were highest in fish fed SB diet before cold stimulus. Plasma protein was reduced in fish fed soybean oil diets and highest in fishes fed a combination of soybean oil, fish oil and SB diets. Anything fatty acids source promotes effective changes in fish health and cold tolerance promotion. Cold don't drastically reduced fish general health status.

**Keywords:** Fish health. Fish nutrition. Fish oil. *Oreochromis niloticus*. Soybean oil.

\*Autor para correspondência

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 04/03/2014; aceito em 26/09/2014.

<sup>2</sup>Instituto Federal de Alagoas – IFAL, Campus Satuba. Rua 17 de Agosto s/n, Zona Rural, Cep: 57120-000. Satuba, AL, danielzootecnista@yahoo.com.br.

<sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal. Fazenda Experimental Lageado, Caixa Postal 560, CEP 18610-000 Botucatu, SP, ademircfjunior@hotmail.com, krol007@hotmail.com, epezzato@fmvz.unesp.br, mbarros@fmvz.unesp.br.

## INTRODUÇÃO

A aquicultura tem se estabelecido como uma das mais promissoras atividades do agronegócio brasileiro, sendo a piscicultura seu mais importante ramo. Dentre as espécies de peixes produzidas no Brasil, as tilápias são as que mais se destacam, representando 39% do total de pescados proveniente da piscicultura continental (BRASIL, 2010).

A tilápia-do-nilo se destaca por possuir rápido crescimento em cultivo intensivo e rusticidade, sendo uma das espécies mais cultivadas no mundo (VERAS et al., 2013). Sua capacidade de aclimação permite a produção em diferentes sistemas de cultivo, com bom desempenho zootécnico em condições ambientais diversas. Com relação a temperatura de cultivo, aquelas abaixo de 18°C e acima de 30°C, são exacerbadamente estressantes e devem ser evitadas (LIM; WEBSTER, 2006).

A adequada nutrição da espécie também consiste em fator determinante para otimizar o desempenho e manter a homeostase, sendo os lipídeos fundamentais nesse papel. Os lipídeos são um grupo heterogêneo de compostos, insolúveis em água e extraídos dos tecidos e células por solventes não polares. São a principal forma de armazenamento de energia corporal devido a sua característica hidrofóbica, possibilitando o acondicionamento das moléculas de triacilgliceróis no interior dos adipócitos e pela quantidade de energia fornecida em relação ao carboidrato e à proteína. Além disso, participam de diversas outras funções orgânicas, como na constituição da parede celular, formação dos hormônios esteroides e na produção de mensageiros intra e extracelulares (LEHNINGER et al., 1997). São responsáveis, ainda, pela manutenção da flexibilidade e permeabilidade das membranas celulares, fontes de ácidos graxos (AG) essenciais e que auxiliam na absorção de vitaminas lipossolúveis (SHIAU, 2002).

As fontes mais comuns de AG utilizados nas rações para peixes são os óleos de peixes marinhos e de água doce, além do óleo de soja. Entretanto, outras fontes como os óleos de milho, girassol, canola e linhaça, além das gorduras de aves (óleo de abate-douro), suínas e bovinas (sebo) também são passíveis de utilização, ainda que em substituição parcial às fontes tradicionais, de acordo com critérios nutricionais e econômicos.

Óleos e gorduras utilizados na composição das rações apresentam diferentes perfis de AG, conferindo características próprias que exercerão notória influência sobre os processos digestivos e metabólicos dos peixes que os consomem, podendo, com isto, ter ação sobre os mecanismos fisiológicos responsáveis pela manutenção da saúde dos peixes, com possibilidade de modulação pela utilização dos óleos e suas misturas nas rações.

A hematologia, embora ainda não seja regularmente usada nas fazendas de produção de peixes, de acordo com Hrubec et al. (2000), pode fornecer

informações importantes para o diagnóstico de saúde destes animais, já que valores de referência estão sendo estabelecidos. Como vantagens da utilização desta ferramenta destacam-se a facilidade de análise a partir do uso de *kits* de diagnóstico laboratoriais, com a realização de grande número de amostras em curto período de tempo, além de, normalmente, não provocar a morte do animal (MAITA, 2007). Com isto, a utilização desta ferramenta para diagnosticar a influência da nutrição na saúde dos peixes vem ganhando importância, principalmente porque há direta correlação entre a boa nutrição e a higidez dos peixes. Neste sentido, com a expansão da indústria aquícola são necessárias ferramentas para monitorar o nível de saúde dos peixes, utilizando métodos de custo acessível e não letais (HRUBEC et al., 2000).

Com o presente estudo objetivou-se avaliar os efeitos do uso de diferentes lipídeos e suas misturas nas rações sobre a hematologia da tilápia-do-nilo antes e após serem submetidas ao estímulo pelo frio.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (AquaNutri), campus de Botucatu. Foram utilizados 112 tilápias-do-nilo invertidas sexualmente para machos, provenientes da Piscicultura Fernandes<sup>®</sup>. Os peixes foram inicialmente alojados em tanques circulares de 250L por 7 dias de forma a haver ambientação às instalações e ao manejo empregado no laboratório para posterior utilização. Após a ambientação, os juvenis (28,37 ± 1,6g) foram distribuídos em 28 tanques experimentais com capacidade de 40L, em uma densidade de 4 peixes por aquário. Os aquários possuíam sistema de filtragem individual e aquecimento controlado por sistema digital integrado para a manutenção constante da temperatura da água (26,0°C), além de aeração.

Foram confeccionadas 7 rações experimentais contendo 3,00% das seguintes fontes de ácidos graxos (AG): óleo de soja (OS), como fonte de AG ômega 6; óleo de peixe (OP), como fonte de AG ômega 3; e sebo bovino (SB), como fonte de AG saturados; e misturas equivalentes, entre eles OS+OP, OS+SB, OP+SB ou OS+OP+SB, totalizando 7 tratamentos, cada qual com 4 repetições. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. As dietas isonutricionais (Tabela 1) foram balanceadas de acordo com as exigências nutricionais da espécie (NRC, 1993), de forma a apresentarem 28,00% de proteína digestível e 3.350 kcal/kg de energia digestível. Os peixes foram arraçoados até a saciedade aparente quatro vezes ao dia (08h:30min, 11h:30min, 14h:30min e 17h:30min) de forma a minimizar possíveis sobras.

Para a confecção das rações, os ingredientes foram moídos, peneirados em peneira de 0,8mm,

homogeneizados manualmente antes e após serem umedecidos, em cerca 20% do peso, com água aquecida a 55°C, sendo posteriormente extrusadas em peletes de aproximadamente 3,5mm, tamanho este adequado ao da boca dos peixes. Após a extrusão, as rações foram secas em estufa com circulação forçada de ar por 24 horas em temperatura de 55°C, resfriadas à temperatura ambiente, ensacadas e identifica-

das conforme o tratamento, sendo armazenadas em freezer a -10°C até a utilização.

Para a manutenção da qualidade da água, os aquários foram sifonados, para a retirada de matéria orgânica em excesso, como fezes e eventuais sobras de ração. Este procedimento foi realizado diariamente, com substituição de aproximadamente 30% da água de cada aquário.

**Tabela 1.** Composição químico-bromatológica das rações experimentais

Ingrediente	%
Farelo de soja	50,96
Farelo de algodão (40%)	5,00
Farinha de peixe	7,00
Farelo de trigo	5,00
Quirera de arroz	23,42
Óleo ou Gordura e suas Misturas*	3,00
L-Lisina	0,50
DL-Metionina	0,58
Treonina	0,37
Fosfato bicálcico	3,51
Vitamina C	0,04
Sal comum	0,10
Suplemento Vitamínico e Mineral <sup>1</sup>	0,50
BHT <sup>2</sup>	0,02
<b>Total</b>	<b>100,00</b>
<b>Valores Calculados</b>	<b>Composição Química</b>
Proteína Digestível	28,00
ED, kcal/kg	3.350,00
ED/PD	105,34
Extrato Etéreo, %	6,61
Ca Total	1,61
P Disponível	0,84
Ca/P Disponível	1,91
Metionina + Cistina Digestível	0,95
Lisina Digestível	2,70
Triptofano Digestível	0,31
Treonina Digestível	1,32
AAS Digestíveis	1,18
Fibra Bruta	5,15

\*Óleo de Soja (OS) – T1; Óleo de Peixe (OP) – T2; Sebo Bovino (SB) – T3; OS+OP (1,5+1,5%) – T4; OS+SB (1,5+1,5%) – T5; OP+SB (1,5+1,5%) – T6; OS+OP+SB (1,0+1,0+1,0%) – T7. <sup>1</sup>Níveis de garantia por quilograma do produto: Vit. A=1.200.000UI; Vit. D3=200.000UI; Vit. E=12.000mg; Vit. K3=2.400mg; Vit. B1=4.800mg; Vit. B2=4.800mg; Vit. B6=4.000mg; Vit. B12=4.800mg; Ác. Fólico=1.200mg; Pantotenato Ca=12.000mg; Vit. C=48.000mg; Biotina=48mg; Colina=65.000mg; Niacina=24.000mg; Ferro=10.000mg; Cobre=6.000mg; Manganês=4.000mg; Zinco=6.000mg; Iodo=20mg; Cobalto=2mg; Selênio=20mg. <sup>2</sup>Antioxidante = BHT (Beta-hidroxi-tolueno).

Para a avaliação dos parâmetros hematológicos (ao final de 35 dias) foram utilizados 5 peixes por tratamento, sendo estes anestesiados com benzocaína, na concentração de 1,0g do anestésico em 15L de água, e após a completa insensibilização, através da punção vaso caudal, foi realizada a coleta do sangue, com seringa de 1,0 mL banhada com anticoagulante (EDTA 3,0%).

A contagem do número de eritrócitos e leucócitos foi realizada pelo método do hemocítmetro em câmara de Neubauer, utilizando como corante e diluente a solução azul de toluidina a 0,01%, em pipeta de Thoma. A taxa de hemoglobina (Hb) foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utili-

zando-se o kit comercial Analisa Diagnóstica® para determinação fotocolorimétrica, segundo Collier (1944). A porcentagem de hematócrito (Htc) foi determinada pelo método do microhematócrito, segundo Goldenfarb et al. (1971). A proteína plasmática total foi mensurada por meio do uso de refratômetro manual de Goldberg, pela quebra do tubo de microhematócrito, logo acima da camada de leucócitos, e após a leitura do hematócrito (JAIN, 1986). Posteriormente, foram calculados os índices hematimétricos, segundo Wintrobe (1934).

Após as avaliações hematológicas os peixes que não tiveram o sangue coletado permaneceram na mesma estrutura, sendo o sistema de aquecimento

desligado com o objetivo de reduzir gradativamente a temperatura e dar início ao estímulo pelo frio. Os mesmos foram transferidos para a sala de desafio térmico, onde a temperatura do ar foi reduzida com o uso de condicionadores de ar, até a temperatura da água se estabelecer em 13,0°C, sendo os animais mantidos nestas condições por 7 dias.

Ao final do período de estímulo pelo frio foram avaliadas a taxa de sobrevivência e os mesmos parâmetros hematológicos estudados anteriormente, quais sejam: contagem do número de eritrócitos e leucócitos; taxa de hemoglobina; porcentagem de hematócrito; e proteína plasmática total. Foram também calculados os índices hematimétricos absolutos: volume corpuscular médio; e concentração de hemoglobina corpuscular média. A avaliação geral dos animais para verificar possível mortalidade foi efetuada duas vezes ao dia, juntamente com a alimentação dos animais.

As médias de todas as variáveis estudadas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e sempre que houve diferença significativa foi utilizado o teste de Tukey para comparação das mesmas, sendo adotado o nível de 5,0% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de eritrócitos, o percentual de hematócrito, a taxa de hemoglobina e o número de leucócitos de tilápias que consumiram dietas com fontes de AG estão apresentados na Tabela 2. A concentração de proteína plasmática total, o volume corpuscular médio e a concentração de hemoglobina corpuscular média compõem a Tabela 3.

O número de eritrócitos, o percentual de hematócrito, a taxa de hemoglobina, o volume corpuscular médio e a concentração de hemoglobina corpuscular média das tilápias não foram influenciados ( $P>0,05$ ) pelo consumo de rações com as fontes de AG e suas misturas, antes e após serem submetidas ao estímulo pelo frio. O número de leucócitos e a proteína plasmática total das tilápias diferiram ( $P<0,05$ ) em função do consumo das rações conforme as fontes de AG apenas no período anterior ao estímulo pelo frio.

Os peixes que consumiram a dieta com a mistura de óleo de peixe e sebo bovino, antes do estímulo pelo frio, apresentaram a menor concentração de leucócitos, enquanto os que receberam a dieta com sebo bovino apresentaram a maior concentração (26.000 e 84.250  $\mu\text{L}$ , respectivamente), sendo que ambas não diferiram dos demais tratamentos. A proteína plasmática total, antes do estímulo pelo frio, foi menor nos peixes que consumiram a dieta com óleo de soja e maior nos peixes que consumiram a dieta com a mistura dos óleos de soja, peixe e sebo bovino (1,84 e 2,34 mg/dL, respectivamente), sendo que ambas não diferiram dos demais tratamentos.

Yildirim-Aksoy et al. (2007) estudaram os efeitos do consumo de rações com 7,0% dos óleos de

milho, peixe (*Brevoortia tyrannus*), linhaça, sebo bovino e misturas equivalentes dos óleos sobre parâmetros hematológicos e resposta imune de tilápia-do-nilo. Diferente do que ocorreu no presente estudo, em que não houve efeito do tipo de lipídeo da dieta sobre os eritrócitos e os autores determinaram maior número destas células nos peixes que consumiram as dietas que continham apenas o óleo de peixe, mas não diferiram entre os outros tratamentos. Além disso, resultados inversos aos observados na pesquisa citada foram obtidos no presente estudo, no que se refere ao número de leucócitos. Os autores supracitados afirmaram que as tilápias que consumiram as dietas contendo óleo de peixe possuíam maior número de leucócitos, enquanto os outros tratamentos não diferiram entre si. Mourent et al. (2005), ao estudarem os efeitos do consumo de dietas contendo óleo de peixe e a combinação de 60% de óleo de peixe com 40% de óleo de colza, de linhaça e de oliva sobre a resposta hematológica do *Dicentrarchus labrax* L. também observaram maior número de leucócitos circulantes em peixes que consumiam óleo de peixe.

Já no presente estudo, no período anterior ao estímulo pelo frio, os peixes que receberam dietas contendo a combinação de óleo de peixe e sebo bovino apresentaram a menor contagem de leucócitos e os que receberam dietas contendo sebo bovino apresentaram as maiores, sendo que ambas não diferem das outras dietas, inclusive das que continham somente óleo de peixe. Maior contagem de leucócitos devido ao consumo de dietas com sebo bovino é divergente dos relatos observados na literatura. Normalmente dietas contendo somente fontes de AG saturados são menos eficientes na promoção da saúde dos animais quando comparadas às contendo níveis moderados de AG poliinsaturados ou altamente insaturados. Mourent et al. (2005) obtiveram maior contagem de leucócitos em robalos (*Dicentrarchus labrax* L.) alimentados com óleo de peixe. No presente estudo, tal resposta pode ter ocorrido devido às diferenças nos períodos experimentais, pela quantidade das fontes de AG incluídas nas rações, bem como às demais condições experimentais.

Como os leucócitos são a somatória das células da série branca e a sua maior quantidade está diretamente relacionada com a maior capacidade de proteção imune (RANZINI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004), então a redução do número total de leucócitos, que determina um quadro de leucopenia, supostamente reduz a capacidade de defesa do sistema imune. Desta forma, infere-se que os peixes que consumiram a dieta contendo sebo bovino poderiam estar mais preparados para situações de estresse, sendo o oposto observado para os peixes, que receberam a dieta com a combinação de óleo de peixe e sebo bovino. Entretanto, como ocorreu de forma isolada apenas para esta variável, sem um padrão de resposta, e também não foi estudada a diferenciação celular, que poderia indicar mais especificamente quais células estariam sendo responsáveis pelo seu

aumento, não há elementos suficientes para a referida afirmação. Talvez pelo coeficiente de variação ter sido o mais alto dentre todas as variáveis analisadas neste estudo, possa ter interferido no aparecimento

das diferenças estatísticas para a contagem de leucócitos, principalmente quando comparados os períodos. Alto coeficiente de variação para esta variável também foi descrito por Araujo et al. (2011).

**Tabela 2.** Parâmetros sanguíneos (n = 5) de tilápias-do-nylo alimentadas com rações com óleos de soja, peixe, sebo bovino e suas misturas antes e após estímulo pelo frio.

Tratamento	Eritrócito (10 <sup>6</sup> /μL)		Hematócrito (%)		Hemoglobina (g/dL)		Leucócitos (μL)	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
OS	1,63 ±0,33b	1,22 ±0,40a	22,90 ±3,91	19,20 ±5,16	5,14 ±0,85	4,49 ±1,32	57.600AB ±34.435	54.600 ±18.511
OP	1,80 ±0,38	1,57 ±0,06	26,00 ±4,11	24,90 ±2,46	5,70 ±0,77	5,54 ±0,64	41.500AB ±18.851	28.700 ±14.724
SB	1,78 ±0,31	1,35 ±0,38	25,40 ±1,78	22,20 ±2,77	5,60 ±0,64	4,96 ±0,78	84.250B ±20.194	56.600 ±23.964
OS+OP	1,85 ±0,36	1,65 ±0,67	24,80 ±3,85	26,00 ±3,98	5,70 ±0,68	5,85 ±0,63	44.500AB ±25.382	26.200 ±6.915
OS+SB	1,87 ±0,21	1,33 ±0,48	23,30 ±2,44	22,70 ±3,21	5,53 ±0,82	5,30 ±0,80	45.900AB ±26.082	52.125 ±13.030
OP+SB	1,65 ±0,08	1,28 ±0,33	21,80 ±2,66	23,10 ±1,14	5,42 ±0,95	5,32 ±0,32	26.000A ±8.023	36.400 ±15.537
OS+OP+SB	1,74 ±0,19b	1,18 ±0,16a	23,60 ±1,67	20,10 ±4,14	5,35 ±0,52	4,35 ±0,65	52.600AB ±29.277	27.000 ±8.085
Óleo	ns	ns	ns	ns	ns	ns	P<0,04	ns
Período	P<0,03		ns		ns		ns	
CV, %	16,24	22,33	12,81	15,43	13,82	15,36	48,63	38,26

OS= Óleo de Soja (3,0%); OP= Óleo de Peixe (3,0%); SB= Sebo Bovino (3,0%); OS+OP (1,5% + 1,5%); OS+SB (1,5% + 1,5%); OP+SB (1,5% + 1,5%); OS+OP+SB (1,0% + 1,0% + 1,0%).

Valores seguidos de letras distintas, minúsculas nas linhas ou maiúsculas nas colunas, são diferentes pelo teste de Tukey. ns = não significativo.

Ainda com relação aos leucócitos dos peixes no presente estudo é importante salientar que antes e após o estímulo pelo frio (50.335 e 40.232 μL, respectivamente) os números são inferiores aos obtidos por Mauel et al. (2007) e por Hrubec et al. (2000): 93250 μL (entre 18.750 e 151.750); e 75.659 μL (entre 21.559 e 154.690), respectivamente. Entretanto, estão dentro da faixa considerada normal pelos autores supracitados para a espécie.

Valores médios de referência de proteína plasmática total para tilápias saudáveis foram obtidos por Mauel et al. (2007) para tilápias híbridas (*Oreochromis aureus* x *Oreochromis nilotica*), por Chen et al. (2003) para tilápia-do-nylo e por Hrubec et al. (2000) para tilápias híbridas (*Oreochromis nilotica* x híbrido entre *O. mossambicus* x *O. aureus*) com médias variando entre 3,0 a 7,7 g/dL. Estes valores são superiores aos encontrados no presente estudo, desde o menor valor (1,84 g/dL) para os peixes que consumiram dietas contendo óleo de soja até o maior valor (2,34 g/dL) para os peixes que consumiram a dieta com a mistura das três fontes de ácidos graxos. Entretanto, valores abaixo de 3,0 g/dL para tilápia-do-nylo saudáveis têm sido observados em diversos estudos com nutrição desta espécie, também realizados em condições experimentais se-

melhantes no laboratório onde o estudo foi desenvolvido, os quais podemos citar Fernandes Junior et al. (2010) e Signor et al. (2010) que obtiveram médias gerais de 3,06 (2,87 a 3,23) e 3,54 (1,92 a 4,08) mg/dL.

A proteína plasmática total é um dos componentes mais estáveis do sangue dos peixes e poucos são os fatores dietéticos que têm sido reportados como capazes de alterar seu valor (MAITA, 2007). Elas representam cerca de 70% dos sólidos do plasma e são constituídas, na sua maioria, por albumina, globulinas, fibrinogênio e apolipoproteínas, sendo estas últimas envolvidas no transporte de lipídeos, como VLDL, LDL e HDL, lipoproteínas muito baixa, baixa e alta densidades, respectivamente (LENINGHER et al., 1997). Normalmente, a redução da concentração de proteína plasmática total em consequência de fatores dietéticos pode ser explicada por hemodiluição e por distúrbios no metabolismo protéico, ocorrendo frequentemente em quadros clínicos de desnutrição, principalmente protéica, ou na ocorrência de alterações hepáticas (MAITA, 2007).

A dieta, sua quantidade e composição de ácidos graxos podem modificar a concentração da proteína plasmática. Isto é plausível porque, segundo Ribeiro et al. (2013), o transporte de ácidos graxos e

outros componentes lipídicos para tecidos periféricos é mediado por lipoproteínas. Alterações nos valores da proteína plasmática poderiam ser correlacionadas a má nutrição ou estresse. Entretanto, necessitaria de uma confirmação como a combinação de variantes e o acompanhamento de um *status* negativo no leucograma dos peixes, o que não foi observado. Todavia, não foi possível realizar maiores inferências que justifiquem sua alteração apenas para os animais que consumiram a dieta que continha óleo de soja, principalmente porque o valor se manteve estável após a exposição dos peixes ao frio.

Comparando-se os períodos, o estímulo pelo frio não exerceu influência sobre o percentual de hematócrito, a concentração de hemoglobina, o número de leucócitos e de proteína plasmática total, além do percentual da concentração de hemoglobina corpuscular média. O número de eritrócitos e o volume corpuscular médio das tilápias foram afetados pela baixa temperatura em alguns tratamentos.

O número de eritrócitos foi reduzido de 1,63 no período anterior para  $1,22 \times 10^6/\mu\text{L}$  após o estímulo pelo frio nos peixes que consumiram a ração contendo óleo de soja e também de  $1,74$  para  $1,18 \times 10^6/\mu\text{L}$  nos que consumiram a ração com a mistura das três fontes de ácidos graxos (óleo de soja, óleo de peixe e sebo bovino). Independentemente do estímulo pelo frio, todos os valores de número de eritrócitos observados nesta pesquisa são inferiores aos obtidos em tilápias saudáveis por Hrubec (2000), que variaram de  $1,91$  a  $2,83 \times 10^6/\mu\text{L}$ . Entretanto, Hisano et al. (2007) obtiveram valores entre  $1,33$  a  $1,77 \times 10^6/\mu\text{L}$  (média de  $1,53$ ) e Barros et al. (2009) entre  $1,54$  a  $1,85 \times 10^6/\mu\text{L}$  (média de  $1,74$ ) para tilápias saudáveis em condições experimentais semelhantes. Embora de forma não significativa, houve também a diminuição do número de eritrócitos nos peixes de todos os tratamentos. É importante salientar que a ausência de mortalidade comprova a capacidade de aclimação da espécie durante os 7 dias em que estiveram sob temperatura de  $13^\circ\text{C}$ .

Araujo et al. (2011), Fernandes Junior et al. (2010), Signor et al. (2010), Barros et al. (2009) e Falcon et al. (2007) já haviam demonstrado os efeitos negativos de baixas temperaturas sobre o número de eritrócitos em estudos com nutrição de tilápia-do-nilo. Nos eritrócitos estão contidas a hemoglobina, que tem por função o transporte de  $\text{O}_2$  para os tecidos e de parte do  $\text{CO}_2$  dos tecidos para excreção, sendo que qualquer deficiência em número ou forma destas células pode provocar falta de oxigenação nos tecidos (RANZINI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). Normalmente, quanto menor a temperatura maior a concentração de oxigênio dissolvido na água, sendo que em temperaturas inferiores às ótimas os peixes tropicais reduzem o metabolismo. Araujo et al. (2011) afirmam que a combinação dessas duas situações podem explicar a redução da taxa de hemoglobina circulante no sangue periférico, decorrente da aclimação dos peixes, por haver menor demanda

metabólica por oxigênio e mais oxigênio disponível para respiração em água mais fria. No presente trabalho, embora não tenha havido redução estatística da hemoglobina, a mesma explicação pode ser utilizada para a ligeira redução dos eritrócitos, já que ela está contida nestas células. Entretanto, permanecendo sob esta condição por maior período, os efeitos negativos das baixas temperaturas podem se acentuar, trazendo prejuízos à saúde e ao desempenho produtivo.

Um dos efeitos comuns do frio sobre o hemograma dos peixes é a alteração do número de leucócitos. Trata-se de leucopenia, que é normalmente acompanhada de linfocetopenia, ou seja, queda no número de linfócitos, o que pode ser resultado da ação do cortisol, aumentando a susceptibilidade à invasão microbiana e permitindo que infecções se propaguem (FALCON et al., 2008). No presente estudo não foi observada leucopenia nos peixes em função da exposição à baixa temperatura, o que pode ter ocorrido devido a variação dos valores individuais obtidos para a composição das médias. De acordo com Ranzini-Paiva e Silva-Souza (2004) é comum ampla variação dos parâmetros hematológicos dos peixes, que pode ocorrer devido a fatores abióticos, como a temperatura, ou inerentes aos animais, os quais estes últimos explicariam a variação observada no presente estudo. Araujo et al. (2011) também observaram variações do número de leucócitos dentro do mesmo tratamento, antes e após o estímulo pelo frio, o que, segundo os autores, é a causa mais provável para a falta de significância estatística para esta variável quando comparados os períodos anterior e posterior ao estímulo pelo frio. Esta também é a causa mais provável para que o frio não tenha determinado diferença estatística do número de leucócito dos peixes submetidos ao frio no presente estudo.

O volume corpuscular médio dos eritrócitos das tilápias que consumiram a dieta com a mistura de óleo de peixe e sebo bovino aumentou de  $131,76$  para  $189,17$  fL após o estímulo pelo frio. As médias obtidas para esta variável antes e após o estímulo pelo frio foram  $138,26$  e  $170,80$ , respectivamente. Araujo et al. (2011) obteve valores médios de  $144,57$  e  $146,38$  fL, Barros et al. (2009) de  $138,46$  e  $117,68$  fL, Fernandes Júnior et al. (2010) de  $159,17$  e  $149,77$  fL e Signor et al. (2010) de  $125,54$  e  $125,19$  fL para tilápia-do-nilo sob condições experimentais semelhantes e no mesmo laboratório, respectivamente, antes e após desafio pelo frio. Tavares-Dias e Faustino (1998) obtiveram valores médios de  $133,70$  fL (entre  $70,80$  e  $205,50$  fL) para tilápia-do-nilo em cultivo extensivo por um ano. Todos os valores médios, mesmo nos peixes submetidos à temperatura fora da faixa de conforto térmico, estão de acordo com o demonstrado para tilápia-do-nilo saudáveis por Hrubec e Smith (2006), entre  $115$  e  $183$  fL, com exceção aos peixes alimentados com dietas contendo óleo de peixe e sebo bovino após desafio.

O aumento do valor do VCM dos eritrócitos dos peixes alimentados com dietas contendo a combinação de óleo de peixe e sebo bovino no período posterior ao estímulo pelo frio e das outras dietas, mesmo na forma em valores absolutos, decorreu da redução do número de eritrócitos, embora esta não tenha sido estatisticamente significativa, o que demonstra a possível liberação de células imaturas e busca do retorno à homeostase. Aumento do valor do VCM após estímulo pelo frio (13 °C) por 7 dias, em consequência de redução significativa da concentração de eritrócitos em tilápia-do-nylo, também foi

observado por Falcon et al. (2007), ao afirmarem que para estes peixes, diante da maior porcentagem de hematócrito, da menor taxa de hemoglobina e de CHCM, o maior VCM nos peixes indicou um quadro de anemia. Situação similar foi observada para os peixes no presente estudo. Entretanto, a redução ou o aumento dos valores destas variáveis após o estímulo pelo frio ocorreu apenas em valores absolutos, com exceção do VCM, o que talvez demonstre certa tendência de estabelecimento de um quadro de anemia macrocítica.

**Tabela 3.** Proteína plasmática total (PPT), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de tilápias-do-nylo (n = 5) alimentadas com rações com óleos de soja, peixe, sebo bovino e suas misturas antes e após estímulo pelo frio.

Tratamento	PPT (mg/dL)		VCM (fL)		CHCM (%)	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
OS	1,84±0,26A	2,16±0,38	142,71±25,19	158,81±24,51	22,47±0,91	23,25±2,89
OP	2,18±0,25AB	2,22±0,35	146,49±18,03	159,10±19,99	22,10±2,32	22,33±2,50
SB	2,15±0,17AB	2,40±0,32	147,28±2,89	173,35±35,87	22,13±2,67	22,31±2,23
OS+OP	2,20±0,14AB	2,20±0,14	135,28±10,70	156,98±14,88	23,09±1,71	22,64±1,42
OS+SB	2,12±0,16AB	2,14±0,38	126,92±26,67	188,11±67,98	22,65±1,43	23,33±0,71
OP+SB	2,06±0,17AB	2,24±0,26	131,76±11,57a	189,17±47,20b	24,87±3,39	23,02±0,58
OS+OP+SB	2,34±0,24B	2,02±0,30	137,38±25,00	170,09±30,71	22,78±2,65	21,90±1,81
Óleo	P<0,03	ns	ns	ns	ns	ns
Período	ns		P<0,05		ns	
CV, %	9,58	14,37	15,50	22,48	9,96	8,45

OS = Óleo de Soja (3,0%); OP = Óleo de Peixe (3,0%); SB = Sebo Bovino (3,0%); OS+OP (1,5% + 1,5%); OS+SB (1,5% + 1,5%); OP+SB (1,5% + 1,5%); OS+OP+SB (1,0% + 1,0% + 1,0%). Valores seguidos de letras distintas, minúsculas nas linhas ou maiúsculas nas colunas, são diferentes pelo teste de Tukey. ns = não significativo.

## CONCLUSÃO

Embora a fonte de ácido graxo da dieta tenha exercido influência sobre o número de leucócitos e de proteína plasmática total das tilápias, não houve um padrão de resposta das variáveis para que se pudesse indicar uma fonte mais adequada para a manutenção da homeostase e promoção da resistência dos peixes à baixa temperatura.

A baixa temperatura, de modo geral, promoveu uma tendência de anemia o que, em longo prazo, poderia causar problemas numa produção comercial.

## REFERÊNCIAS

ARAUJO, D. M. et al. Hematologia de tilápias-do-nylo alimentadas com dietas com óleos vegetais e estimuladas pelo frio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 46, n. 3, p. 294-302, 2011.

BARROS, M. M. et al. Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed diets containing folic acid. *Aquaculture Research*, Oxford, v. 40, p. 895-903, 2009.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. *Produção pesqueira e aquícola – Estatística 2008 e 2009*, 2010. p. 12-17.

CHEN, C. Y. et al. Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 218, p. 89-102, 2003.

COLLIER, H. B. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, Toronto, v. 50, n. 6, p. 550-552, 1944.

FALCON, D. R. et al. Leucograma da tilápia-do-

- Nilo arraçoada com dietas suplementadas com níveis de vitamina C e lipídeo submetidas a estresse por temperatura. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 3, p. 543-551, 2008.
- FALCON, D. R. et al. 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**, Baton Rouge, v. 38, n. 2, p. 287-295, 2007.
- FERNANDES JUNIOR, A. C. et al. Resposta hemática da tilápia-do-Nilo alimentada com dietas suplementadas com níveis crescentes de colina e submetida a estímulo por baixa temperatura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 8, p. 1619-1625, 2010.
- GOLDENFARB, P. B. et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 1, p. 35-39, 1971.
- HISANO, H.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E. Levedura e zinco como pró-nutrientes em rações para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*): aspectos hematológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 35-42, 2007.
- HRUBEC, T. C.; CARDINALE, J. L.; SMITH, S. A. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis Hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology**, Madison, v. 29, n. 1, p. 7-12, 2000.
- JAIN, N.C. **Schalm's veterinary haematology**. 4.ed., Philadelphia: Lea e Febiger, 1986. 1221 p.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. Integration and hormonal regulation of mammalian metabolism. In: **Principles of Biochemistry**. New York: Worth Publishers, 2007. 2aEd., p. 736-787.
- MAITA, M. Fish Health Assessment. In: NAKAGAWA, H.; SATO, M.; GATLIN III, D. M. (Eds). **Dietary supplements for the health and quality of cultured fish**. London: CABI Publishing, 2007. cap. 2, p. 10-34.
- MAUEL, M. J.; MILLER, D. L.; MERRILL, A. L. Hematologic and Plasma Biochemical Values of Health Hybrid Tilapia (*Oreochromis aureus* x *Oreochromis niloticus*) Maintained in a Recirculating System. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Yulee, v. 38, n. 3, p. 420-424, 2007.
- MOURENT, G.; GOOD, J. E.; BELL, J. G. Partial substitution of fish oil with rapessed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effets on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E2 and F2 $\alpha$ , immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 11, p. 25-40, 2005.
- RANZINI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZINI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Ed. Varela, 2004. cap.4, p. 89-120.
- RIBEIRO, A. et al. Parâmetros metabólicos de pacus alimentados com diferentes fontes de óleo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n. 8, p. 1035-1042, 2013
- SHIAU, S.-Y. Tilapia, *Oreochromis* spp. In: WEBSTER, C. D.; LIM, C. (eds). **Nutrient Requirement and Feeding of Finfish for Aquaculture**. London: CABI Publishing, 2002. p. 273-292.
- SIGNOR, A. et al. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo: efeito da dieta suplementada com levedura e zinco e do estímulo pelo frio. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 3, p. 509-519, 2010.
- TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C. D. Parâmetros hematológicos de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v.14, n.3, p.254-263, jul./set. 1998.
- VERAS, G. C. et al. Fotoperíodo sobre parâmetros fisiológicos relacionados ao estresse em alevinos de tilápia-do-nilo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n. 5, p. 1434-1440, 2013.
- WINTROBE, M. M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, Leipzig, v. 51, n. 1, p. 32-49, 1934.
- YILDIRIM-AKSOY, M. et al. Influence of dietary lipid sources on the growth performance, immune response and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Streptococcus iniae* Challenge. **Journal of Applied Aquaculture**, Philadelphia, v. 19, n. 2, p. 29-49, 2007.