

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA

SARA UGULINO CARDOSO

SUPLEMENTAÇÃO DE FONTES ORGÂNICAS DE MANGANÊS E
ZINCO EM RAÇÕES PARA LARVAS DE TILÁPIA DO NILO

Toledo

2022

SARA UGULINO CARDOSO

**SUPLEMENTAÇÃO DE FONTES ORGÂNICAS DE MANGANÊS E
ZINCO EM RAÇÕES PARA LARVAS DE TILÁPIA DO NILO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado e Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

Coorientador: Prof. Dr. Affonso Celso Gonçalves Júnior

Toledo

2022

FICHA CATALOGRAFICA

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Cardoso, Sara Ugulino
SUPLEMENTAÇÃO DE FONTES ORGÂNICAS DE MANGANÊS E ZINCO EM
RAÇÕES PARA LARVAS DE TILÁPIA DO NILO / Sara Ugulino Cardoso;
orientador Robie Allan Bombardelli; coorientador Affonso
Celso Gonçalves Júnior. -- Toledo, 2022.
31 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Toledo) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de
Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em
Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2022.

1. Crescimento. 2. Estresse Oxidativo. 3. Minerais. 4.
Suplementação. I. Bombardelli, Robie Allan, orient. II.
Gonçalves Júnior, Affonso Celso, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

SARA UGULINO CARDOSO

SUPLEMENTAÇÃO DE FONTES ORGÂNICAS DE MANGANÊS E ZINCO EM RAÇÕES PARA LARVAS DE TILÁPIA DO NILO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca – Nível de Mestrado e Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof. Dr. Izabel Volkweis Zadinelo
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Fábio Meurer
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Paulo Vanderlei Sanches
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Aprovada em: 09 de março de 2022.

Local de defesa: Forma síncrona e por videoconferência.

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais e irmãos, que mesmo longe estiveram comigo para realização deste sonho.

SUPLEMENTAÇÃO DE FONTES ORGÂNICAS DE MANGANÊS E ZINCO EM RAÇÕES PARA LARVAS DE TILÁPIA DO NILO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho zootécnico, índices corporais e estresse oxidativo de larvas de tilápias (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com dietas contendo zinco (Zn) e manganês (Mn) orgânicos. Para isso, um total de 10.200 larvas de tilápia foram utilizadas, alojadas em 51 caixas de polietileno pretas, e o experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado em estrutura fatorial 4x4, mais o controle, com três repetições. Os tratamentos foram constituídos pela alimentação das larvas com rações suplementadas com diferentes níveis de zinco (0, 40, 80, 120 mg kg⁻¹) e manganês (0, 10, 30, 40 mg kg⁻¹). As larvas foram alimentadas por 30 dias, oito vezes ao dia em regime *ad libitum*. As tilápias alimentadas com rações suplementadas com 40 mg kg⁻¹ de zinco e 10 mg kg⁻¹ de manganês; 80 mg kg⁻¹ de zinco e 10 mg kg⁻¹ de manganês apresentaram a maior ($p<0,05$) taxa de sobrevivência e altos índices de crescimento. A expressão dos genes *TGF-β*, *IL 8*, *IL 10* e *IFN-γ* destas tilápias também foram reguladas positivamente ($p<0,05$). Por outro lado, aquelas alimentadas com rações suplementadas com 40 mg kg⁻¹ de zinco e 0 mg kg⁻¹ de manganês; 80 mg kg⁻¹ de zinco e 0 mg kg⁻¹ de manganês apresentaram a maior ($p<0,05$) taxa de mortalidade e, devido a redução da densidade de estocagem ao longo da criação, apresentaram consequentemente o maior crescimento. Os níveis de zinco e manganês não influenciaram o comprimento intestinal, índices hepatossomático e viscerossomático ($p>0,05$). A atividade hepática de catalase, superóxido dismutase, lipoperoxidação e carbonilação de proteínas não foram alteradas ($p>0,05$). Apenas a atividade de glutathione s-transferase apresentou efeito individual do zinco, apresentando a menor atividade ($p<0,05$) para as tilápias alimentadas rações suplementadas com 80 mg kg⁻¹ de manganês. O uso de premix mineral orgânico com zinco e manganês promoveu ganhos no crescimento do animal, aumento na imunidade inata resultando em maior sobrevivência dos peixes.

Palavras-chave: Imunidade inata; Expressão genica; Equilíbrio; Minerais Orgânicos

SUPPLEMENTATION OF ORGANIC SOURCES OF MANGANESE AND ZINC IN FOOD FOR NILE TILAPIA LARVAE

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the growth, body indices, oxidative stress and expression of pro-inflammatory cytokines of tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae fed diets supplemented with organic zinc (Zn) and manganese (Mn). A total of 10,200 tilapia larvae were used, distributed in 51 black polyethylene boxes, the experiment was conducted in a completely randomized design in a 4x4 factorial structure, more the control, with three replications. The treatments consisted of feeding the larvae with diets supplemented with different levels of zinc (0, 40, 80, 120 mg kg⁻¹) and manganese (0, 10, 30, 40 mg kg⁻¹). Larvae were fed for 30 days, eight times a day ad libitum. Tilapia fed diets supplemented with 40 mg kg⁻¹ of zinc and 10 mg kg⁻¹ of manganese; 80 mg kg⁻¹ zinc and 10 mg kg⁻¹ manganese showed the highest ($p<0.05$) survival rate and highest growth rates. The expression of the *TGF- β* , *IL 8*, *IL 10* and *IFN- γ* genes of these tilapias were also upregulated ($p<0.05$). On the other hand, those fed diets supplemented with 40 mg kg⁻¹ of zinc and 0 mg kg⁻¹ of manganese; 80 mg kg⁻¹ of zinc and 0 mg kg⁻¹ of manganese showed the highest ($p<0.05$) mortality rate and, due to the reduction in stocking density throughout rearing, consequently showed the highest growth. Zinc and manganese levels did not influence intestinal length, hepatosomatic and viscerosomatic indices ($p>0.05$). Hepatic catalase, superoxide dismutase, lipoperoxidation and protein carbonylation activities were not altered ($p>0.05$). Only glutathione s-transferase activity showed an individual effect of zinc, with the lowest activity ($p<0.05$) for tilapia fed diets supplemented with 80 mg kg⁻¹ of manganese. The use of organic mineral premix with zinc and manganese promoted gains in animal growth, increase in innate immunity resulting in greater survival of fish.

Keywords: Innate immunity; Gene expression; Balance; Organic Minerals.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica Aquaculture. Disponível em: <https://www.elsevier.com/journals/aquaculture/0044-8486/guide-for-authors>

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Materiais e métodos	12
2.1 Animais, instalações e delineamento experimental	12
2.2 Rações experimentais e manejo alimentar	12
2.3 Monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água.....	13
2.4 Mensuração do crescimento e índices corporais.....	16
2.5 Análises bioquímicas no fígado	16
2.6 Expressão dos genes <i>TGF, 1β, IL 8, IL 10</i> e <i>INF γ</i> no intestino	17
3. Análise estatística.....	18
4. Resultados	19
5. Discussão	25
6. Conclusão	28
7. REFERÊNCIA.....	29

1. Introdução

A atividade aquícola tem crescido mundialmente, sendo a produção de peixes a área que mais cresce. A tilápia é a terceira espécie de peixe mais cultivada no mundo (FAO, 2020).

A intensificação da produção nas pisciculturas tem exigido uma melhor e maior eficiência alimentar e nutricional dos peixes, visando melhorar a resistência nas práticas de manejo e fatores abióticos, pontos estes que tornam os animais mais susceptíveis às enfermidades após desequilíbrio (Meyer et al., 1983). Diante disso, estudos estão sendo realizados para determinar a dieta adequada à máxima absorção e aproveitamento dos nutrientes, para otimizar o metabolismo, crescimento (Moraes & Almeida, 2020) e saúde dos peixes (Martin & Król, 2017).

Substâncias como vitamina C e E, colina, aminoácidos livres e microminerais têm sido testadas e aprovadas para uso como imunoestimulantes ou imunomoduladores na aquicultura (Cyrino et al., 2010), sendo os microminerais bastante utilizados na dieta com funções imunológicas e antioxidante, na formação de tecidos e ativadores enzimáticos (Lall, 2002; Yuan et al., 2020).

Os minerais são divididos em dois grupos, macrominerais (exigidos em maior quantidade g/100g da dieta) e microminerais (necessários em pequenas quantidades mg/Kg da dieta) (NRC, 2011). Os principais minerais a serem incrementados nas dietas dos peixes são os microminerais, como ferro, zinco, cobre, manganês e selênio (NRC, 2011).

O zinco (Zn) é um mineral de suma importância para o crescimento, reprodução, visão (Watanabe et al., 1997), sistema imunológico, aumentando a resistência e imunidade inespecífica e específica, além de atuar na defesa contra os radicais livres (Salgueiro et al., 2000). Também atua como cofator enzimático de inúmeras vias metabólicas de carboidratos, lipídeos e proteínas (Watanabe et al., 1997).

Os efeitos resultantes da deficiência ou excesso de Zn, varia de acordo com a espécie (Muralisankar et al., 2014). Estudos demonstraram que a deficiência de zinco causou retardo do crescimento em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), salmão do atlântico (*Salmo salar*), bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*); nanismo, diminuição da digestibilidade de proteínas e carboidratos em truta arco-íris (Watanabe et al., 1997; Lall, 2002; NRC, 2011); anormalidade esquelética, mortalidade, catarata e corrosão nas nadadeiras de truta arco-íris e carpa comum (Lall, 2002; NRC, 2011); e diminuição da imunidade por redução de anticorpos naturais, aumentando a suscetibilidade a uma variedade de patógenos (Salgueiro et al., 2000). O excesso de zinco pode ser prejudicial aos animais, interferindo na

disponibilidade de cobre e ferro, pois estes minerais utilizam o mesmo sítio de ligação, ocasionando redução no crescimento (Shiau & Jiang, 2006).

O manganês (Mn), mesmo em pequenas quantidades, é importante para o desenvolvimento animal, e atua como parte integrante de determinadas metaloenzimas no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas e como cofator enzimático para um grande grupo de enzimas (Watanabe et al., 1997). Possui ação antioxidante, aumentando a capacidade de digestão e absorção no intestino (Tang et al., 2014), auxilia na formação de ossos, coagulação do sangue, metabolização da glicose, síntese de colesterol e desenvolvimento de cartilagem (Webster e Lim, 2002). A ausência de manganês na dieta acarretou a ingestão reduzida de alimentos, crescimento demorado, catarata e nanismo para as espécies de truta arco-íris e carpa comum (Watanabe et al., 1997; NRC, 2011); perda de equilíbrio em tilápias moçambicanas (*Oreochromis mossambica*); aumento da mortalidade, concentração reduzida de manganês no corpo e nos ossos ocasionados em truta das fontes (*Salvelinus fontinalis*) e salmão do atlântico; baixa eclosão dos ovos em truta arco-íris, truta das fontes e salmão do atlântico; anomalia no crescimento caudal em truta arco-íris (Lall, 2002; NRC 2011).

Portanto, a suplementação de Zn e Mn para larvas de peixes é necessária para o desenvolvimento normal e reduz deformidades estruturais causadas pela deficiência destes minerais, além de contribuir para o sistema imune. A adição desses minerais em dietas para peixes normalmente é feita em excesso pelas indústrias de ração, pois possuem baixa biodisponibilidade e afinidade a antinutrientes presentes em ingredientes práticos (Nguyen et al., 2019). Para o aprimoramento da nutrição aquática, deve-se buscar evitar o excesso de nutrientes nas rações, tanto para preservar o ambiente aquático, como para evitar efeitos tóxicos causado pela interação negativa entre o minerais (Prabhu et al., 2016).

Nesse contexto, uma alternativa para utilização de minerais tem sido os de origem orgânica, por possuírem forte ligação dos microminerais com peptídeos e aminoácidos, se tornando mais estáveis e assim biodisponíveis, sem reação com outros componentes da dieta (Rodrigues & Farias, 2018).

De acordo com a Associação de Oficiais Americanos de Controle de Alimentação (do inglês *Association of American Feed Control Officials*, AAFCO) (1999), existem cinco categorias de minerais orgânico: Complexo metal-aminoácido inespecífico; Complexo metal-aminoácido específico; Metal quelato; Metal Polissacarídeo; Metal proteinato.

Os minerais orgânicos do complexo metal-aminoácido inespecífico, também chamados de mineral de desempenho, resultam na única fonte que atende a quatro critérios para ser eficiente: solúvel em água, estável, absorvível e metabolicamente disponível (Ward, 2021).

Apesar da importância dos minerais para o funcionamento e desenvolvimento da fisiologia dos peixes, informações sobre o uso de minerais são escassos para larvas de tilápia. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho zootécnico de larvas de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de minerais orgânicos (Zn e Mn), além dos indicadores do sistema do equilíbrio redox e genes da imunidade inata.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais, instalações e delineamento experimental

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as exigências do Comitê de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Protocolo nº 24-2020). O experimento foi realizado entre 07 de abril de 2021 e 06 de maio de 2021.

Foram utilizadas 10.200 larvas de tilápia do Nilo com cinco a sete dias vida e peso médio de 0,0112g. Os animais foram distribuídos em 51 caixas de polietileno pretas com volume útil de 60 L, equipadas de aeração constante por meio de pedra microporosa, contendo circulação constante de água, aquecimento elétrico e filtro mecânico e biológico.

O experimento foi conduzido em um delineamento experimental inteiramente casualizado em estrutura fatorial 4x4, mais o tratamento controle, com três repetições, totalizando 51 unidades experimentais. Considerou-se uma unidade experimental um aquário contendo 200 larvas.

Os tratamentos foram constituídos pelos níveis crescentes dos minerais zinco orgânico (0, 40, 80, 120 mg kg⁻¹) e manganês orgânico (0, 10, 30, 40 mg kg⁻¹) nas rações e um tratamento controle, composto pela ração suplementada com fonte inorgânica de zinco e manganês.

2.2 Rações experimentais e manejo alimentar

As rações foram formuladas de modo a atender às exigências nutricionais da espécie, contendo 38,6% de proteína digestível (PD) e 3.800 Kcal Kg⁻¹ de energia digestível (ED) (Tabela 1) (Hayashi et al., 2002). Foi utilizado um suplemento mineral e vitamínico, composto por fontes inorgânicas de minerais, contudo isento de qualquer fonte de zinco e manganês. Assim, os níveis crescentes de ambos os minerais foram suplementados separadamente no

momento da mistura. A ração controle foi formulada com o mesmo suplemento mineral e vitamínico, contudo, contendo sulfato de zinco e manganês nas seguintes concentrações respectivamente 125 mg kg⁻¹ e 37,5 mg kg⁻¹. Para elaboração das rações, os ingredientes foram triturados em moinho de martelo, utilizando peneira de 0,2 mm e em seguida misturados. Posteriormente o total de ração foi dividido em 17 partes, para a adição dos minerais, suplemento mineral e vitamínico e hormônio masculinizante (17- α -metiltestosterona) na quantidade de 60 mg kg⁻¹ de ração, diluído em 300 mL de álcool 94% juntamente ao óleo de soja da formulação da ração.

As larvas eram alimentadas com ração experimental em regime *ad libitum*, na frequência de oito vezes ao dia (8h00min, 9h30min, 11h00min, 12h30min, 14h00min, 15h30min, 17h00min e 18h30min).

2.3 Monitoramento dos parâmetros físicos e químicos da água

A temperatura da água foi controlada ($26,50 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$) por meio de aquecimento elétrico acoplado a um termostato. Semanalmente foram mensurados na água os níveis de oxigênio dissolvido ($7,62 \pm 0,06 \text{ mg L}^{-1}$; oxímetro digital Alfakit®), amônia total ($0,57 \pm 0,19 \text{ mg L}^{-1}$; Fotocolorímetro Alfakit® ATP100P), nitrito ($0,51 \pm 0,20 \text{ mg L}^{-1}$; Fotocolorímetro Alfakit® AT100P) e pH ($6,45 \pm 0,08$; pHmetro digital Tecnal® Tec 5).

Tabela 1 – Composição centesimal dos alimentos e conteúdo de nutrientes das rações experimentais, utilizadas na alimentação de pós-larvas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

		Nível de zinco orgânico (mg kg ⁻¹)															
		0				40				80				120			
		Nível de manganês orgânico (mg kg ⁻¹)															
Controle		0				40				80				120			
		0	10	30	40	0	10	30	40	0	10	30	40	0	10	30	40
Ingredientes (g kg ⁻¹)																	
Farinha de Vísceras	243,4	243,4	243,4	243,4	243,4	243,4	243,4	243,4	243,4	243,4	243,4	243,4	243,4	243,4	243,4	243,4	243,4
Farinha Salmão	361,9	361,9	361,9	361,9	361,9	361,9	361,9	361,9	361,9	361,9	361,9	361,9	361,9	361,9	361,9	361,9	361,9
Farelo de Soja	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
Milho grão	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130
Óleo de Soja	106,6	106,6	106,6	106,6	106,6	106,6	106,6	106,6	106,6	106,6	106,6	106,6	106,6	106,6	106,6	106,6	106,6
Sal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Premix mineral inorgânico ¹	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Premix mineral orgânico ²	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Antioxidante ³	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Continua

Tabela 1 - Continuação

Teor de nutrientes calculado (g kg ⁻¹) ⁴																	
Amido	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7	85,7
Cálcio	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2	27,2
Cinzas	111,8	111,8	111,8	111,8	111,8	111,8	111,8	111,8	111,8	111,8	111,8	111,8	111,8	111,8	111,8	111,8	111,8
Energia digestível (Kcal Kg ⁻¹)	3.800	3.800	3.800	3.800	3.800	3.800	3.800	3.800	3.800	3.800	3.800	3.800	3.800	3.800	3.800	3.800	3.800
Fibra bruta	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7
Fosforo total	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5	16,5
Gordura	187,2	187,2	187,2	187,2	187,2	187,2	187,2	187,2	187,2	187,2	187,2	187,2	187,2	187,2	187,2	187,2	187,2
Matéria mineral	62,2	62,2	62,2	62,2	62,2	62,2	62,2	62,2	62,2	62,2	62,2	62,2	62,2	62,2	62,2	62,2	62,2
Matéria seca	933,4	933,4	933,4	933,4	933,4	933,4	933,4	933,4	933,4	933,4	933,4	933,4	933,4	933,4	933,4	933,4	933,4
Proteína digestível	38,6	38,6	38,6	38,6	38,6	38,6	38,6	38,6	38,6	38,6	38,6	38,6	38,6	38,6	38,6	38,6	38,6

¹Premix mineral inorgânico, composição básica (mg kg⁻¹ de ração): ácido fólico: 200mg, ácido pantotênico:4.000mg; Biotina:40mg; Cobre:2.000mg; Ferro:12.500mg; Iodo:200mg; Manganês:7.500mg; Niacina:5.000mg; Selênio:70mg; Vitamina A:1.000.000UI; Vitamina B1:2.400mg; Vitamina B12:3.500mg; Vitamina B2:2.000mg; Vitamina B6:2.400mg; Vitamina C:25.000mg; Vitamina D3: 500.000UI; Vitamina E: 20.000UI; Vitamina K3: 500mg; Zinco:25.000mg; BHT:300mg. ²Premix mineral orgânico: sem a fonte inorgânica de Zn e Mn, contendo adição orgânica de zinco e manganês. ³Antioxidante (Butil hidroxi tolueno- BHT). ⁴Conteúdo de nutrientes calculados usando o software Super Crac 6.1 Premium®.

2.4 Mensuração do crescimento e índices corporais

Ao final do experimento, os peixes foram mantidos em jejum por 12 horas para esvaziamento do trato gastrointestinal. Posteriormente todos os peixes de cada aquário foram anestesiados por imersão em solução contendo eugenol (75 mg kg^{-1}) e então pesados em balança de precisão ($\pm 0,1\text{g}$).

Em seguida, cinco peixes de cada aquário foram eutanasiados através da secção da coluna vertebral. Estes peixes foram dissecados para obtenção do fígado, intestino e vísceras. Os órgãos foram pesados e medidos, o fígado foi imediatamente armazenados em microtubos de 2,0 mL, congelados em vapor de nitrogênio líquido e armazenados à -80°C , para posterior realização das análises bioquímicas no fígado.

Foram determinados o peso final (PF), a biomassa (BIO), o ganho de peso (GP), sobrevivência (SOB), conversão alimentar aparente (CAA), comprimento do intestino (CI), índice hepatossomático (IHS) e índice viscerossomático (IVS) (Bombardelli et al., 2009).

Os peixes restantes (5 peixes/tratamento) foram dissecados para coletar o intestino e em seguida as amostras foram imediatamente congeladas em vapor de nitrogênio líquido para extração de RNA.

2.5 Análises bioquímicas no fígado

Inicialmente, as amostras de fígado foram homogeneizadas diretamente nos microtubos em solução de tampão fosfato salino. Em seguida, as amostras homogeneizadas foram centrifugadas à 12.806g à 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e fracionado em microtubos e novamente armazenado à -80°C .

A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), que se baseia na interação das proteínas solúveis com o corante azul brilhante comassie, convertendo a cor marrom para azul após ligação à proteína. Após a reação, as leituras de absorbância foram realizadas em comprimento de onda de 595 nm , em uma leitora de microplacas (GO Fisher Scientific). Foi utilizada a albumina sérica bovina para produzir a curva padrão. Em seguida, as amostras foram padronizadas para a concentração de 1 mg mL^{-1} de proteína, destinadas para a realização das demais análises.

A lipoperoxidação foi analisada pelo método de TBARS de acordo com Jiang et al. (1992), o qual se baseia na reação da molécula de malondialdeído com duas moléculas de

ácido tiobarbitúrico formando um pigmento rosa. Após a reação, a leitura das absorvâncias foi realizada em comprimento de onda de 570 nm.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi mensurada pela metodologia de Aebi (1984), a qual se baseia na degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Após a reação, a leitura das absorvâncias foi realizada em comprimento de onda de 240 nm.

A atividade da glutathione S-transferase foi mensurada pela metodologia de Habig et al. (1974), onde o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) é metabolizado pela enzima glutathione S-transferase (GST) conjugado a glutathione reduzida. Após a reação, a leitura das absorvâncias foi realizada em comprimento de onda de 340 nm.

A carbonilação de proteína (PCO) foi determinada pela metodologia Levine et al. (1990), onde o ácido tricloroacético precipita as proteínas e são solubilizadas em hidrocloreto de guanidina. Após a reação, a leitura das absorvâncias foi realizada em comprimento de onda de 360 nm.

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada segundo Crouch (1981) e está relacionada na capacidade da SOD em inibir a redução do azul nitrotetrazólio (NBT) pelo radical superóxido gerado pela hidroxilamina. Após a reação, a leitura das absorvâncias foi realizada em comprimento de onda de 560 nm.

2.6 Expressão dos genes *TGF*, *1β*, *IL 8*, *IL 10* e *INF γ* no intestino

O intestino das tilápias alimentadas com ração suplementada com 40 mg kg⁻¹ de zinco orgânico e 10 mg kg⁻¹ de manganês orgânico e o controle foram processadas para avaliação da expressão gênica de *TGF*, *1β*, *IL 8*, *IL 10* e *INF γ*.

O RNA total foi extraído utilizando o *TRIZOL™ Reagent* (Invitrogen, USA), aproximadamente 100 mg de intestino foi pesado, triturado e adicionado a um microtubo, livre de DNase e RNase, contendo 500 µL de Trizol. A concentração de RNA foi mensurada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA), no comprimento de onda de 260/280 nm e a integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com *SYBR Safe™ DNA Gel Stain* (Invitrogen, USA) e visualizado em aparelho transiluminador com luz ultravioleta.

Para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico, as amostras de RNA total foram tratadas com *QuantiNova gDNA Removal Mix* (Qiagen GmbH, Germany) a 45°C por 2 min. Após remoção do DNA genômico, foram utilizados 5 µg de RNA para síntese

do cDNA, utilizando o *QuantiNova reverse transcription kit* (Qiagen GmbH, Germany). As amostras foram mensuradas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA) e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Os iniciadores específicos (Tabela 2) foram escolhidos para determinar a expressão no tecido intestinal. As análises de qRT-PCR foram conduzidas em Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Germany), utilizando o *QuantiNova SYBR Green PCR Kit* (Qiagen GmbH, Germany), em duplicatas, com volume total da reação de 20 µL. As condições de amplificação foram: 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 5 seg, e 60°C por 10 seg. A curva de dissociação (*melt curve*) dos produtos da reação foi obtida, para determinar a especificidade das reações.

A expressão genica foi normalizada para o gene β -actina, e os resultados são apresentados na forma de $2^{-\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001) para quantificação relativa da expressão gênica (expressa como unidades arbitrárias, AU).

Tabela 2 – Sequência de *Primers* usado para análise de PCR quantitativo em tempo real.

Genes	Sequência dos <i>Primers</i> (5→3')	Referência
β -actina	F:GATCTGGCATCACACCTTCTAC R:TCTTCTCCCTGTTGGCTTTG	XM_003443127.5
<i>TGF-β</i>	F:GTTTGAACCTTCGGCGGTACTG R:TCCTGCTCATAGTCCCAGAGA	Standen et al., 2016.
<i>IL-8</i>	F:CTGTGAAGGCATGGGTGTG R:GATCACTTTCTTCACCCAGGG	Doan et al., 2021.
<i>IL-10</i>	F:CTGCTAGATCAGTCCGTCGAA R:GCAGAACCGTGTCCAGGTAA	Standen et al., 2016.
<i>IFN-γ</i>	F:GAAAAGCTGCTTGGCCACAT R:AGCGAGCCTGAGTTGTTGGT	Wang et al., 2020.

TGF- β , fator de crescimento transformador; *IL-8*, interleucina 8; *IL-10*, interleucina 10; *IFN- γ* , interferon γ .

3. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão (EP). Os resíduos foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk e Cochran respectivamente. Em seguida, os dados foram submetidos a análise de variância em estrutura bi-fatorial (ANOVA TWO-WAY), seguido pelo teste de comparação múltipla de

médias de Duncan, ambos a um nível de 5% de probabilidade. Alternativamente os resultados de crescimento dos animais alimentados com as rações suplementadas com 40 mg kg⁻¹ de zinco e 0 mg kg⁻¹ de manganês e; 80 mg kg⁻¹ de zinco e 0 mg kg⁻¹ de manganês foram suprimidos e, então submetidos à análise de variância unifatorial (ANOVA ONE-WAY), seguido pelo teste de Duncan, ambos à um nível de 5% de probabilidade. Este procedimento foi adotado para evitar avaliações equivocadas sobre o crescimento, pois a mortalidade induzida por estes tratamentos influenciou positivamente o crescimento das tilápias em função da redução das densidades de estocagem. Os resultados de expressão gênica foram submetidos à análise de variância unifatorial (ANOVA ONE-WAY), seguida pelo teste de Duncan, também à um nível de 5% de probabilidade. Todos os procedimentos foram realizados no *software* Statistica 7.1[®].

4. Resultados

A alimentação das tilápias com dietas suplementadas com minerais orgânicos influenciou o crescimento e a sobrevivência dos peixes (Tabela 3). A sobrevivência foi influenciada pela interação ($p < 0,05$) entre os níveis de inclusão de zinco e manganês, enquanto os parâmetros de crescimento sofreram efeito individual dos níveis de zinco e manganês (Tabela 3). As tilápias alimentadas com rações contendo 40 mg kg⁻¹ de zinco e 10 mg kg⁻¹ de manganês apresentaram a maior ($p < 0,05$) taxa de sobrevivência e altos índices de crescimento (Tabela 3). Por outro lado, aquelas alimentadas com 40 mg kg⁻¹ de zinco e 0 mg kg⁻¹ de manganês; 80 mg kg⁻¹ de zinco e 0 mg kg⁻¹ de manganês, apresentaram a maior ($p < 0,05$) taxa de mortalidade e, devido a redução da densidade de estocagem ao longo da criação, maior crescimento (Tabela 3). Assim, após a exclusão dos tratamentos 40 mg kg⁻¹ de zinco e 0 mg kg⁻¹ de manganês; 80 mg kg⁻¹ de zinco e 0 mg kg⁻¹ de manganês, os peixes alimentados com 40 mg kg⁻¹ de zinco e 10 mg kg⁻¹ de manganês; 80 mg kg⁻¹ de zinco e 10 mg kg⁻¹ de manganês apresentaram as maiores ($p < 0,05$) taxas de crescimento (Tabela 3).

As rações fornecidas às tilápias não influenciaram ($p > 0,05$) a conversão alimentar (Tabela 3), o comprimento do intestino (CI) e, os índices hepatossomático (IHS) e viscerossomático (IVS) (Tabela 4).

Tabela 3. Crescimento de larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo zinco (Zn) e manganês (Mn) de origem orgânica.

Suplementação mineral na ração (mg Kg ⁻¹)		Variáveis				
		Peso final (g)	Ganho de Peso (g)	Biomassa (g)	C.A.A.	Sob (%)
Premix com fonte inorgânica		0,65 ± 0,49 ^{ABC}	0,64 ± 0,0490 ^{ABC}	68,31 ± 4,98 ^{CD}	2,01 ± 0,19 ^D	57,25 ± 4,0 ^{deD}
Premix com fonte orgânica						
Zn	Mn					
0	0	0,63 ± 0,03 ^{ABCD}	0,62± 0,0353 ^{ABCD}	86,25 ± 4,13 ^{ABC}	1,55 ± 0,07 ^{AB}	69,66 ± 2,0 ^{abcdABC}
	10	0,62±0,03 ^{ABCD}	0,62± 0,0346 ^{ABCD}	80,21 ± 7,79 ^{BCD}	1,76 ± 0,17 ^{BCD}	66 ± 6,0 ^{abcdABC}
	30	0,57 ± 0,03 ^{CD}	0,56± 0,0439 ^{CD}	84,21 ± 7,64 ^{BCD}	1,58 ± 0,13 ^{AB}	73,33 ± 1,0 ^{abAB}
	40	0,53 ± 0,04 ^D	0,52± 0,0317 ^D	67,31 ± 3,34 ^D	1,97 ± 0,08 ^D	65,5 ± 1,0 ^{bcdBC}
40	0	0,73 ± 0,03	0,72± 0,0209	87,61 ± 4,08	1,54 ± 0,06	60,83 ± 2,0 ^d
	10	0,69 ± 0,02 ^A	0,69± 0,0240 ^A	103,38 ± 5,03 ^A	1,34 ± 0,06 ^A	75,66 ± 1,0 ^{aA}
	30	0,68 ± 0,02 ^{AB}	0,68± 0,0265 ^{AB}	84,48 ± 4,29 ^{BCD}	1,59 ± 0,09 ^{AB}	62,83 ± 5,0 ^{dC}
	40	0,62 ± 0,03 ^{ABCD}	0,61± 0,0393 ^{ABCD}	81,28 ± 4,13 ^{BCD}	1,70 ± 0,09 ^{ABCD}	67,33 ± 3,0 ^{abcdABC}
80	0	0,70 ± 0,04	0,69± 0,0460	83,68 ± 5,18	1,64 ± 0,11	61,66 ± 6,0 ^d
	10	0,70 ± 0,00 ^A	0,68± 0,0060 ^{AB}	92,51 ± 1,73 ^{AB}	1,49 ± 0,04 ^{AB}	67,66 ± 2,0 ^{abcdABC}
	30	0,68 ± 0,01 ^{ABC}	0,67± 0,0170 ^{ABCD}	93,61 ± 2,72 ^{AB}	1,46 ± 0,05 ^{AB}	69,66 ± 0,0 ^{abcdABC}
	40	0,63 ± 0,03 ^{ABCD}	0,62± 0,0303 ^{ABCD}	86,11 ± 3,46 ^{ABC}	1,58 ± 0,06 ^{AB}	70,16 ± 1,0 ^{abcdABC}
120	0	0,68 ± 0,02 ^{ABC}	0,67± 0,0255 ^{ABC}	87,18 ± 7,43 ^{AB}	1,56 ± 0,13 ^{AB}	64,83 ± 3,0 ^{cdBC}
	10	0,65 ± 0,04 ^{ABC}	0,64± 0,0483 ^{ABC}	83,25 ± 6,91 ^{BCD}	1,64 ± 0,12 ^{ABC}	65,66 ± 2,0 ^{bcdBC}
	30	0,66 ± 0,04 ^{ABC}	0,65± 0,0440 ^{ABC}	90,75 ± 3,65 ^{AB}	1,51 ± 0,07 ^{AB}	69,66 ± 2,0 ^{abcdABC}
	40	0,57 ± 0,03 ^{BCD}	0,56± 0,0353 ^{BCD}	83,61 ± 7,46 ^{BCD}	1,57 ± 0,14 ^{AB}	74 ± 3,0 ^{abcAB}

Continua

Tabela 3 - Continuação

0	0,59 ^b	0,58 ^b	79,5 ^b	1,70	69,12
40	0,68 ^a	0,67 ^a	89,19 ^a	1,54	66,66
80	0,68 ^a	0,67 ^a	88,98 ^a	1,54	67,29
120	0,64 ^{ab}	0,63 ^{ab}	86,2 ^{ab}	1,57	68,54
0	0,69 ^a	0,68 ^a	86,18 ^{ab}	1,57	64,25
10	0,66 ^a	0,65 ^a	89,84 ^a	1,55	68,75
30	0,65 ^a	0,64 ^a	88,26 ^a	1,53	69,37
40	0,59 ^b	0,57 ^b	79,58 ^b	1,71	69,25
P-valor (Estrutura fatorial)					
Zn	0,0011	0,0011	0,0480	0,0823	0,6539
Mn	0,0013	0,0013	0,0486	0,0744	0,0686
Zn x Mn	0,9927	0,9927	0,2015	0,1776	0,0191
P-valor (Unifatorial)					
	0,03804	0,03802	0,0077	0,0119	0,0023

C.A.A.: Conversão alimentar aparente; Sob: Sobrevivência. Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam médias diferentes segundo o teste de Duncan ($P < 0,05$). As diferentes médias indicadas pelas letras minúsculas, se referem a análise estatística realizada em estrutura bifatorial (ANOVA TWO-WAY). Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam médias diferentes segundo teste de Duncan ($P < 0,05$). As diferentes médias indicadas pelas letras maiúsculas, se referem a análise estatística realizada em estrutura Unifatorial (ANOVA ONE-WAY), contendo os diferentes níveis de suplementação mineral e um tratamento controle.

Tabela 4. Índices corporais das larvas de tilápia do Nilo alimentadas com rações contendo fontes de zinco (Zn) e manganês (Mn) de origem orgânica.

Suplementação mineral na ração (mg kg ⁻¹)		Variáveis		
		CI (cm)	IVS (%)	IHS (%)
Premix com fonte inorgânica		19,16 ± 1,96	13,97 ± 1,07	2,63 ± 0,16
Premix com fonte orgânica				
Zn	Mn			
0	0	16,20 ± 0,41	13,69 ± 0,39	2,13 ± 0,24
	10	16,06 ± 1,73	14,10 ± 0,47	2,10 ± 0,17
	30	14,50 ± 1,04	13,28 ± 0,19	2,24 ± 0,44
	40	17,40 ± 2,56	13,45 ± 0,19	2,44 ± 0,17
40	0	18,20 ± 1,13	13,88 ± 0,15	2,04 ± 0,12
	10	17,96 ± 0,62	12,91 ± 0,09	2,23 ± 0,16
	30	18,50 ± 0,28	13,17 ± 0,57	2,48 ± 0,14
	40	16,83 ± 1,74	13,41 ± 0,65	2,42 ± 0,29
80	0	15,93 ± 0,95	13,60 ± 0,59	2,06 ± 0,24
	10	17,60 ± 0,70	12,81 ± 0,27	2,08 ± 0,18
	30	17,13 ± 0,63	13,16 ± 0,22	2,42 ± 0,26
	40	17,80 ± 1,19	13,08 ± 0,41	1,96 ± 0,19
120	0	17,30 ± 1,55	13,80 ± 0,51	2,47 ± 0,21
	10	17,46 ± 0,86	13,29 ± 1,45	2,22 ± 0,41
	30	20,26 ± 1,36	13,97 ± 0,11	2,46 ± 0,20
	40	16,53 ± 1,54	13,68 ± 0,21	2,40 ± 0,17
0		16,04	13,63	2,23
40		17,11	13,34	2,29
80		17,11	13,16	2,13
120		17,89	13,68	2,39
	0	16,90	13,74	2,17
	10	17,27	13,27	2,16
	30	17,60	13,40	2,40
	40	17,14	13,40	2,30
P-valor (Estrutura fatorial)				
Zn		0,1573	0,4735	0,5108
Mn		0,8932	0,5981	0,4648
Zn x Mn		0,4500	0,9170	0,9309
P-valor (Unifatorial)				
		0,4704	0,9437	0,7834

CI: Comprimento intestinal; IVS: Índice Viscerosomático; IHS: Índice Hepatosomático.

As tilápias alimentadas com rações contendo minerais orgânicos não apresentaram efeito interativo entre os níveis de inclusão do zinco e manganês em relação aos indicadores do estresse oxidativo (Tabela 5). As tilápias alimentadas com rações contendo 80 mg kg⁻¹ de zinco apresentaram a menor (p<0,05) atividade de glutathione s-transferase. Porém as atividades são iguais estatisticamente as das tilápias alimentadas com rações contendo 40 e 120 mg kg⁻¹ de zinco (Tabela 5).

Tabela 5. Indicadores do estresse oxidativo em fígado de larvas de tilápia do Nilo alimentados com ração contendo zinco e manganês de origem orgânica.

Suplementação mineral na ração (mg kg ⁻¹)		Parâmetros				
		LPO	CAT	GST	PCO (10 ⁶)	SOD
Premix mineral inorgânico		0,12± 0,00602	1,84 ± 0,150	1,3± 0,096	8. 10 ⁵ ± 0,15.10 ⁵	4,51± 0,0295
Premix mineral orgânico						
Zn	Mn					
0	0	0,11 ± 0,00501	1,70 ± 0,263	1,1 ±0,057	8.10 ⁵ ± 0,23. 10 ⁵	3,78 ± 0,187
	10	0,09 ± 0,00752	1,89 ± 0,125	1,2 ± 0,044	7. 10 ⁵ ± 0,34.10 ⁵	4,94 ± 0,014
	30	0,13 ± 0,01003	1,92 ± 0,106	1,2 ± 0,025	10.10 ⁵ ±0,23.10 ⁵	4,97 ± 0,067
	40	0,14 ± 0,0	1,75 ± 0,012	1,3 ± 0,025	5. 10 ⁵ ± 0,23.10 ⁵	3,40 ± 0,657
40	0	0,12 ± 0,0	1,69 ± 0,037	1,0 ± 0,037	5. 10 ⁵ ± 0,40.10 ⁵	4,32 ± 0,296
	10	0,12 ± 0,00602	1,94 ± 0,068	1,9 ± 0,077	7. 10 ⁵ ± 0,68.10 ⁵	5,18 ± 0,269
	30	0,12 ± 0,0	1,73 ± 0,178	1,0 ± 0,032	9. 10 ⁵ ± 0,67.10 ⁵	4,93 ± 0,229
	40	0,12 ± 0,00501	1,79 ± 0,131	1,2 ± 0,022	5. 10 ⁵ ± 0,23.10 ⁵	4,91 ± 0,551

Continua

Tabela 5- Continuação

80	0	0,13 ± 0,00501	1,48 ± 0,018	1,9 ± 0,009	7. 10 ⁵ ± 2,05.10 ⁵	3,55 ± 0,185
	10	0,11 ± 0,00929	1,68 ± 0,050	1,0 ± 0,067	11. 10 ⁵ ± 0,23.10 ⁵	3,59 ± 0,199
	30	0,12 ± 0,00602	1,80 ± 0,050	1,9 ± 0,096	6. 10 ⁵ ± 0,40.10 ⁵	4,94 ± 0,522
	40	0,12 ± 0,00289	1,86 ± 0,043	1,1 ± 0,012	8. 10 ⁵ ± 2,05.10 ⁵	4,04 ± 0,480
120	0	0,12 ± 0,01003	1,80 ± 0,028	1,0 ± 0,141	7. 10 ⁵ ± 0,38.10 ⁵	4,61 ± 0,944
	10	0,11 ± 0,01504	1,84 ± 0,0	1,1 ± 0,083	8. 10 ⁵ ± 0,23.10 ⁵	5,00 ± 0,400
	30	0,12 ± 0,00441	1,85 ± 0,064	1,1 ± 0,048	8. 10 ⁵ ± 0,23.10 ⁵	3,90 ± 0,328
	40	0,12 ± 0,00441	1,58 ± 0,100	1,1 ± 0,068	8. 10 ⁵ ± 4,79. 10 ⁵	4,47 ± 0,221
0		0,13	1,8	1,2 ^a	8.10 ⁵	4,27
40		0,12	1,7	1,0 ^{ab}	7.10 ⁵	4,64
80		0,12	1,6	1,0 ^b	8.10 ⁵	4,28
120		0,12	1,7	1,1 ^{ab}	8.10 ⁵	4,50
	0	0,12	1,6	1,0	7.10 ⁵	4,32
	10	0,12	1,8	1,0	8.10 ⁵	4,68
	30	0,13	1,8	1,0	8.10 ⁵	4,69
	40	0,13	1,7	1,2	7.10 ⁵	4,01
P-valor (Estrutura fatorial)						
Zn		0,9394	0,6710	0,0077	0,8232	0,6949
Mn		0,9210	0,4220	0,0835	0,5172	0,2034
Zn x Mn		0,9787	0,7275	0,9940	0,5695	0,2750
P-valor (Unifatorial)						
		0,9993	0,6093	0,0970	0,8806	0,0891

CAT – catalase (mmoles de H₂O₂ degradado.min⁻¹. mg prot⁻¹); LPO – peroxidação lipídica (mmol de MDA mg prot⁻¹); SOD – superóxido dismutase (unidade de SOD. mg prot⁻¹); GST – glutathione transferase (mM. min⁻¹. mg prot⁻¹); PCO – carbonilação de proteína (mM de DNPH/mg prot⁻¹). Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam médias diferentes segundo o teste de Duncan (P<0,05). As diferentes médias indicadas pelas letras minúsculas, se referem a análise estatística realizada em estrutura bifatorial (ANOVA TWO-WAY).

As expressões genicas de *TGF- β* , *IL 8*, *IL 10* e *IFN- γ* foram reguladas positivamente com a inclusão dietética de 40 mg kg⁻¹ de zinco e 10 mg kg⁻¹ de manganês orgânicos, em comparação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 1).

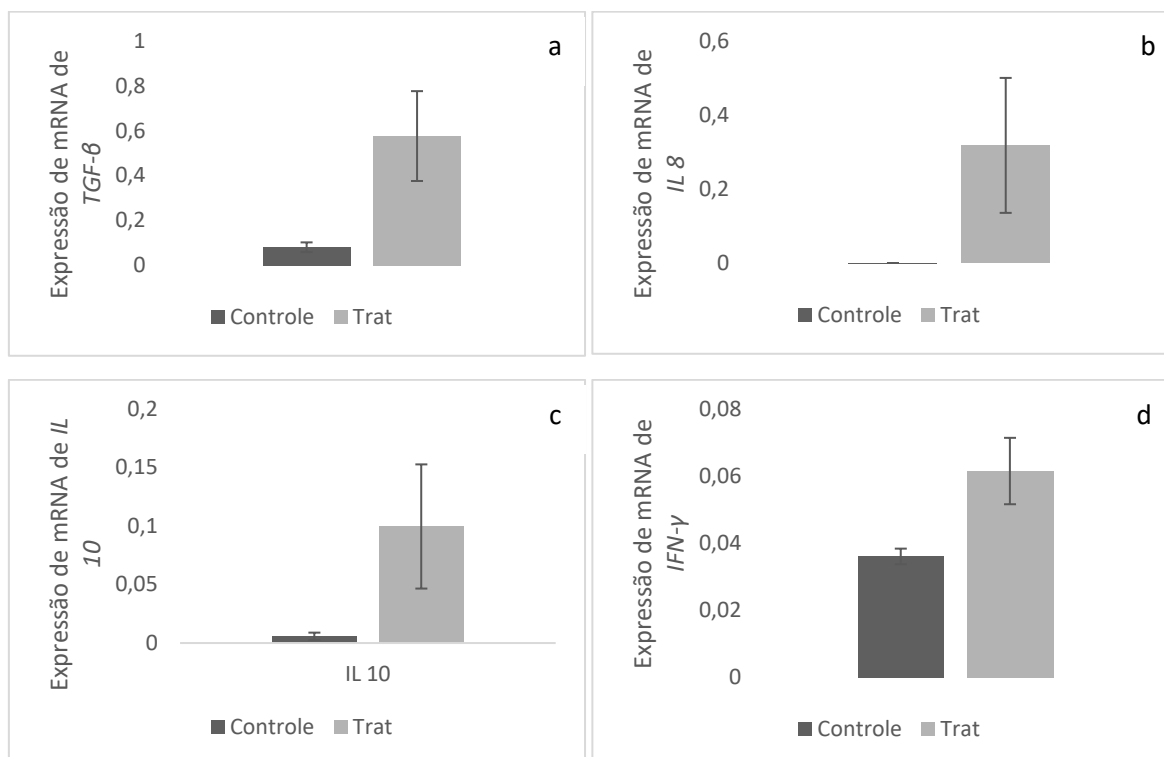


Figura 1. Níveis de mRNA de *TGF- β* (a), *IL 8* (b), *IL 10* (c) e *IFN- γ* (d) no intestino de tilapia alimentadas com ração controle e ração com zinco e manganês orgânico. Os resultados foram apresentados em médias $\pm$ EP.

5. Discussão

A suplementação dietética com minerais em rações para peixes (Kishawy et al., 2020; Dominguez et al., 2019; Jintasataporn et al., 2014; Prabhu et al., 2014) e crustáceos (Xu et al., 2020; Yuan et al., 2020) submetidos a condições de elevado desafio de produção tem se mostrado como uma importante alternativa para garantir a manutenção e/ou a promoção do crescimento e a saúde animal.

Os resultados desta pesquisa confirmaram que a deficiência de suplementação exógena de manganês causa prejuízos ao desempenho animal, fato este esperado, pois este mineral atua no metabolismo de lipídios, proteínas, carboidratos e possui efeito antioxidante ao proteger as células contra oxidação devido a produção de radicais livres (Watanabe et al., 1997).

Um outro ponto relevante que merece atenção foi o fato de que os peixes apresentaram maior crescimento nos tratamentos sem a suplementação exógena de manganês, devido às elevadas taxas de mortalidade terem reduzido as densidades de estocagem nos aquários e

minimizado os efeitos deletérios impostos pela densidade populacional. Assim, a avaliação dos resultados sem estes tratamentos mostrou que as tilápias alimentadas com rações contendo 40 mg kg⁻¹ de zinco e 10 mg kg⁻¹ de manganês ou 80 mg kg⁻¹ de zinco e 10 mg kg⁻¹ de manganês, apresentaram maior sobrevivência e crescimento.

Apesar da escassez de informações sobre as exigências destes minerais para larvas de tilápia e, especialmente sobre o efeito interativo entre zinco e manganês, em geral trabalhos sugerem que a suplementação exógena de 40 mg kg⁻¹ de zinco orgânico melhoram o crescimento de juvenis de tilápia criada entre 30 e 50 g, atribuindo ao melhor efeito da imunidade e desempenho (Prabhu et al., 2014; Kishawy et al., 2020).

Apesar das múltiplas vias de ação metabólica do zinco e do manganês, as melhoras nas taxas de crescimento e sobrevivência das tilápias estão associadas a fatores imunológicos. A inclusão de substâncias imunomoduladoras em dietas de peixes desencadeiam resposta imune inata dos peixes, considerada a primeira linha de defesa contra patógenos. Os parâmetros imunes inespecíficos como a expressão de genes de citocinas inflamatórias (*IL-8*, *IL-10*, *IFN-γ* e *TGF-β*), apresentaram uma regulação positiva no grupo alimentado com minerais orgânicos. O mesmo foi relatado por Wang et al. (2020), a inclusão de zinco demonstrou efeito em outros genes relacionados ao sistema imunológico (*IL-1γ* e *IFN-γ*).

Além dos genes correspondentes aos fatores imunológicas, o zinco e manganês proporcionam a manutenção do equilíbrio redox no fígado. Esta hipótese pode ser corroborada pelos resultados bioquímicos, onde somente os níveis de inclusão de zinco influenciaram na atividade da glutathione transferase do tecido hepático. Além disso, as rações suplementadas com os níveis de zinco que promoveram as maiores taxas de crescimento e sobrevivência, foram aquelas que promoveram as menores atividades de GST hepática. Possivelmente este mineral interferiu por meio de outros mecanismos sobre o equilíbrio redox, induzindo à redução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) preferencialmente ao aumento da atividade desta enzima.

Apesar de as EROs e ERNs serem produzidas naturalmente pelo metabolismo animal, especialmente quando expostos a condições extremas de desafio ou à exigência de alta performance, normalmente este tipo de dano ocorre nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma (Barbosa et al., 2010) e, as EROs ou ENRs podem reagir com os ácidos graxos poli-insaturados ocasionando a peroxidação lipídica e com proteínas ocasionando a formação de carbonila de proteínas (Luo et al., 2006).

Em geral, a deficiência de zinco e manganês está associada com danos produtivos decorrentes da ação deletéria das EROs e ERNs (Jiang et al., 2016; Aliko et al., 2018).

Assim, estes minerais estão associados com redução da lipoperoxidação em vários tecidos da dourada (*Sparus aurata*) (Dominguez et al., 2019) ou no fígado e intestino de carpa cabeça-de-garra (*Ctenopharyngodon idella*) (Tang et al., 2014). De forma semelhante, a atividade das enzimas GST, CAT e SOD promovem a remoção das EROs e ENOs (Vasconcelos et al., 2007; Xu et al., 2015) e a presença do manganês nas rações está relacionada com a atividade destas enzimas em alevinos de carpa indiana (*Labeo rohita*) (Musharraf et al., 2021).

Ainda, a ausência deste mineral também está associada à má formação esquelética, diminuição no consumo de ração, aumento da mortalidade e crescimento reduzido (Lall, 2002; Nguyen et al., 2008; NRC, 2011; Liu et al., 2018). Desta forma, possivelmente outras vias metabólicas, além das estudadas nesta pesquisa podem ter influenciado nos resultados, especialmente daqueles tratamentos que não foram suplementados com manganês e apresentaram taxas de sobrevivência de até 15% inferiores aos demais tratamentos.

Efeitos semelhantes também podem estar associados ao zinco (NRC, 2011), pois este mineral está relacionado com o crescimento animal e com a atividade antioxidante no organismo, por meio da modulação da atividade das enzimas GST, CAT e SOD. O zinco também exerce um papel essencial nas respostas imunes, atuando diretamente nas citocinas, a qual exerce papel no controle e proliferação celular, com efeitos antivirais (Kishawy, et al., 2020), sendo que sua ausência pode afetar as células imunes, ocasionando enfraquecimento da defesa inata via fagocitose e explosão oxidativa (Maaref & Haase, 2016).

A interação verificada entre o zinco e manganês nesta pesquisa é um ponto que merece atenção porque o manganês em altas doses prejudica a absorção do zinco, pois os dois utilizam o mesmo transportador, o metal divalente 1 (DMT1). Os efeitos desta interação podem se intensificar, pois da mesma forma, o ferro e cobre também utilizam este transportador para ser absorvido no intestino (Domínguez et al., 2019).

Geralmente, os minerais inorgânicos utilizados em rações para organismos aquáticos são apresentados na forma de óxido ou sulfato (Nguyen et al., 2019; Kishawy et al., 2019) e, independente da forma como são fornecidos, regulam o crescimento. Contudo, o vigor do animal tende a ser menor, porque muitas vezes não conseguem suprir as exigências do animal (Kishawy et al., 2019).

Diferente dos minerais inorgânicos, as formas de minerais orgânicos tem capacidade de evitar interações negativas com antinutrientes (Apines-Amar et al., 2004). Com isso, a suplementação tende a ser realizada em concentrações maiores em comparação aos minerais orgânicos, podendo chegar a níveis de suplementação de até 3x em relação às fontes

orgânicas, como é o caso do Zn inorgânico (Sá et al., 2005). A mesma analogia pode ser aplicada ao manganês inorgânico, cuja concentração utilizada para carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) pode ser de 20,6 mg kg⁻¹ (Liang et al., 2015).

Essa maior adição é uma estratégia utilizada para compensar a baixa biodisponibilidade destes minerais, uma vez que possuem alta afinidade a antinutrientes, como fitato e taninos, formando complexos com os minerais ocasionando redução na absorção. Contudo, essa suplementação acima dos níveis a longo prazo pode afetar o crescimento, pois minerais como cálcio utilizam mesmo canal de transporte do zinco e manganês, prejudicando sua absorção no intestino para mineralização óssea e a saúde dos peixes (Valko et al., 2006; Liang et al., 2015). Por isso, a busca por formas alternativas de minerais tem aumentado. Assim, o emprego de outras formas químicas de minerais para uso na alimentação animal pode ser vantajosa, pois pode promover uma maior disponibilidade e aproveitamento pelo organismo animal e refletir positivamente na saúde e no crescimento dos peixes. Minerais orgânicos são boas alternativas, pois são encontrados comercialmente e apresentam-se na forma associada a uma proteína ou aminoácido e suas moléculas não são desassociadas ao entrar em contato com o pH ácido no estômago (Katya et al., 2016; Londero, 2020). Esta conformação química facilita a sua absorção direta pelos carreadores intestinais de aminoácidos e peptídeos, promovendo a sua absorção diretamente para o plasma através das células da mucosa intestinal (Glover et al., 2003).

6. Conclusão

O uso de premix contendo zinco e manganês orgânico é vantajoso na produção de Tilápia do Nilo, pois estimulam a resposta imune, melhorando o vigor e a sobrevivência dos alevinos. De modo geral o uso de premix contendo Zn e Mn, que disponibilize 40 mg kg⁻¹ de zinco orgânico e 10 mg kg⁻¹ de manganês orgânico na ração melhoram a eficiência na produção de larvas de tilápia.

7. REFERÊNCIA

- AAFCO. Official Publication, 1999.
- Aebi, H., 1985. Catalase in Vitro. *METHODS IN ENZYMOLOGY* 105, 121–126.
- Aliko, V., Qirjo, M., Sula, E., Morina, V., Faggio, C., 2018. Antioxidant defense system, immune response and erythron profile modulation in gold fish, *Carassius auratus*, after acute manganese treatment. *Fish and Shellfish Immunology* 76, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.042>
- Apines-Amar, M.J.S., Satoh, S., Caipang, C.M.A., Kiron, V., Watanabe, T., Aoki, T., 2004. Amino acid-chelate: A better source of Zn, Mn and Cu for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 240, 345–358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.032>
- Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., Alfenas, R.D.C.G., de Paula, S.O., Minim, V.P.R., Bressan, J., 2010. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev. Nutr* 23, 629–643.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, n.1/2, p.248-254.
- Bombardelli, R.A., Hayashi, C., Raquel, M., Natali, M., Sanches, E.A., Piana, P.A., 2009. Desempenho reprodutivo e zootécnico e deposição de lipídios nos hepatócitos de fêmeas de tilápia-do-nilo alimentadas com rações de diversos níveis energéticos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38, 1391–1399.
- Bury, N.R., Walker, P.A., Glover, C.N., 2003. Nutritive metal uptake in teleost fish. *Journal of Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1242/jeb.00068>
- Cyrino, J.E.P., Bicudo, Á.J. de A., Sado, R.Y., Borghesi, R., Dairiki, J.K., 2010. Revista Brasileira de Zootecnia A piscicultura e o ambiente-o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39, 68–87.
- Do Carmo e Sá, M. v, Pezzato, L.E., Barros, M.M., de Magalhães Padilha, P., 2005. Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Aquaculture Nutrition* 11, 273–281.
- Domínguez, D., Robaina, L., Zamorano, M.J., Karalazos, V., Izquierdo, M., 2019. Effects of zinc and manganese sources on gilthead seabream (*Sparus aurata*) fingerlings. *Aquaculture* 505, 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.004>
- FAO, 2020. The state of world fisheries and aquaculture 2020. *INFORM* 32, 6–10. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Feng, L., Tan, L.N., Liu, Y., Jiang, J., Jiang, W.D., Hu, K., Li, S.H., Zhou, X.Q., 2011. Influence of dietary zinc on lipid peroxidation, protein oxidation and antioxidant defence of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*). *Aquaculture Nutrition* 17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00858.x>
- Habig, W. H. Pabst, M. J.; Jakoby, W. B., 1974. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 249, n. 22, p. 7130-7139.

- Hayashi, C., Rogério Boscolo, W., Martins Soares, C., Meurer, F., 2002. Exigência de Proteína Digestível para Larvas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a Reversão Sexual. Revista Brasileira de Zootecnia 31, 823–828.
- Jiang, W.D., Wu, P., Tang, R.J., Liu, Y., Kuang, S.Y., Jiang, J., Tang, L., Tang, W.N., Zhang, Y.A., Zhou, X.Q., Feng, L., 2016. Nutritive values, flavor amino acids, healthcare fatty acids and flesh quality improved by manganese referring to up-regulating the antioxidant capacity and signaling molecules TOR and Nrf2 in the muscle of fish. Food Research International 89, 670–678. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.020>
- Jiang, Z.-Y., Hunt, J. v, Wolff1, S.P., 1992. Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein, Analytical Biochemistry.
- Jintasataporn, O., Ward, T., Chumkam, S., Jintasataporn, O., 2015. The Efficacy of Mineral-Amino Acid Complex (Zn,Mn,Cu,Fe and Se) in Diets to Growth Performance, Immune Status and Meat Quality of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquacultura Indonesiana 16, 33–37.
- Katya, K., Lee, S., Yun, H., Dagoberto, S., Browdy, C.L., Vazquez-Anon, M., Bai, S.C., 2016. Efficacy of inorganic and chelated trace minerals (Cu, Zn and Mn) *premix* sources in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed plant protein based diets. Aquaculture 459, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.033>
- Kishawy, A.T.Y., Roushdy, E.M., Hassan, F.A.M., Mohammed, H.A., Abdelhakim, T.M.N., 2020. Comparing the effect of diet supplementation with different zinc sources and levels on growth performance, immune response and antioxidant activity of tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture Nutrition 26, 1926–1942. <https://doi.org/10.1111/anu.13135>
- Lall, S. P. The minerals. In: Halver, J.E., Hardy, R.W., 2002. (Ed.) Fish Nutrition. New York, USA: Academic Press, p. 259–308.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., Ahn, B.-W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. Methods in enzymology 186.
- Lin, Y.H., Lin, S.M., Shiau, S.Y., 2008. Dietary manganese requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Aquaculture 284, 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.049>
- Liang, J.J., Wang, S., Han, B., Tian, L.X., Yang, H.J., Liu, Y.J., 2015. Dietary manganese requirement of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.) based on growth and tissue manganese concentration. Aquaculture Research 46, 2991–2998. <https://doi.org/10.1111/are.12455>
- Londero, A., Pires Rosa, A., Golin Luiggi, F., Oliveira Fernandes, M., Guterres, A., Moura, S. de, Hettwer Pedroso, N., Santos, N., 2020. Effect of supplementation with organic and inorganic minerals on the performance, egg and sperm quality and, hatching

- characteristics of laying breeder hens. *Animal Reproduction Science* 215. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106309>
- Luo, Y., Su, Y., Lin, R. zhang, Shi, H. hong, Wang, X. rong, 2006. 2-Chlorophenol induced ROS generation in fish *Carassius auratus* based on the EPR method. *Chemosphere* 65, 1064–1073. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.02.054>
- Maares, M., Haase, H., 2016. Zinc and immunity: An essential interrelation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 611, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.03.022>
- Martin, S. A. M.; Król, E., 2017. Nutrigenomics and immune function in fish: new insights from omics Technologies. *Developmental and Comparative Immunology*, Aberdeen, v. 75, p. 86-98.
- Meagher, E.A., Fitzgerald, G.A., 2000. Forum: Role of Oxidation in Atherosclerosis Indices of lipid peroxidation in vivo: Strengths and limitations. *Free Radical Biology & Medicine* 28, 1745–1750.
- Meyers, S.P., 1994. Developments in world aquaculture, feed formulations, and role of carotenoids, *Pure & Appl. Chern.*
- Moraes, G., de Almeida, L.C., 2020. Nutrition and functional aspects of digestion in fish, in: *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Elsevier, pp. 251–271. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815872-2.00011-7>
- Muralisankar, T., Bhavan, P.S., Radhakrishnan, S., Seenivasan, C., Manickam, N., Srinivasan, V., 2014. Dietary supplementation of zinc nanoparticles and its influence on biology, physiology and immune responses of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biological Trace Element Research* 160, 56–66. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0026-4>
- Musharraf, M., Khan, M.A., 2021. Dietary manganese requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton) estimated by growth, tissue manganese concentration and hepatic manganese-superoxide dismutase activity. *Aquaculture* 540. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736734>
- National Reserch Council - NRC, 2011. Nutrient requirement of fish and shrimp. National Academic Press, Washington, p. 164-184.
- Nguyen, V.T., Satoh, S., Haga, Y., Fushimi, H., Kotani, T., 2008. Effect of zinc and manganese supplementation in *Artemia* on growth and vertebral deformity in red sea bream (*Pagrus major*) larvae. *Aquaculture* 285, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.030>
- Peixe BR, 2021. Associação Brasileira da Piscicultura. São Paulo, p. 136.
- Prabhu, P.A.J., Geurden, I., Fontagné-Dicharry, S., Veron, V., Larroquet, L., Mariojouis, C., Schrama, J.W., Kaushik, S.J., 2016. Responses in micro-mineral metabolism in rainbow trout to change in dietary ingredient composition and inclusion of a micro-mineral premix. *PLoS ONE* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149378>
- Prabhu, P.A.J., Silva, M.S., Kröeckel, S., Holme, M.H., Ørnsrud, R., Amlund, H., Lock, E.J., Waagbø, R., 2019. Effect of levels and sources of dietary manganese on growth and

- mineral composition of post-smolt Atlantic salmon fed low fish meal, plant-based ingredient diets. *Aquaculture* 512. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734287>
- Salgueiro, M.J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M.I., Caro, R., Paoli, T., Hager, A., Weill, R., Boccio, J., 2000. Zinca as an essential micro nutriente: A review. *Nutrition Reserch* 20, 737–755.
- Shiau, S.Y., Jiang, L.C., 2006. Dietary zinc requirements of grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on immune responses. *Aquaculture* 254, 476–482. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.033>
- Silva, M.S., Kröckel, S., Jesu Prabhu, P.A., Koppe, W., Ørnsrud, R., Waagbø, R., Araujo, P., Amlund, H., 2019. Apparent availability of zinc, selenium and manganese as inorganic metal salts or organic forms in plant-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 503, 562–570. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.005>
- Sobjak, T.M., Romão, S., do Nascimento, C.Z., dos Santos, A.F.P., Vogel, L., Guimarães, A.T.B., 2017. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. *Chemosphere* 182, 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.031>
- Rodrigues, F., Farias, C., 2018. Saiba por que os microminerais são fundamentais para a saúde de peixes e camarões. Disponível em: <<https://www.alltech.com/pt-br/blog/saiba-por-que-os-microminerais-sao-fundamentais-para-saude-de-peixes-e-camaroes>>. Acesso em: jul. 2020.
- Tang, R.J., Feng, L., Jiang, W.D., Liu, Y., Kuang, S.Y., Jiang, J., Zhang, Y.A., Tang, L., Zhou, X.Q., 2014. Growth, digestive and absorptive abilities and antioxidative capacity in the hepatopancreas and intestine of young grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* Val.) fed graded levels of dietary manganese. *Aquaculture Research* 47, 1917–1931. <https://doi.org/10.1111/are.12649>
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B. de F., Manfredini, V., Benfato, M. da S., Kubota, L.T., 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação, *Quim. Nova*.
- Ward, T., 2021. Performance Trace Minerals: A Category of One. Zinpro. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.zinpro.com/performance-trace-minerals-a-category-of-one/>>. Acesso em: 31, jan. de 2021.
- Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S., 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151, 185 – 207.
- Webster, C.D., Lim, Chhorn., 2002. Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI.

- Xu, Z., Wang, Y., Gul, Y., Li, Q., Song, J., Hu, M., 2020. Effects of copper supplement on the immune function and blood-chemistry in adult Chinese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*. *Aquaculture* 515. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734576>
- Yuan, Y., Luo, J., Zhu, T., Jin, M., Jiao, L., Sun, P., Ward, T.L., Ji, F., Xu, G., Zhou, Q., 2020. Alteration of growth performance, meat quality, antioxidant and immune capacity of juvenile *Litopenaeus vannamei* in response to different dietary dosage forms of zinc: Comparative advantages of zinc amino acid complex. *Aquaculture* 522. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735120>