

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**GLICINATOS DE ZINCO, MANGANÊS E COBRE EM
DIETAS PARA JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO**

Autor: Allan Vinnícius Urbich

Orientador: Prof. Titular. Wilson Massamitu Furuya

Maringá - PR

Junho - 2023

GLICINATOS DE ZINCO, MANGANÊS E COBRE EM DIETAS PARA JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO

Autor: Allan Vinnícius Urbich

Orientador: Prof. Titular. Wilson Massamitu Furuya

“Tese apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal”.

Maringá - PR

Junho - 2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

U73g	<p>Urbich, Allan Vinnicius Glicinatos de zinco, manganês e cobre em dietas para juvenis de tilápias do Nilo / Allan Vinnicius Urbich. -- Maringá, PR, 2023. 84 f.: il. color., tabs.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2023.</p> <p>1. Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) - Digestibilidade. 2. Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) - Nutrição - Minerais orgânicos. 3. Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) - Desempenho produtivo. 4. Enzimas digestivas. I. Furuya, Wilson Massamitu, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.</p>
CDD 23.ed. 639.3774	



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

GLICINATOS DE ZINCO, MANGANÊS E COBRE EM DIETAS PARA JUVENIS DE TILÁPIAS DO NILO

Autor: Allan Vinnicius
Urbich Orientador: Prof. Dr. Wilson
Massamitu Furuya

TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração
Produção Animal

APROVADO em 28 de junho de 2023.

Documento assinado digitalmente
gov.br WILSON ROGERIO BOSCOLO
Data: 28/06/2023 17:39:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Wilson Rogério Boscolo

Documento assinado digitalmente
gov.br GIOVANI SAMPAIO GONCALVES
Data: 30/06/2023 07:54:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Giovani Sampaio
Gonçalves

Documento assinado digitalmente
gov.br LUIZ VITOR OLIVEIRA VIDAL
Data: 28/06/2023 18:57:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Luiz Vitor Oliveira Vidal

Documento assinado digitalmente
gov.br ALTEVIR SIGNOR
Data: 28/06/2023 19:13:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Altevir Signor

Documento assinado digitalmente
gov.br WILSON MASSAMITU FURUYA
Data: 28/06/2023 17:01:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya
Orientador

EPÍGRAFE

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”.

Friedrich Neitzche

Aos meus Pais Terezinha Mendes Urbich e Valdemir Urbich, por não medirem esforços para que esse sonho seja realizado, aos meus entes queridos que aqui já não se fazem presentes que sempre me ajudaram no que era possível, ao meu Orientador Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya pelos 10 anos de acompanhamento durante toda a trajetória acadêmica.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Wilson Massamitu Furuya, por fazer parte durante minha trajetória acadêmica, sendo 10 anos de acompanhamento, desde a graduação, mestrado e doutorado, colaborando em todas as etapas da formação. Desde contribuições nas disciplinas, escrita de TCC, dissertação, tese, conselhos, puxões de orelha, mas tudo para o crescimento pessoal e profissional, obrigado.

Aos meus pais Terezinha Mendes Urbich e Valdemir Urbich, por todo apoio durante meu período acadêmico, ajudas financeiras, paciência, conselhos repassados, empréstimo de carro para viagens para buscar rações, peixes, viagens para congressos e outros afins. Nunca mediram esforços para o meu melhor, fazendo por mim o que não puderam fazer por eles no passado, sou muito grato a tudo, sempre mostrando a importância de se ter humilde em qualquer lugar que estiver.

A Deus, por toda saúde e força de vontade concedida para ir em busca dos ideais e por me permitir fazer parte de todo esse processo.

À Prof^ª Dr^ª. Valéria Rossetto Barriviera Furuya, por toda a ajuda, pelo período de orientação durante meu mestrado, por todos os conselhos e pelas oportunidades de crescimento profissional concedidas.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – UEM, por todos os ensinamentos durante o período de aulas e as contribuições profissionais repassadas.

A secretária do PPZ, Solange, por sanar sempre todas as dúvidas com muito carinho e estar sempre prontamente disponível para ajudar no que é necessário.

Ao Pesquisador^o Dr. Giovani Sampaio Gonçalves, pela contribuição na extrusão das dietas tanto para meu experimento de mestrado como o de doutorado, gratidão!

Ao Prof. Dr.^o Marcelo Vicari, pelo empréstimo de equipamentos para a finalização do experimento.

À Prof^a Dr^a. Adriana por toda ajuda e carinho, na realização das análises histológicas bem como ajuda para utilização do analisador bioquímico.

Pessoas do Laboratório de Maringá.

Ao Prof. Dr. Leandro Castilha pelo empréstimo da Bomba calorimétrica, para execução das análises.

Ao grupo de pesquisa *Fish Nutrition*, Thaís Pereira da Cruz, Eduarda Szymeczuk, Ana Flávia, Analene Alves Nascimento, Élisson Macedo. Em especial a Larissa Dal Col Calado, Paola Paulovski, Aline Victoria Sampaio, João Antônio Galiotto Miranda, por toda a ajuda na condução do experimento, realização das análises laboratoriais e por todas as contribuições nesse período, gratidão.

À BASF S.A., pelo fornecimento dos minerais orgânicos utilizados na execução do experimento e pelo apoio ao projeto de pesquisa, agradecimento especial ao Médico Veterinário Bruno Wernick, consultor de serviços técnico da BASF S.A. Nutrição animal São Paulo, SP, São Paulo.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e a taxa de bancada, sem ela não seria possível a realização do Doutorado.

Aos meus colegas e familiares que de alguma forma contribuíram nesse período para a realização do doutorado, alguns já não se fazem mais presentes, mas tiveram suas contribuições enquanto estavam presentes.

BIOGRAFIA

Allan Vinnícius Urbich, filho de Terezinha Mendes Urbich e Valdemir Urbich, nasceu na cidade de Ponta Grossa, estado do Paraná, em 08 de dezembro de 1995.

Em fevereiro de 2013 ingressou no curso de Graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, obtendo o título de Zootecnista em agosto de 2017.

Em março de 2018 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Produção Animal na Universidade Estadual de Ponta grossa- UEPG, área de produção animal e nutrição de animais não ruminantes, com ênfase em Aquicultura, realizou estudos com aminoácidos para tilápia do Nilo na terminação, sendo titulado como Mestre em Zootecnia em fevereiro de 2020.

Em março de 2020 iniciou os estudos em nível de doutorado, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá – PPZ/UEM, área de concentração – Produção animal, tendo como especialidade a área de Aquicultura. Submeteu-se à banca examinadora para a qualificação em 29 de agosto de 2022 e em breve a defesa da tese para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Aquicultura.....	17
1.2 Tilápia do Nilo	17
1.3 Ingredientes de origem vegetal	18
1.4 Minerais	19
1.5 Minerais Orgânicos	22
<i>1.5.1 Zinco</i>	22
<i>1.5.2 Cobre</i>	27
<i>1.5.3 Manganês</i>	30
ARTIGO CIENTÍFICO	41
1. Introdução	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 Comitê de ética e Local de realização do experimento	45
2.2 Dietas e alimentação dos peixes.....	45
2.3 Peixes e manejo.....	49
2.4 Coleta de amostras	50
2.5 Desempenho produtivo e retenção de nutrientes.....	52
2.6 Determinação da digestibilidade	53
2.7 Atividade de enzimas digestivas	53
2.8 Análises químicas	54

2.9 Parâmetros bioquímicos	55
2.10 Análises histológicas.....	56
2.11 Minerais nas vértebras.....	57
3. Análise estatística	57
4. Resultados	58
4.1 Desempenho.....	58
4.2 Composição corporal e composição do filé	59
4.3 Composição de minerais corporal e nas vértebras	60
4.4 Retenção corporal de minerais	61
4.5 Atividade de Enzimas Digestivas.....	62
4.6 Coeficiente de digestibilidade aparente.....	63
4.7 Parâmetros sanguíneos	64
4.8 Morfometria intestinal.....	65
4.9 Balanço de minerais	67
4.10 Excreção de minerais	68

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Composição de ingredientes das dietas experimentais (g/kg)	46
Tabela 2- Fontes, níveis de inclusão e composição analisada dos minerais das dietas experimentais (mg/kg, matéria seca).	48
Tabela 3- Desempenho de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas ¹	58
Tabela 4- Composição corporal (g/kg) de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas ¹	60
Tabela 5- Composição de minerais corporal e nas vértebras (mg/kg, matéria natural) de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas ¹	61
Tabela 6- Retenção corporal de minerais em (mg/kg) juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas ¹	62
Tabela 8- Coeficiente de digestibilidade aparente (%) em dietas para juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas ¹	64

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 -Diferentes formas de minerais quelatados e complexados disponíveis no mercado... 21	
Figura 2 - Processo de absorção de Zn dietético pelos enterócitos. ZIP: proteína transportadora de Zn para o interior do enterócito; AAT: transportador de aminoácidos; MT: metalotioneína; AA: aminoácido; ZnT: proteína transportadora para fora do enterócito..... 26	
Figura 3 - Processo de absorção de Cu dietético pelos enterócitos. CTR1: transportador de Cu da membrana apical do enterócito; DCT1: transportador de íons; DIF: canal de difusão de Cu não dependente de energia; ATOX1: chaperonas de Cu carregadoras de Cu intracelular; ATP7A: ATPase transportadora de Cu da membrana basolateral do enterócito; ENZ: enzimas envolvidas na reação de redução do Cu^{2+} para Cu^{+} 28	
Figura 4 - Atividade de enzimas digestivas em juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas ¹ 63	
Figura 5 - Morfometria intestinal de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com a dieta controle. Aumento de 10x (A) e 20x (B), coloração hematoxilina-eosina (HE)..... 66	
Figura 6 - Excreção de minerais (mg/kg fezes, matéria seca) de juvenis de tilápia do Nilo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas ¹ 69	

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar o efeito da substituição de microminerais inorgânicos (MI) por microminerais orgânicos (MO) sobre o desempenho produtivo, composição corporal, histologia intestinal, atividade de enzimas digestivas e digestibilidade em juvenis de tilápia do Nilo. Os peixes ($n = 432$; $2,5 \pm 0,5$ g; média \pm DP) foram aleatoriamente divididos em quatro grupos com quatro repetições em cada grupo (27 peixes/repetição) e alimentados com as respectivas dietas experimentais por oito semanas. Os tratamentos experimentais foram MTI: Controle, níveis comercialmente recomendados de microminerais inorgânicos (Zn, Mg e Cu) na forma de sulfatos; MTO100: microminerais traços orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI (Zn, Mn e Cu); MTO75: microminerais traços orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI (Zn, Mn e Cu) e MTO50: microminerais traços orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI (Zn, Mn e Cu). A inclusão de MO melhorou a retenção de minerais corporais, como cálcio e zinco em 9,2 % e 33,3 %, e aumentou a atividade das enzimas digestivas, incluindo amilase, protease e lipase em 40 %, 26,1 % e 36 % respectivamente. Além disso, os peixes alimentados com a dieta que continha MO apresentaram maior coeficiente de digestibilidade da energia bruta e proteína bruta em 8,2 % e 2,2 %, respectivamente, em comparação com aqueles que receberam apenas microminerais inorgânicos. Houve uma redução de 28,1 % da excreção de zinco, 15,6 % de manganês e 26,3 % de cobre no meio aquático, o que contribuiu para a melhoria dos parâmetros de qualidade da água e redução do impacto ambiental da atividade. Concluiu-se que a utilização de MO em dietas para tilápia do Nilo pode ser uma estratégia benéfica para melhorar a nutrição, além de reduzir os impactos ambientais da aquicultura.

Palavras-chave: Digestibilidade, enzimas digestivas, minerais orgânicos, desempenho, balanço minerais, *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effect of substituting inorganic microminerals (IM) with organic microminerals (OM) on the productive performance, body composition, intestinal histology, digestive enzyme activity, and digestibility in juvenile Nile tilapia. The fish ($n= 432$; 2.5 ± 0.5 g; mean \pm SD) were randomly divided into four groups with four replicates in each group (27 fish/replicate) and fed the respective experimental diets for eight weeks. The experimental treatments were: TIM: Control, commercially recommended levels of inorganic microminerals (Zn, Mg, and Cu) in the form of sulfates; TOM100: organic trace minerals to meet 100% of the TIM diet requirement (Zn, Mn, and Cu); TOM75: organic trace minerals to meet 75% of the TIM diet requirement (Zn, Mn, and Cu) and TOM50: organic trace minerals to meet 50% of the TIM diet requirement (Zn, Mn, and Cu). The inclusion of organic matter (OM) improved the retention of body minerals such as calcium and zinc by 9.2% and 33.3%, respectively, and increased the activity of digestive enzymes, including amylase, protease, and lipase, by 40%, 26.1%, and 36%, respectively. Furthermore, fish fed with the diet containing OM showed a higher coefficient of digestibility for gross energy and crude protein by 8.2% and 2.2%, respectively, compared to those receiving only inorganic microminerals. There was a reduction of 28.1% in zinc excretion, 15.6% in manganese, and 26.3% in copper in the aquatic environment, contributing to the improvement of water quality parameters and reducing the environmental impact of the activity. It is concluded that the use of OM in Nile tilapia diets can be a beneficial strategy to improve nutrition while reducing the environmental impacts of aquaculture.

Keywords: Digestibility, digestive enzymes, organic minerals, performance, mineral balance, *Oreochromis niloticus*.

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aquicultura

Para atender à crescente demanda de consumo de pescado, a aquicultura tem se expandido massivamente e utilizado diversas tecnologias de produção, fornecendo mais de 50% do pescado consumido por humanos desde 2016 (FAO, 2020). Para tanto, a indústria da aquicultura tem adotado e desenvolvido tecnologias de produção intensiva.

Embora os peixes e animais aquáticos sejam altamente eficientes na utilização de alimentos, parte dos nutrientes, incluindo minerais, ainda é liberada na água sob a forma dissolvida e como excreções sólidas, resultando na poluição do meio ambiente (BOYD e TUCKER, 2014; CLAY, 2008). Diante desses desafios, a nutrição desempenha um papel importante, atuando direta e indiretamente em diversas vias metabólicas que afetam a saúde (POHLENZ e GATLIN, 2014), o estresse (ZOLDERDO et al., 2016) e a qualidade dos efluentes gerados pela atividade (MIDLEN e REDDING, 1998).

Portanto, a indústria da aquicultura investe esforços intensivos na redução dos poluentes liberados e minerais (GICHANA et al., 2018; TURCIOS e PAPENBROCK, 2014). Nesta pesquisa, a espécie de maior interesse é a tilápia do Nilo, que é uma das mais produzidas e aceitas pelo consumidor.

1.2 Tilápia do Nilo

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie de peixe de água doce economicamente importante em regiões tropicais e subtropicais do mundo (HU et al., 2020). A tilápia tem sido criada comercialmente e sua produção global aumentou de 2,6 milhões de toneladas em 2010 para 4,5 milhões de toneladas em 2018 (FAO, 2022). Além de buscar aumentar a produtividade e obter peixes de melhor qualidade, manter um

sistema de aquicultura sustentável se tornou um importante objetivo industrial (TIAN et al., 2019).

As exigências nutricionais das tilápias variam de acordo com diferentes fatores, como linhagem, sexo, ambiente de criação, condições experimentais, saúde e níveis energético e de nutrientes da dieta (FURUYA et al., 2013). Por ser uma espécie amplamente estudada, há um amplo conhecimento em nutrição da tilápia, permitindo que a espécie seja criada com sucesso em todo o mundo.

Durante muito tempo, os estudos em nutrição animal foram focados nos macronutrientes devido à sua importância nos custos relacionados à nutrição (SONODA; FRANÇA; CYRINO, 2016). No entanto, com os avanços no conhecimento nutricional da tilápia, estudos que se concentram no uso de aditivos e nos micronutrientes, como vitaminas e minerais, têm recebido destaque (PRABHU; SCHRAMA; KAUSHIK, 2016).

Entre as funções gerais dos minerais, estão a composição do sistema esquelético, das proteínas e dos lipídios, a ativação de sistemas enzimáticos e a manutenção do equilíbrio osmótico (WEBSTER; LIM, 2015). Diferentemente de outras biomoléculas, como aminoácidos e ácidos graxos, o efeito de um mineral no organismo não pode ser substituído por outro (NRC, 2011).

Vários fatores influenciam a biodisponibilidade dos minerais na dieta, incluindo o nível de inclusão, a forma do nutriente, o tamanho da partícula e a digestibilidade da dieta, as interações com biomoléculas que podem ser sinérgicas ou antagônicas, as condições fisiológicas e patológicas do peixe, a concentração mineral na água, além de particularidades da espécie alvo (WEBSTER; LIM, 2015).

1.3 Ingredientes de origem vegetal

O crescimento da aquicultura sustentável tem exigido a substituição de proteínas e óleos marinhos pelo uso de ingredientes vegetais em dietas para aquicultura. Cereais e legumes são fontes sustentáveis de energia e nutrientes de baixo custo em dietas para tilápias (KAMALAM; MEDALE; PANSEERAT, 2017; MAAS et al., 2020; TRAN-NGOC et al., 2019).

Entretanto, o uso desses ingredientes vegetais é desafiador devido à presença de fatores antinutricionais que podem reduzir a utilização de nutrientes, especialmente minerais (GATLIN et al., 2007; GHOSH; RAY; RINGO, 2019; WANG et al., 2009). No entanto, os alimentos vegetais são fontes limitadas de alguns minerais e

frequentemente contêm fatores que reduzem a biodisponibilidade mineral (NGUYEN, LAY et al., 2019). Para solucionar esse problema e reduzir o impacto ambiental, o uso de minerais orgânicos tem sido proposto como uma alternativa, já que não se complexam com outros ingredientes da dieta e possuem alta biodisponibilidade.

1.4 Minerais

Os minerais são essenciais em diversos processos metabólicos dos peixes, tais como a manutenção da rigidez dos ossos, o equilíbrio osmótico com o meio aquático, a regulação do sistema nervoso e endócrino, e a ativação de enzimas envolvidas em processos metabólicos. Os minerais mais estudados na nutrição de peixes são cálcio, magnésio, manganês, ferro, zinco, iodo, cobre e selênio. Diferentemente de outros animais, os peixes obtêm minerais tanto da dieta quanto do meio em que vivem (PEZZATO et al., 2004).

Com o avanço da biotecnologia, estão sendo investigadas fontes alternativas de microminerais que sejam mais biodisponíveis. Esses minerais são compostos formados por íons metálicos complexados a substâncias orgânicas ou sintéticas, como aminoácidos e polissacarídeos, que facilitam a absorção por transporte ativo ao longo do intestino delgado (BERTECHINI, 2014).

Para a formação dos quelatos, são utilizadas diversas moléculas como ligantes, que podem ter ou não funções específicas no metabolismo. Os quelatos possuem baixo peso molecular e sua capacidade oxidativa ou de ligação depende do tamanho da molécula e da presença de radicais carboxílicos. Normalmente, um mineral pode se ligar a uma, duas ou várias dessas moléculas para formar um composto mineral organicamente ligado ou quelato, que pode ser comercializado como fonte de mineral (KIEFER, 2005).

Existem diferentes formas de minerais quelatados e complexados disponíveis no mercado (Figura 1). De acordo com a Associação de Oficiais Americanos de Controle de Alimentação (*Association of American Feed Control Officials*, AAFCO), existem cinco categorias de microminerais quelatados:

- Complexo Metal Aminoácido Específico – resultante da ligação de um sal de metal solúvel com um aminoácido específico. O complexo metal aminoácido específico

é bem definido e muito consistente em sua produção. Exemplos: Zn-Metionina, Mn-Metionina, Cu-Lisina e Fe-Metionina. Esse complexo é mais eficiente que quelatos, proteinatos e polissacarídeos.

- Complexo Metal Aminoácido – muito semelhante ao complexo metal aminoácido específico, é resultante da complexação de um sal de metal com uma mistura de aminoácidos livres. A única diferença entre as duas categorias é que o aminoácido não é especificado.

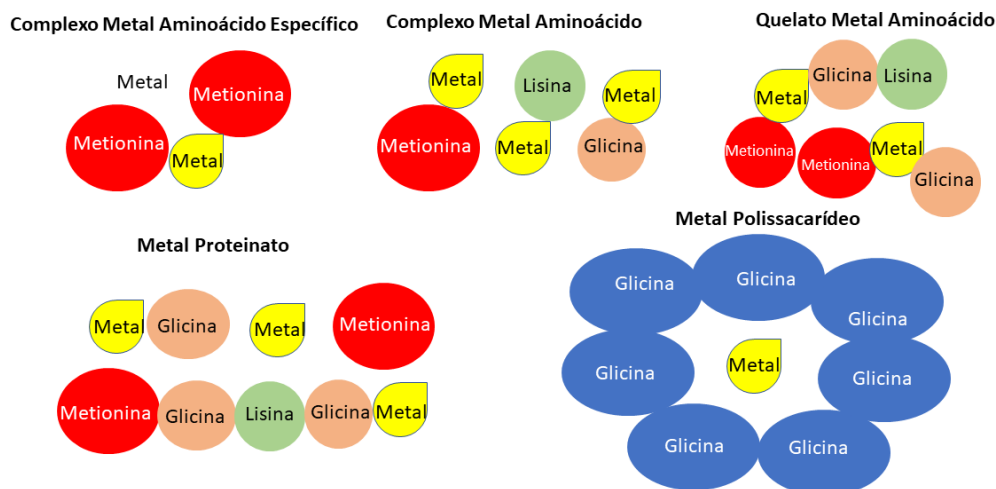
- Quelato Metal Aminoácido – resultante da reação de um íon metálico de um sal solúvel com aminoácidos em uma reação molar de um mol de metal para um, dois ou três (preferencialmente dois) mols de aminoácidos, formando uma ligação covalente coordenada. Por definição, quelatos de metais são como os proteinatos, a diferença é que os quelatos devem ter um peso molecular máximo pré-determinado de 800 Daltons.

- Metal Proteinato – resultante da quelatação de um sal solúvel com aminoácidos e/ou proteínas parcialmente hidrolisadas. O produto pode conter somente aminoácidos, dipeptídeos, tripeptídeos ou outros derivados de proteína.

- Metal Polissacarídeo – resultante da complexação de um sal solúvel com um polissacarídeo. Este produto é uma matriz de mineral orgânico, sem ligações químicas entre o metal e o polissacarídeo. A matriz de polissacarídeo somente envolve o micromineral, promovendo alguma proteção física contra a degradação intestinal.

É importante mencionar que existem diferentes formas de minerais quelatados e complexados disponíveis no mercado, e de acordo com a Associação de Oficiais Americanos de Controle de Alimentação (Association of American Feed Control Officials, AAFCO), há cinco categorias de microminerais quelatados. A figura 1 apresenta essas diferentes formas disponíveis no mercado:

Figura 1-Diferentes formas de minerais quelatados e complexados disponíveis no mercado.



Fonte: Adaptado de Kiefer (2005).

Minerais complexados e quelatados são compostos utilizados na nutrição animal que possuem diferenças significativas em relação à estabilidade e absorção do mineral. Embora sejam produzidos pelos mesmos processos, com ingredientes e quantidades diferentes, a presença ou não de um anel heterocíclico e a carga da molécula formada são características distintas dos complexados e quelatados.

Os minerais complexados apresentam uma molécula com carga positiva e são menos estáveis em condições de baixo pH, como o ambiente gastrointestinal dos animais. Isso pode resultar em uma série de consequências negativas, como competição com outros componentes da dieta no intestino, redução na atividade de enzimas e vitaminas e menor biodisponibilidade do mineral. Além disso, a instabilidade da molécula pode levar a um aumento na excreção dos minerais.

Por outro lado, os minerais quelatados possuem em sua estrutura pelo menos um anel heterocíclico e uma molécula com carga neutra, tornando-os mais estáveis dentro do organismo do animal. Essa estabilidade protege o mineral de reações químicas indesejáveis no trato gastrointestinal e não compromete a atividade e absorção de outros componentes da dieta, como enzimas, vitaminas e minerais. Além disso, os quelatos têm maior eficiência na absorção do mineral e menor excreção para o meio ambiente, já que passam facilmente através da parede intestinal para a corrente sanguínea.

Em resumo, a escolha entre minerais complexados e quelatados deve ser feita levando em consideração as necessidades específicas de cada animal e os objetivos da suplementação mineral. A compreensão das diferenças entre esses compostos é essencial para garantir uma nutrição adequada e eficiente dos animais.

1.5 Minerais Orgânicos

Minerais inorgânicos (MI) são instáveis em todo o trato gastrointestinal e sujeitos a interações e antagonismos (ANDERSEN ET AL., 1997; SATOH et al., 2001). Pesquisas recentes evidenciaram que a adição de minerais orgânicos (MO) em dietas de peixes melhora o desempenho produtivo (DOMÍNGUEZ et al., 2019; KATYA et al., 2017), disponibilidade de minerais (SILVA et al., 2019) e deposição de micro minerais no tecido muscular (NGUYEN et al., 2019). Portanto, os MO são considerados uma alternativa promissora aos MI, uma vez que são absorvidos de forma eficiente e, conseqüentemente, retidos no tecido para melhorar o desempenho produtivo dos peixes (CHEN et al., 2020).

Estudos recentes evidenciaram o aumento da biodisponibilidade de MO em comparação com MI em dourada (*Sparus aurata*) (IZQUIERDO et al., 2017), carpa comum (*Cyprinus carpio*) (LIANG et al., 2020) e striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) (BUENTELLO et al., 2009). No entanto, há poucos estudos sobre MO na forma de glicinatos em relação ao desempenho produtivo e digestibilidade em tilápias. Assim, é importante conduzir mais pesquisas com MO para otimizar a eficiência alimentar em dietas ambientalmente corretas. Dessa forma foi realizado esse estudo com o zinco, cobre e manganês.

1.5.1 Zinco

O zinco é um micronutriente essencial que participa de várias atividades biológicas em animais, sendo o segundo oligoelemento mais abundante no corpo. Por não poder ser armazenado, é necessária uma ingestão regular desse elemento (SWAIN et al., 2016). O zinco é importante para o crescimento, metabolismo, função imunológica e inibição da ação de espécies reativas de oxigênio em peixes (ANTONY JESU PRABHU, SCHRAMA, KAUSHIK, 2016; NRC, 2011; WATANABE et al., 1997).

Além disso, o zinco tem um papel estrutural nas proteínas e é um cofator de diversas enzimas que modulam sua atividade (MURALISANKAR et al., 2015; STEFANIDOU et al., 2006). Em água doce, os níveis normais de zinco (SPRY et al., 1988) podem não ser suficientes para atender às exigências de crescimento.

Entre as funções das enzimas relacionadas ao zinco, estão a anidrase carbônica (formação de CO_2), CuZnSOD (combate ao estresse oxidativo), carboxipeptidase (digestão de proteínas), fosfatase alcalina (hidrólise de ésteres de fosfato), polimerase (síntese de cadeias de RNA/DNA) e collagenase (cicatrização de feridas). O zinco também é fundamental para o metabolismo dos macronutrientes, como carboidratos, proteínas e lipídios (LALL, 2002).

Diferentes fontes de zinco apresentam diferentes funções (LIN et al., 2013; SHAHPAR, JOHARI, 2018; WANG, WANG, 2015). As fontes inorgânicas de zinco incluem diversos sais químicos contendo este elemento, como óxido de zinco (ZnO), cloreto de zinco (ZnCl_2) e sulfato de zinco (ZnSO_4), os quais podem ser utilizados na produção de dietas para animais aquáticos (Reilly, 2004).

Diversas fontes orgânicas de zinco têm sido investigadas em estudos como aditivos para dietas de animais aquáticos, incluindo uma mistura de aminoácidos quelatos ou complexos com zinco (Zn-AA), metionina de zinco, lisina de zinco, gluconato de zinco, acetato de zinco, picolinato de zinco, propionato de zinco e proteinase de zinco (APINES et al., 2001; KUCUKBAY et al., 2006; MAAGE et al., 2001). Vários estudos demonstraram que as fontes orgânicas e inorgânicas têm efeitos diferentes no desempenho animal (ZHAO et al., 2014).

Dessa forma, o zinco é considerado um nutriente essencial na alimentação de peixes e pode ser adicionado à dieta para suprir suas necessidades nutricionais (TAN e MAI, 2001). Porém, é importante ressaltar que o excesso de zinco na dieta pode ser tóxico para os peixes e deve ser evitado (CHUPANI et al., 2018; LUO et al., 2011).

É importante considerar que as exigências nutricionais de diferentes espécies de peixes para o zinco variam de acordo com diversos fatores, como idade, tamanho, estágio de vida, dureza da água e presença de ingredientes antagônicos em dietas não purificadas. Os sintomas de deficiência de zinco podem incluir diminuição do crescimento, nanismo de corpo curto, catarata e outras consequências relacionadas ao estresse oxidativo, podendo levar à mortalidade (KUCUKBAY et al., 2006; BANNI et al., 2011).

Minerais como o zinco podem se acumular no osso e em outros tecidos, fornecendo uma boa indicação do status corporal do Zn (SATOH et al., 1989; LALL,

2002). A biodisponibilidade do Zn e outros cátions bivalentes para peixes depende em grande parte da presença de fatores antinutricionais na dieta, como o ácido fítico em farinhas vegetais e a hidroxiapatita em farinhas de ossos, que podem formar complexos insolúveis com minerais, como o Zn (WATANABE et al., 1997).

Esses complexos são comumente conhecidos como quelatos, ou ligações entre uma molécula e um íon metálico, e são difíceis de quebrar pelos peixes, tornando os minerais inutilizáveis (KARACHLE e STERGIOU, 2012). O mecanismo de absorção de Zn em peixes ocorre principalmente através do trato gastrointestinal, enquanto eles também são capazes de absorver Zn através das brânquias, se o Zn da dieta for limitado (LALL, 2002; BURY et al., 2003).

À medida que fontes de proteína mais complexas são incluídas em dietas semi purificadas, os níveis de suplementação de Zn podem aumentar até 240 mg/kg, de acordo com uma meta-análise sobre as necessidades minerais de peixes (PRABHU et al., 2014). O aumento da exigência ocorre porque muitas proteínas vegetais têm naturalmente níveis baixos de Zn e incluem altos níveis de ácido fítico (THOMPSON e ERDMAN Jr., 1982; GLOVER e HOGSTRAND, 2002).

O Zn orgânico é uma alternativa, pode ser produzido pela ligação do Zn a um ou mais aminoácidos (ASHMEAD, 1991; GLOVER e HOGSTRAND, 2002). Por exemplo, um estudo demonstrou que o Zn ligado a aminoácidos, como histidina e cistina, está mais disponível para peixes, pois os aminoácidos podem facilitar a liberação de Zn para transferência através do epitélio intestinal (GLOVER e HOGSTRAND, 2002).

Essa afirmação de maior disponibilidade pode ser comprovada por um aumento significativo na deposição de Zn em vários tecidos corporais (PARIPATANANONT e LOVELL, 1995). Portanto, é importante considerar não apenas a presença de fatores antinutricionais em ingredientes alternativos, mas também a forma química do Zn suplementar e sua capacidade de resistir competitivamente à ligação com outros ingredientes.

A maioria dos estudos relatou que a biodisponibilidade do zinco orgânico é maior do que a do zinco mineral (APINES et al., 2001; Rider et al., 2010). Como a disponibilidade do zinco inorgânico é baixa, a concentração adicionada é de 20 a 30 vezes maior do que a exigência dos animais para atender às suas necessidades (BRATZ et al., 2013).

Além das formas comuns de minerais inorgânicos e orgânicos, as formas nano foram recentemente consideradas como uma nova forma de minerais e têm sido utilizadas

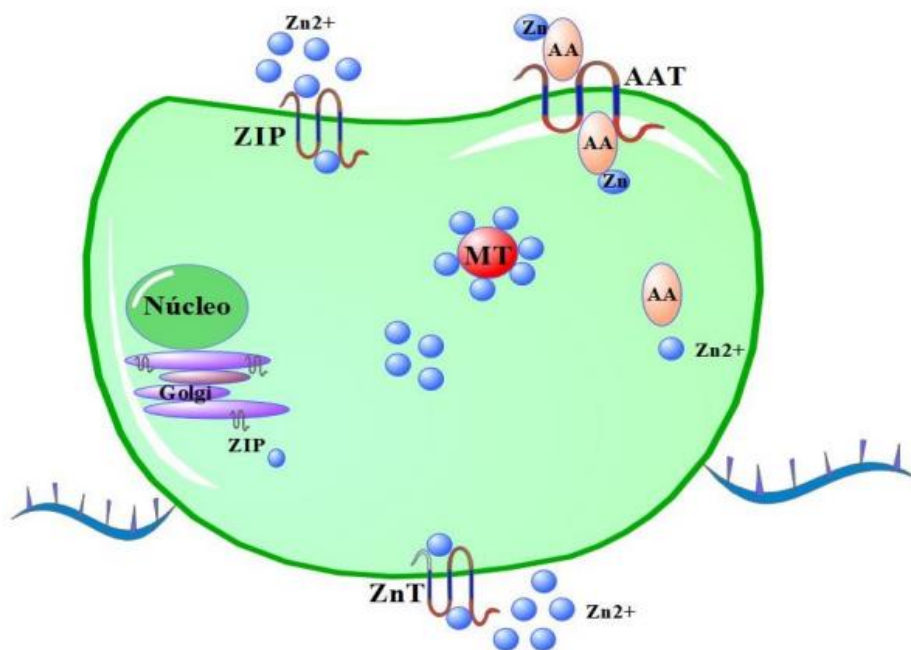
em dietas de peixes devido à alta biodisponibilidade e baixa toxicidade (DEKANI et al., 2019; KOHSHAHI et al., 2018; SHAHPAR, JOHARI, 2018). Resultados de um estudo recente confirmaram os efeitos positivos da alimentação de larvas de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* com dieta suplementada com nanopartículas de zinco na concentração de 50 mg kg⁻¹ de dieta, melhorando o desempenho de crescimento dos peixes (SHAHPAR, JOHARI, 2018).

Nanopartículas de zinco também melhoraram o desempenho de crescimento de carpas capins juvenis (*Ctenopharyngodon idella*) (FAIZ et al., 2015) e camarões gigantes de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*) (MURALISANKAR et al., 2014). Além disso, elas melhoraram a resistência ao estresse e a mineralização óssea da dourada (*Sparus aurata*) (IZQUIERDO et al., 2017) e modularam a abundância de proteínas no plasma sanguíneo e no intestino de carpas comuns (*Cyprinus carpio*) (CHUPANI et al., 2018; CHUPANI et al., 2017).

A nutrição adequada é essencial para alcançar o crescimento ideal e manter a saúde dos peixes. Nas últimas décadas, esforços têm sido feitos para compreender a relação entre nutrição e desempenho reprodutivo na aquicultura. Dentre os vários nutrientes, os minerais são ingredientes importantes na dieta dos animais aquáticos.

Na Figura 2, é apresentado o processo de absorção de zinco, que envolve a ingestão do mineral, sua liberação da matriz alimentar, a solubilização na luz intestinal, a absorção através da membrana celular e o transporte para os tecidos do corpo. A absorção eficiente de zinco é afetada por vários fatores, incluindo a forma química do mineral e a presença de outros nutrientes na dieta.

Figura 2- Processo de absorção de Zn dietético pelos enterócitos. ZIP: proteína transportadora de Zn para o interior do enterócito; AAT: transportador de aminoácidos; MT: metalotioneína; AA: aminoácido; ZnT: proteína transportadora para fora do enterócito.



Fonte: Adaptado (DA SILVA PIERRI, 2020)

A maior disponibilidade de Zn nas formas orgânicas permite aos animais uma maior capacidade de defesa do sistema imunológico inato. O processo de fagocitose, principal mecanismo de resposta do sistema imunológico inato, tem como consequência a liberação de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o íon superóxido, que são prejudiciais às células do hospedeiro. Desta forma, um sistema de proteção antioxidante celular bem desenvolvido protege as células dos danos causados pela presença das EROs e garante aos animais maior capacidade de enfrentamento (BILLER; TAKAHASHI, 2018; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ; MORALES; SANZ, 2005)

Este mineral afeta fortemente a absorção de fósforo, pois em conjunto com o cálcio forma complexos indigestíveis como o fitato. Os peixes e outros animais monogástricos não possuem atividade suficiente de fitase, enzima responsável pela hidrólise do fitato. De acordo com Lall (2002), este micromineral participa ainda na regulação de muitos processos, tais como o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios.

Sá et al. (2005) observaram uma relação positiva entre a concentração corporal de Zn e o crescimento corporal de juvenis de tilápia do Nilo, indicando que uma dieta com

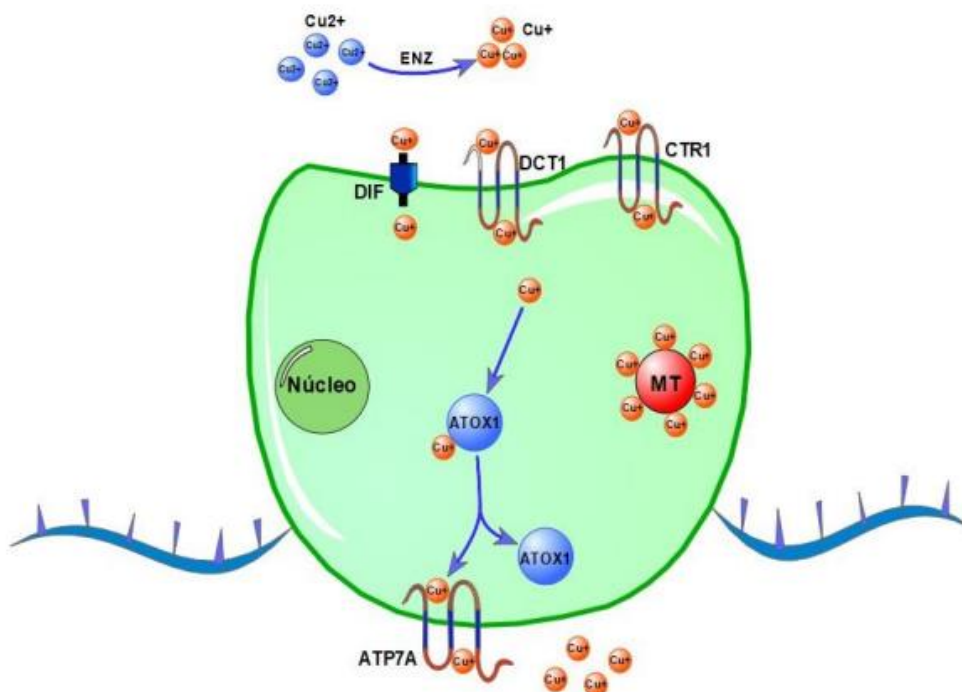
maior aporte de Zn resulta em maior taxa de crescimento. A exigência nutricional de Zn é maior na fase inicial de vida dos animais, quando sua taxa de crescimento é mais elevada. Segundo Evans e Halliwell (2001), o Zn, em conjunto com o Cu, é componente da enzima superóxido dismutase, que tem papel antioxidante no organismo, prevenindo a peroxidação dos lipídios das membranas celulares e atuando na estabilização química dos tecidos vivos. Dessa forma, o efeito antioxidante do Zn aumenta o tempo de vida útil do pescado.

Em um estudo realizado por Buentello et al. (2009), juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas deficientes em Zn apresentaram crescimento reduzido, redução do apetite, catarata, anorexia, erosão das nadadeiras, dentre outros sinais clínicos. A toxicidade de Zn causa interações antagônicas com outros elementos-traço, que competem por um mesmo sítio de ligação, podendo assim ocasionar sua deficiência (SIGNOR, 2006). Por outro lado, Evans e Halliwell (2001) concluíram que altas doses de Zn na dieta atuam como agente pró-oxidante, promovendo o aumento de radicais livres no organismo. A exigência nutricional de Zn para o crescimento de tilápia do Nilo é de 79,51 mg kg⁻¹ (FURUYA, 2010).

1.5.2 Cobre

O papel do cobre (Cu) nas atividades enzimáticas de oxidação/redução é resultado de sua capacidade de atuar como intermediário na transferência de elétrons. Dessa forma, o Cu está presente nas enzimas envolvidas na respiração celular, na defesa contra radicais livres, na função de neurotransmissão, na síntese de tecido conjuntivo e no metabolismo celular do ferro (Fe). Em algumas enzimas, o Cu é necessário como cofator, como é o caso da superóxido dismutase1 (SOD1), da citocromo-C oxidase, da ceruloplasmina e da tirosinase. Além disso, a atividade oxidase da ceruloplasmina e da SOD1 requer especificamente a presença de Cu (ROSA e MATTIOLI, 2002). Na Figura 3, é apresentado o processo de absorção de Cu.

Figura 3- Processo de absorção de Cu dietético pelos enterócitos. CTR1: transportador de Cu da membrana apical do enterócito; DCT1: transportador de íons; DIF: canal de difusão de Cu não dependente de energia; ATOX1: chaperonas de Cu carregadoras de Cu intracelular; ATP7A: ATPase transportadora de Cu da membrana basolateral do enterócito; ENZ: enzimas envolvidas na reação de redução do Cu^{2+} para Cu^+ .



Fonte: Adaptado (DA SILVA PIERRI, 2020)

As metaloenzimas desempenham funções vitais no organismo, tais como produção de energia, proteção das células contra radicais livres, participação na síntese de colágeno e produção de melanina (LALL, 2002). A enzima citocromo-C oxidase, também conhecida como Complexo IV, é o último complexo proteico da cadeia de transporte de elétrons. Esta proteína da membrana mitocondrial interna é responsável pela redução do oxigênio molecular (O_2) em água (H_2O), formando ATP e sendo um passo essencial da respiração celular. A deficiência de Cu resulta na redução da atividade da citocromo-C oxidase e na capacidade respiratória das mitocôndrias, especialmente no fígado, coração e cérebro (CARROL et al., 2004).

A ceruloplasmina (CP) é uma oxidase produzida exclusivamente no fígado e contém mais de 90% do Cu sérico total encontrado nos vertebrados. Estruturalmente, é caracterizada pela presença de seis íons de Cu fortemente ligados, três dos quais formam o centro I, que participa no processo de transferência de elétrons. Além disso, esta enzima está envolvida nas reações de fase aguda da inflamação e na remoção de radicais livres (RL), protegendo as células contra o dano oxidativo (KIM, 2008).

O metabolismo do ferro e do Cu está interligado pela atividade ferroxidase da ceruloplasmina. Dessa forma, a ceruloplasmina oxida o Fe^{2+} (íon ferroso) em Fe^{3+} (íon férrico), um processo necessário para que o ferro possa se ligar à transferrina sérica, uma glicoproteína que transporta o ferro no plasma somente quando este se encontra em seu estado férrico (Fe^{3+}). Assim, a deficiência de ceruloplasmina é acompanhada pela acumulação de ferro no fígado (SUTTLE, 2010).

Assim como nos mamíferos, o fígado (hepatopâncreas) é o principal órgão envolvido na homeostase do metabolismo do Cu em peixes (BURY; WALKER; GLOVER, 2003). O fígado é capaz de acumular grandes quantidades de Cu absorvido pela dieta ou diretamente da água, sendo o local de síntese de muitas metaloproteínas de Cu no corpo, como a ceruloplasmina. A ceruloplasmina produzida no fígado é liberada na corrente sanguínea e atua como a principal fonte de Cu para os órgãos não hepáticos. Além da ceruloplasmina, o Cu pode circular pelo corpo ligado à albumina (HARRIS, 2000).

Em teleósteos, o excesso de Cu é excretado principalmente pela bile e, em alguns casos específicos, como na espécie *Anguilla anguilla*, o Cu também é encontrado em pequenas quantidades na urina. Além disso, estudos apontam que as brânquias também podem desempenhar um papel no mecanismo de excreção de Cu, embora sua contribuição seja pequena e o mecanismo ainda não tenha sido completamente elucidado (BURY; WALKER; GLOVER, 2003).

Em relação à absorção, duas vias contribuem para o fornecimento de Cu para o metabolismo de peixes: a absorção branquial e a intestinal. No entanto, é comprovado que a contribuição intestinal é responsável por praticamente todo o Cu absorvido pelos peixes, podendo ser até 30 vezes maior do que a contribuição referente à absorção branquial. O mecanismo de absorção branquial é acionado principalmente em situações de deficiência de Cu dietético. Além de ser a principal fonte de absorção de Cu, a absorção intestinal regula a absorção de Cu branquial, enquanto o inverso não ocorre (KAMUNDE; CLAYTON; WOOD, 2002).

Por se tratar de um metal, as funções metabólicas do cobre (Cu) estão diretamente associadas à proteção celular contra possíveis danos oxidativos, uma vez que, assim como o zinco (Zn), o Cu possui a capacidade de regular a atividade da enzima Zn-Cu-SOD, que é importante para a defesa antioxidante das células e cuja regulação é espécie-específica (EYCKMANS et al., 2011). Alguns autores atribuem a redução no desempenho zootécnico a um menor consumo de níveis de Cu na dieta (SHAW; HANDY, 2006).

Em dietas deficientes de Cu, observou-se crescimento reduzido, catarata e redução na atividade de enzimas dependentes de Cu, tais como a superóxido dismutase e a citocromo oxidase (SHIAU; NING, 2003; LIN et al., 2008). Entretanto, a toxicidade desse micromineral pode causar redução no crescimento, piora na conversão alimentar, danos e necrose do fígado e rins em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (WATANABE et al., 1997). De acordo com Furuya (2010), para um bom desenvolvimento e crescimento da tilápia do Nilo, é exigida uma concentração de 4,00 mg/kg.

1.5.3 Manganês

O manganês (Mn) é um cofator de uma série de enzimas, como a superóxido dismutase e aquelas envolvidas na oxidação da glicose, metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos. Arginase, piruvato carboxilase e superóxido dismutase são metaloenzimas que contêm Mn, enquanto quinases, transferases, hidrolases e decarboxilases envolvidas no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas são enzimas que podem ser ativadas por este micromineral (LALL, 2002). Algumas enzimas são ativadas especificamente pelo Mn, como a glicosiltransferase (WATANABE et al., 1997).

O Mn atua também na gliconeogênese como ativador da piruvato carboxilase e no ciclo de Krebs como cofator da isocitrato desidrogenase. De particular importância no sistema nervoso central (SNC), o Mn atua como cofator de enzimas como a arginase (responsável pela formação da ureia), a piruvato carboxilase, a superóxido dismutase (MnSOD, que desempenha ações antioxidantes e está presente na matriz mitocondrial, formada normalmente na respiração celular e anormalmente em casos de inflamações agudas ou crônicas), e a glutamina sintetase (que está envolvida no metabolismo da amônia no cérebro), sendo presente principalmente nos astrócitos. Além disso, o Mn está envolvido na síntese e metabolismo de neurotransmissores (ERIKSON et al., 2004; GERBER; LÉONARD; HANTSON, 2002; PERES et al., 2016).

Sabe-se que dietas deficientes em Mn podem acarretar crescimento reduzido, crescimento anormal da cauda e nanismo em peixes (LOVELL, 1998; PAN et al., 2008). O excesso de Mn na dieta pode causar toxicidade em peixes, quebrar a homeostase do sódio, reduzir a absorção e metabolismo do cálcio, causar disfunção no metabolismo de carboidratos e comprometer a resposta imune (PARTRIDGE; LYMBERY, 2009).

A via entero-hepato-biliar desempenha um papel fisiológico vital na homeostase de minerais, incluindo o Mn (HAMBIDGE, 2003). Uma vez absorvido no intestino, o Mn é transportado pelo sangue para ser metabolizado no fígado e, posteriormente, armazenado no osso, ou eliminado através da bile, sendo excretado junto com as fezes (NUSSEY et al., 2000).

Uma pequena fração do Mn biliar excretado no intestino é reabsorvido, estabelecendo a circulação entero-hepática, e o restante é excretado nas fezes (SCHROEDER et al., 1966). A absorção gastrointestinal e a eliminação biliar de Mn, os dois principais reguladores da homeostase do Mn, são influenciadas pela ingestão dietética de Mn (ASCHNER e ASCHNER, 2005; BRITTON e COTZIAS, 1966).

Mecanismos adaptativos durante a alta ingestão dietética de Mn incluem a redução da absorção intestinal, aumento do metabolismo hepático e aumento da excreção biliar (ASCHNER e ASCHNER, 2005). A compreensão dos aspectos fisiológicos do metabolismo de Mn em peixes é rudimentar. Concentrações de Mn corporal e nas vértebras são indicadores de longo prazo do status de Mn em peixes (SATO et al., 1987; Yamamoto et al., 1983) e respondem com efeitos significativos após oito semanas de dieta.

O ácido fítico, a forma predominante de armazenamento de fósforo em grãos, tem alta afinidade para quelar outros íons de metais bivalentes, como Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} (NOLAN et al., 1987), reduzindo sua disponibilidade para salmonídeos (OVERTURF et al., 2003). Diferentemente das fontes minerais inorgânicas, as formas minerais orgânicas têm o potencial de evitar interações negativas com antinutrientes, como o ácido fítico (APINES-AMAR et al., 2004).

Além disso, oligoelementos quelatados com ligantes de aminoácidos podem facilitar rotas alternativas de absorção intestinal (ANTONY JESU PRABHU et al., 2018b). Manganês fornecido como 2-hidroxi-4-(metiltio) butirato (HMB) ou Mn-gly mostrou-se mais eficiente como fonte de Mn na dieta em beijupirá e pregado, quando comparado com $MnSO_4$ (NIE et al., 2016; MA et al., 2015).

Estudos em peixes indicam que a biodisponibilidade de Mn em animais aquáticos é afetada pelos diferentes sais inorgânicos, e altos níveis de cálcio e fósforo na dieta reduzem significativamente a absorção de Mn (WATANABE, KIRON, & SATO, 1997). Estudos recentes também destacam diferenças entre fontes inorgânicas e orgânicas (CAI et al., 2017; PRABHU et al., 2019).

Embora a suplementação de Mn em dietas para juvenis de tilápia do Nilo (0,64 g) em torno de 7 mg kg⁻¹ não influencie no crescimento, eficiência alimentar ou sobrevivência, ela aumenta a atividade da enzima Mn-SOD mitocondrial e a concentração de Mn no hepatopâncreas (LIN, LIN, & SHIAU, 2008). A forma da enzima é altamente conservada em diferentes linhagens e espécies. Embora a Mn-SOD tenha um papel crucial no combate às ERO's produzidas localmente na mitocôndria, há evidências da sua estreita associação com a imunidade inata.

O uso de fontes minerais orgânicas em dietas de peixes beneficia a minimização dos efeitos dos antinutrientes, melhora a biodisponibilidade, atende às exigências com níveis de suplementação mais baixos do que os exigidos com fontes inorgânicas e, por fim, reduz a carga ambiental. Nesse sentido, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos dos minerais orgânicos de Zn, Mn e Cu na forma de glicinatos sobre o desempenho produtivo, deposição tecidual, atividade de enzimas digestivas e digestibilidade em alevinos de tilápia do Nilo.

REFERÊNCIAS

- AAFCO. Official Publication of the Association of American Feed Control Officials, 2022.
- AOAC. Official Methods of Analysis. 15. ed. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists, 1990.
- AOAC. Official Methods of Analysis. 17. ed. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists, 2000.
- AOAC. Official Methods of Analysis. 18. ed. Gaithersburg, MA, USA: Association of Official Analytical Chemists, 2007.
- ANDERSEN, L. T., SØRENSEN, M., & LARSEN, J. Intestinal absorption of magnesium from mineral waters with different mineralization. *Animal Feed Science and Technology*, 1997.
- ANTONY JESU PRABHU, P., RAGUNATHAN, C., MICHAEL BABU, M., & ARULRAJ, A. Effect of organic and inorganic minerals on growth performance and mineral bioavailability in *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture Reports*, 9, 50-55, 2018.
- ANTONY JESU PRABHU, P., SCHRAMA, J. W., & KAUSHIK, S. J. "Zinc in fish nutrition." *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, pp. 217-238, 2016.
- APINES, M., et al. "Zinc-lysine complex for broilers." *British Poultry Science* 42(2): 196-203, 2001.
- APINES-AMAR, M., JAMMAI, S., & TOULLEC, R. Biodegradation of phytic acid and bioavailability of myo-inositol phosphates in relation to improved mineral nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 116(3-4), 319-339, 2004.
- ASCHNER, M., & ASCHNER, J.L. Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-brain barrier transport. *NeuroScience*, 10(9), 629-637, 2005.
- BERTECHINI, A. G. *Quelatos de Microminerais: Tecnologia e Aplicações na Nutrição Animal*. Roca, 2014.
- BILLER, D., & TAKAHASHI, H. K. (2018). Immunometabolism in the Innate Immune System: The Role of Zinc. *Journal of Immunology Research*, p 1-8, 2018.
- BOYD, C. E.; TUCKER, C. S. *Pond Aquaculture Water Quality Management*. Springer, 2014.
- BRITTON, R.S., & COTZIAS, G.C. The binding of Fe, Cu and Mn to plasma albumin and transferrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 241(16), 4144-4150, 1966.

BUENTELLO, A., GATLIN, D. M., NEILL, W. H., & LIMSUWAN, C. Dietary zinc requirement of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 294(3-4), 254-259, 2009.

BUENTELLO, J. A., GATLIN III, D. M., NEILL, W. H., & WEBSTER, C. D. Evaluation of zinc proteinate and zinc sulfate as water additives in striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Animal Feed Science and Technology*, 2009.

BURY, N. R., et al. "Transport of calcium and magnesium in gill epithelia of freshwater tilapia: mechanisms and regulatory aspects." *Journal of Experimental Biology* 206(20): 3717-3730, 2003.

BURY, N. R., WALKER, P. A., & GLOVER, C. N. Nutritional regulation of copper metabolism in fish: A review. *Aquaculture*, 227(1-4), 1-21, 2003.

CAI, W., HU, W., LIU, G., BAI, Y., HUANG, H., GE, X., & LIU, Y. Comparison of inorganic and organic manganese sources on growth performance, mineral deposition and antioxidant status in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*, 23(4), 825-833, 2017.

CARROL, R. C., BRICKER, B. A., OTTERBEIN, L. E., & WARHEIT, D. B. Copper. In L. J. Marnett & P. N. Raghavan (Eds.), *Metals and oxidative damage in neurological disorders* (pp. 193-213). John Wiley & Sons, 2004.

CHEN, H., FENG, L., JIANG, W., JIANG, J., WU, P., ZHAO, X., & KUANG, S. Effect of organic mineral supplementation on growth, digestive enzymes, and mineral absorption in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Animal Feed Science and Technology*, 2020.

Chupani, L., et al. "Dietary zinc supplementation improves the growth performance, tissue mineral concentrations, and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*) fed plant-based diet." *Biological Trace Element Research* 183(1): 42-51, 2008.

CLAY, J. M. *World Agriculture and the Environment: A Commodity-by-Commodity Guide to Impacts and Practices*. Island Press, 2008.

DOMÍNGUEZ, D., VEGA, M., & CUARÓN, I. Organic minerals in fish diets: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 2019.

EVANS, M. D., & HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *British Journal of Nutrition*, 85(S2), S67-S74, 2001.

EYCKMANS, M., DE BOECK, G., BLUST, R., & DE SCHAMPHELAERE, K. A. Species-specific copper sensitivity of fish early life stages: An interspecies comparison. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(4), 1035-1043, 2011.

FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020.

FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022.

FURUYA, W.M. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. Toledo: GFM, 100p. 2010.

FURUYA, W. M. et al. Tilapia Nutrition in Intensive Farming Systems. In: HARGREAVES, J. A. (Ed.). Nutrition and Feeding of Fish. Springer, pp. 371-401, 2013.

GICHANA, Z. M. et al. Effects of Dietary Supplementation of Organic Acid Salts on Growth, Feed Utilization, and Ammonia Nitrogen Excretion in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Cultured in Earthen Ponds. Journal of Applied Aquaculture, vol. 30, no. 2, pp. 155-166, 2018.

HAMBIDGE, K.M. The enterohepatic circulation of manganese. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 17(5), 309-314, 2003.

HARRIS, E. D. Cellular copper transport and metabolism. Annual Review of Nutrition, 20(1), 291-310, 2000.

HU, B. ET AL. Tilapia Culture in China: Status, Trends, and Challenges. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, vol. 28, n. 3, pp. 369-380, 2020.

IZQUIERDO, M., MONTERO, D., TORT, L., ROBAINA, L., VERGARA, J., & TORSTENSEN, B. E. Dietary lipid sources for sea bream and sea bass: Growth performance, tissue composition and flesh quality. Animal Feed Science and Technology, 2017.

KAMUNDE, C. N., CLAYTON, P. M., & WOOD, C. M. Copper accumulation and turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic sublethal copper exposure: time course and biological monitoring implications. Environmental Toxicology and Chemistry, 21(5), 1029-1036, 2002.

KARACHLE, P. K., & STERGIIOU, K. I. "Effect of chelation on the absorption of some trace elements in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Journal of Applied Ichthyology 28(4): 603-610, 2012.

KATYA, K., KOLKOVSKI, S., & VIELMA, J. Effects of dietary organic minerals on growth performance, mineral digestibility, and liver mineral concentration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Animal Feed Science and Technology, 2017.

KIEFER, C. Chemical Structures of Chelates and Polysaccharide Complexes. In: WALLACE, H. D.; WEISS, D. J. (Eds.). Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Wiley-Blackwell, pp. 1059-1074, 2005.

KIM, B. E. The role of ceruloplasmin in iron metabolism. In M. Tsuji, M. Gitlin, E. R. Harris, & S. Ghosh (Eds.), Molecular aspects of medicine (Vol. 29, pp. 61-87). Elsevier, 2008.

KUCUKBAY, F. Z., et al. "Effects of different levels and sources of zinc on performance and immune responses of broilers under heat stress." British Poultry Science 47(1): 136-142, 2006.

LALL, S.P. The minerals. In: Lall, S.P. (Ed.), The mineral nutrition of farmed fish. CABI Publishing, pp. 1-29, 2002.

LIANG, Q., XU, L., MAI, K., ZHONG, Y., & TAN, B. Effect of dietary organic and inorganic mineral supplementation on growth, feed utilization, body composition and tissue mineral contents of juvenile common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Animal Feed Science and Technology*, 2020.

LIN, H. Y., SHIAU, S. Y., & LIN, Y. H. The dietary copper requirement of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 278(1-4), 108-114, 2008.

LIN, H., ET AL. "Effects of dietary zinc sources and levels on growth performance, tissue zinc accumulation and zinc transporter mRNA expression in juvenile *Chinese mitten crab*, *Eriocheir sinensis*." *Aquaculture Nutrition* 19(3): 422-431, 2013.

LIN, H.Y., LIN, Y.H., & SHIAU, S.Y. Manganese requirement of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 283(1-4), 132-138, 2008.

LOVELL, T. *Nutrition and feeding of fish*. Kluwer Academic Publishers, 1998.

LUO, Z., et al. "Effect of dietary zinc supplementation on growth performance, tissue mineral content, and serum enzymes activities of common carp (*Cyprinus carpio*) fed plant protein-based diet." *Aquaculture International* 19(5): 885-897, 2011.

MA, L.H., FENG, L., JIANG, W.D., LIU, Y., WU, P., JIANG, J., & KUANG, S.Y.. Effects of dietary manganese on the growth, antioxidant capacity, immune responses and expression of heat shock proteins of juvenile *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture Nutrition*, 21(6), 846-857, 2015.

MAAGE, A., ET AL. "Bioavailability of different zinc compounds and zinc availability to the young growing pig." *Animal Feed Science and Technology* 93(1): 1-11, 2001.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M., MORALES, A. E., & SANZ, A.. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(1-2), 75-88, 2005.

MIDLEN, A.; REDDING, T. E. Role of Fish Nutrition in Reducing Environmental Impacts of Aquaculture. In: CULVER, D. A.; CASTAGNETTI, G. (Eds.). *Recirculating Aquaculture*. Elsevier, pp. 127-154, 1998.

MURALISANKAR, T., et al. "Zinc in fish nutrition and its possible roles in skeletal development and bone metabolism." *Journal of the World Aquaculture Society* 46(2): 178-193, 2015.

NGUYEN, D. V., WANG, T., & CHOI, J. Effects of dietary supplementation of copper-glycine complex on growth performance, body composition, and tissue mineral concentrations in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Animal Feed Science and Technology*, 2019.

NIE, G.X., LI, F.X., WANG, J.F., XIE, C.X., XU, P., & LIU, W.B. Effects of dietary organic manganese on growth, antioxidant status, endocrine hormones and immune responses of juvenile spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*). *Aquaculture Nutrition*, 22(2), 347-357, 2016.

NOLAN, J.V., LENG, R.A., & DOBOS, R.C. Interactions of trace elements with one another and with other nutrients in ruminant nutrition. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress*, 17-55, 1987.

NRC. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Academies Press, 2011.

PAN, X.L., YAO, H.Y., & LIU, C.X. Dietary manganese requirement of juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture Nutrition*, 14(5), 445-451, 2008.

PARTRIDGE, G.J., & LYMBERY, A.J. Dietary manganese requirement of juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). *Aquaculture Research*, 40(9), 1059-1069, 2009.

PEZZATO, L. E. et al. Minerals for Fish Nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 117, n. 3-4, pp. 207-228, 2004.

POHLENZ, C.; GATLIN, D. M. Effects of Diet Nutrient Density on Growth and Feed Efficiency of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Cultured in Clear Water vs. Green Water Systems. *Aquaculture*, vol. 420-421, pp. 190-196, 2014.

PRABHU, A.J., SWARNALATHA, Y., SAHU, N.P., & PAL, A.K. Efficacy of different sources of manganese in juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Growth performance, hematological, biochemical, and histopathological responses. *Aquaculture International*, 27(2), 481-495, 2019.

PRABHU, P. A.; SCHRAMA, J. W.; KAUSHIK, S. J. Micronutrient Requirements of Fish. In: D'ABRAMO, L. R. et al. (Eds.). *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*. CABI Publishing, pp. 140-173, 2016.

ROSA, R. M., & MATTIOLI, G. Copper as a cofactor and regulator of copper-requiring proteins. *Metal Ions in Biological Systems*, 39, 231-255, 2002.

RUTZ, F.; MURPHY, T. The Production and Use of Organic Minerals in Animal Nutrition. In: D'ABRAMO, L. R. et al. (Eds.). *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*. CABI Publishing, pp. 268-292, 2016.

SÁ, M. V. C., FRACALOSSO, D. M., BARROS, M. M., URBINATI, E. C., & FREITAS, R. T. F. Níveis de zinco para alevinos de tilápia-do-nilo. *Ciência Rural*, 35(6), 1351-1357, 2005.

SATOH, H., TANI, Y., MITSUI, Y., TAMURA, T., & NISHIDA, K. Species differences in gastrointestinal absorption of inorganic mercury salts. *Animal Feed Science and Technology*, 2001.

SATOH, S., ET AL. "Mineral accumulation in fish in relation to dietary mineral levels." *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 55(6): 979-986, 1989.

SATOH, S., WATANABE, T., & KIRON, V. Effects of dietary manganese levels on growth, whole-body manganese accumulation and bone mineralization in rainbow trout. *Fisheries Science*, 53(6), 1063-1068, 1987.

Shahpar, M., & Johari, S. A. "ZINC NANOPARTICLES ENHANCE GROWTH PERFORMANCE, antioxidant status, and mineral deposition in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Aquaculture Research* 49(9): 3012-3020, 2018.

SHAW, B. J., & HANDY, R. D. Dietary copper exposure and recovery in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquatic Toxicology*, 76(1), 62-72, 2006.

SHIAU, S. Y., & NING, L. J. Dietary copper requirement of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture*, 225(1-4), 61-70, 2003.

SIGNOR, A. A.. Alimentação de Peixes. Editora UFPR, 2006.

SILVA, T. S., BALDISSEROTTO, B., & GARZON, D. L. Dietary organic and inorganic mineral supplementation in fish nutrition: effects on growth, immunity, and oxidative stress. *Animal Feed Science and Technology*, 2019.

SONODA, K.; FRANÇA, T. M.; CYRINO, J. E. P. Nutritional Studies on Macronutrients in Tilapia Diets. In: D'ABRAMO, L. R. et al. (Eds.). *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*. CABI Publishing, pp. 117-139, 2016.

STEFANIDOU, M., et al. "Zinc: a multipurpose trace element." *Archives of Toxicology* 80(1): 1-9, 2006.

SUTTLE, N. F. Copper metabolism and requirements in fish. *Journal of Nutrition*, 140(5), 771S-775S, 2010.

SWAIN, P., ET AL. "Zinc: An essential micronutrient for animal growth, immunity, and metabolism." *Journal of Animal Science* 94(7): 2970-2979, 2016.

TAN, B. P., & MAI, K. S. "Feed attractability and feed intake in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) fed diets containing fish meal, soybean meal and cottonseed meal." *Aquaculture* 193(3-4): 257-267, 2001.

TIAN, J. et al. Sustainable Development of Tilapia Aquaculture in China: A Review. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, vol. 27, no. 3, pp. 315-327, 2019.

TOSCANO, L. et al. Lipase production through solid-state fermentation using agro-industrial residues as substrates and newly isolated fungal strains. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, v. 27, n. 5, p. 4074-4077, 2013.

TURCIOS, A. E.; PAPENBROCK, J. Marine Red and Green Macroalgae: A Source of Food and Feed for Reducing Fishmeal and Fish Oil Requirements in Aquaculture Feeds. *Reviews in Aquaculture*, vol. 6, no. 2, pp. 131-144, 2014.

WANG, Y., & WANG, Y. "Effects of dietary zinc levels and sources on growth performance, carcass traits, serum parameters and antioxidant enzyme activity in broilers." *Biological Trace Element Research* 167(2): 165-171, 2015.

WATANABE, T., ET AL. "Dietary zinc deficiency observed in fish fed a plant-based diet." *Fisheries Science* 63(5): 793-799, 1997.

WATANABE, T., KIRON, V., & SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, 151(1-4), 185-207, 1997.

WEBSTER, C. D.; LIM, C. Nutrient Requirements and Dietary Nutrient Availability for Fish. In: D'ABRAMO, L. R. et al. (Eds.). *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*. CABI Publishing, pp. 28-80, 2016.

YAMAMOTO, T., KIRON, V., & WATANABE, T. Bone manganese content in rainbow trout and the dietary manganese requirement. *Fisheries Science*, 49(6), 961-967, 1983.

ZHAO, X. H., ET AL. "Comparative study of organic and inorganic zinc sources on growth performance, tissue zinc accumulation and zinc bioavailability in growing grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)."
Aquaculture Nutrition 20(5): 524-531, 2014.

ZOLDERDO, A. J. et al. The Stress Response in Fish: From Mechanism to Physiology, Genomics, and Proteomics. *Annual Review of Physiology*, vol. 78, pp. 105-136, 2016

CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo redigido conforme normas da revista *Animal Feed Science and Technology*

ARTIGO CIENTÍFICO¹

Glicinatos de zinco, manganês e cobre sobre o desempenho, retenção de minerais, digestibilidade, morfologia intestinal e excreção de minerais em juvenis de tilápias do Nilo

ABSTRACT

This study aimed to investigate the effect of substituting inorganic microminerals (IM) with organic microminerals (OM) on the productive performance, body composition, intestinal histology, digestive enzyme activity, and digestibility in juvenile Nile tilapia. The fish (n= 432; 2.5 ± 0.5 g; mean ± SD) were randomly divided into four groups with four replicates in each group (27 fish/replicate) and fed the respective experimental diets for eight weeks. The experimental treatments were: TIM: Control, commercially recommended levels of inorganic microminerals (Zn, Mg, and Cu) in the form of sulfates; TOM100: organic trace minerals to meet 100% of the TIM diet requirement (Zn, Mn, and Cu); TOM75: organic trace minerals to meet 75% of the TIM diet requirement (Zn, Mn, and Cu) and TOM50: organic trace minerals to meet 50% of the TIM diet requirement (Zn, Mn, and Cu). The inclusion of organic matter (OM) improved the retention of body minerals such as calcium and zinc by 9.2% and 33.3%, respectively, and increased the activity of digestive enzymes, including amylase, protease, and lipase, by 40%, 26.1%, and 36%, respectively. Furthermore, fish fed with the diet containing OM showed a higher coefficient of digestibility for gross energy and crude protein by 8.2% and 2.2%, respectively, compared to those receiving only inorganic microminerals. There was a reduction of 28.1% in zinc excretion, 15.6% in manganese, and 26.3% in copper in the aquatic environment, contributing to the improvement of water quality parameters and reducing the environmental impact of the activity. It is concluded that the use of OM in Nile tilapia diets can be a beneficial strategy to improve nutrition while reducing the environmental impacts of aquaculture.

Keywords: Digestibility, digestive enzymes, organic minerals, performance, mineral balance, *Oreochromis niloticus*.

¹ O artigo redigido seguindo normas da revista Animal Feed Science and Technology

RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar o efeito da substituição de microminerais inorgânicos (MI) por microminerais orgânicos (MO) sobre o desempenho produtivo, composição corporal, histologia intestinal, atividade de enzimas digestivas e digestibilidade em juvenis de tilápia do Nilo. Os peixes ($n = 432$; $2,5 \pm 0,5$ g; média \pm DP) foram aleatoriamente divididos em quatro grupos com quatro repetições em cada grupo (27 peixes/repetição) e alimentados com as respectivas dietas experimentais por oito semanas. Os tratamentos experimentais foram MTI: Controle, níveis comercialmente recomendados de microminerais inorgânicos (Zn, Mg e Cu) na forma de sulfatos; MTO100: microminerais traços orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI (Zn, Mn e Cu); MTO75: microminerais traços orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI (Zn, Mn e Cu) e MTO50: microminerais traços orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI (Zn, Mn e Cu). A inclusão de MO melhorou a retenção de minerais corporais, como cálcio e zinco em 9,2 % e 33,3 %, e aumentou a atividade das enzimas digestivas, incluindo amilase, protease e lipase em 40 %, 26,1 % e 36 % respectivamente. Além disso, os peixes alimentados com a dieta que continha MO apresentaram maior coeficiente de digestibilidade da energia bruta e proteína bruta em 8,2 % e 2,2 %, respectivamente, em comparação com aqueles que receberam apenas microminerais inorgânicos. Houve uma redução de 28,1 % da excreção de zinco, 15,6 % de manganês e 26,3 % de cobre no meio aquático, o que contribuiu para a melhoria dos parâmetros de qualidade da água e redução do impacto ambiental da atividade. Conclui-se que a utilização de MO em dietas para tilápia do Nilo pode ser uma estratégia benéfica para melhorar a nutrição, além de reduzir os impactos ambientais da aquicultura.

Palavras-chave: Digestibilidade, enzimas digestivas, minerais orgânicos, desempenho, balanço minerais, *Oreochromis niloticus*.

1. Introdução

Um dos principais desafios para o desenvolvimento futuro da aquicultura é aumentar a capacidade de produção da indústria aquícola, minimizando os impactos ambientais. Com o crescimento contínuo da aquicultura sustentável, exigiu-se uma mudança do uso de proteínas e óleos marinhos para o uso de ingredientes vegetais nas dietas para aquicultura (NAYLOR et al., 2021).

Os alimentos vegetais são geralmente conhecidos como fontes limitadas de certos minerais e muitas vezes contêm fatores que reduzem a biodisponibilidade mineral. A suplementação dietética de minerais é comumente recomendada para garantir o crescimento ideal e a saúde das espécies criadas (NGUYEN, LAY et al., 2019).

Embora os peixes e animais aquáticos sejam eficientes na utilização da alimentação, parte dos nutrientes, entre eles os minerais, em sua alimentação ainda são liberados na água, em ambas as formas dissolvidas e como excreções sólidas, poluindo o meio ambiente (BOYD E TUCKER, 2014; CLAY, 2008). Tradicionalmente, a suplementação de microminerais em dietas aquáticas inclui misturas de sais inorgânicos.

No entanto, vários estudos indicaram que a biodisponibilidade desses sais inorgânicos é geralmente baixa, em comparação com minerais orgânicos (quelatados) (APINES-AMAR et al., 2004; ZHOU et al., 2009). Os minerais quelatados também são menos sensíveis aos efeitos inibitórios do ácido fítico, que é comum em alimentos à base de plantas (ANTONY JESU PRABHU et al., 2016). Portanto, tem-se dado considerável atenção ao uso de oligoelementos dietéticos quelatados a micromoléculas, como aminoácidos (complexos metal-aminoácidos), como fontes minerais em dietas para peixes (ANTONY JESU PRABHU et al., 2016; PIERRI et al., 2021a, PIERRI et al., 2021b).

As dietas comerciais de tilápia dependem principalmente de fontes de proteína vegetal, especialmente farelos de oleaginosas (EL-SAYED, 2020). Essas fontes contêm vários antinutrientes, como o fitato, que são quelatados com oligoelementos, tornando-os indisponíveis (EL-SAYED et al., 2000; EL-SAYED, 2020).

Portanto, as dietas de tilápia são geralmente suplementadas com misturas de minerais inorgânicos em excesso (NGUYEN et al., 2019). No entanto, níveis excessivos de minerais na dieta podem levar a interações negativas com os diferentes minerais já presentes nos peixes e podem se tornar tóxicos, além de aumentar a excreção desses minerais no meio ambiente (ANTONY JESU PRABHU et al., 2016).

Esses complexos são comumente conhecidos como quelações, ou seja, ligações entre uma molécula e um íon metálico. Esses complexos são difíceis de serem quebrados pelos peixes, tornando os minerais inutilizáveis (KARACHLE E STERGIOU, 2012). Esforços intensivos são investidos na indústria da aquicultura para reduzir os poluentes liberados e minerais no meio aquático, visto que a aquicultura está em crescente expansão (GICHANA et al., 2018; TURCIOS e PAPENBROCK, 2014).

Pesquisas recentes evidenciaram que a adição de minerais orgânicos (MO) na dieta de peixes melhora o desempenho produtivo (DOMÍNGUEZ et al., 2019; KATYA et al., 2017), disponibilidade de minerais (SILVA et al., 2019) e deposição de micro minerais no tecido muscular (NGUYEN, L et al., 2019). Portanto, os MO são considerados uma alternativa promissora aos minerais inorgânicos (MI), uma vez que são absorvidos de forma eficiente e, conseqüentemente, retidos no tecido para melhorar o desempenho produtivo dos peixes (CHEN; YAMAMOTO; GATLIN, 2020).

Estudos recentes evidenciaram o aumento da biodisponibilidade de MO em comparação com MI em douradas, *Sparus aurata* (IZQUIERDO et al., 2017), carpas comuns, *Cyprinus carpio* var. Jian (LIANG et al., 2020), e striped bass, *Morone chrysops*

× *Morone saxatilis*, (BUENTELLO; GOFF; GATLIN, 2009). No entanto, poucos são os estudos de MO na forma de glicinatos sobre o desempenho produtivo e digestibilidade em peixes, especialmente na tilápia. Essa afirmação constitui um avanço para otimizar a eficiência alimentar em dietas ambientalmente corretas. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos dos MO (Zn, Mn e Cu) na forma de glicinatos sobre o desempenho produtivo, deposição tecidual, atividade de enzimas digestivas e digestibilidade em alevinos de tilápias do Nilo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Comitê de ética e Local de realização do experimento

O presente projeto de pesquisa foi submetido previamente ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa - CEUA/UEPG (Protocolo CEUA 24302-4). O experimento foi conduzido no laboratório de Aquicultura e Fauna Silvestre da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná. As dietas foram formuladas de acordo com as recomendações de FURUYA (2010), garantindo o atendimento às exigências mínimas de proteína (26,8%) e energia digestíveis (3075 kcal kg⁻¹) para a espécie em estudo.

2.2 Dietas e alimentação dos peixes

Foi elaborada uma dieta basal exclusivamente vegetal, suplementada com microminerais orgânicos, contendo 367 g/kg de proteína bruta e 15,20 MJ/kg de energia digestível (Tabela 1).

Tabela 1- Composição de ingredientes das dietas experimentais (g/kg)

	Dieta ¹			
	MTI	MTO100	MTO75	MTO50
Milho	150,443	150,443	150,443	150,443
Farelo de arroz	80	80	80	80
Farelo de soja	400	400	400	400
Proteína concentrada de soja	80	80	80	80
Farinha de glúten de milho	50	50	50	50
Farelo de trigo	150	150	150	150
Óleo de soja	30	30	30	30
DL-metionina	2,5	2,5	2,5	2,5
L-lisina	3,5	3,5	3,5	3,5
L-histidina	1	1	1	1
L-treonina	1	1	1	1
L-triptofano	0,5	0,5	0,5	0,5
Calcário	8	8	8	8
Fosfato bicálcico	28	28	28	28
Mix de minerais e vitaminas ²	5	5	5	5
Antioxidante ³	0,2	0,2	0,2	0,2
Antifúngico ⁴	1	1	1	1
Sulfato de zinco	0,322	-	-	-
Sulfato de manganês	0,020	-	-	-
Sulfato de cobre	0,015	-	-	-
Glicinato de zinco	-	0,273	0,205	0,137
Glicinato de manganês	-	0,030	0,023	0,015
Glicinato de cobre	-	0,016	0,012	0,008
Sal	3,5	3,5	3,5	3,5
Inerte (sílica)	-	0,038	0,122	0,196
Cr ₂ O ₃	5	5	5	5
Composição calculada (g/kg, matéria seca) ⁵				
Amido	289,28	289,28	289,28	289,28
Energia digestível, MJ/kg ⁵	15,20	15,20	15,20	15,20
Proteína bruta	367,00	367,00	367,00	367,00

Fibra bruta	46,69	46,69	46,69	46,69
Lípidios totais	54,74	54,74	54,74	54,74
Cálcio	11,27	11,27	11,27	11,27
Fósforo disponível ⁵	7,48	7,48	7,48	7,48
Zinco, mg/kg	130,51	130,51	109,10	90,99
Manganês, mg/kg	50,90	50,90	49,02	47,13
Cobre, mg/kg	16,87	16,87	16,18	15,10

¹MTI, microminerais traços inorgânicos; MTO100, microminerais traços orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI; MTO75, microminerais traços orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI; MTO50, microminerais traços orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI.

² Vitamina A (acetato de retinila), 6.000 UI; vitamina D₃, (colecalfiferol), 1.000 UI; vitamina E (DL- α -tocoferil acetato), 60 mg; vitamina K₃ (bissulfato de menadiona Na), 12 mg; vitamina B₁ (tiamina HCl), 24 mg; vitamina B₂ (riboflavina), 24 mg; vitamina B₆ (piridoxina HCl), 20 mg; vitamina B₁₂ (cianocobalamina), 0,05 mg; ácido fólico, 6 mg; Pantotenato de D-cálcio, 60 mg; ácido ascórbico (ascorbil polifosfato), 240 mg; d-biotina, 0,24 mg; cloreto de colina, 325 mg; niacina, 120 mg; sulfato ferroso (FeSO₄.H₂O.7H₂O), 30 mg; iodeto de potássio (KI), 0,4 mg, sulfato de cobalto (CoSO₄.4H₂O), 0,25 mg; selenito de sódio (Na₂SeO₃), = 0,1 mg.

³ Butilhidroxitolueno.

⁴ Propionato de cálcio.

⁵ De acordo com Furuya et al. (2001b), Pezzato et al. (2002) e Guimarães et al. (2008a, b).

A dieta controle foi formulada com base na composição dos alimentos, a qual foi previamente analisada e confirmada por análises laboratoriais após os processos de extrusão e secagem. A dieta foi elaborada para atender às exigências dietéticas da tilápia do Nilo, contendo 79,5 mg/kg de zinco (Zn) (CARMO E SÁ et al., 2004), 7 mg/kg de manganês (Mn) (LIN; LIN; SHIAU, 2008) e 4 mg/kg de cobre (Cu) (SHIAU; NING, 2016), aplicadas comercialmente para essa espécie.

As dietas experimentais foram designadas como MTI: Controle, contendo níveis comercialmente recomendados de microminerais inorgânicos (Zn, Mg e Cu) na forma de

sulfatos; MTO100: contendo microminerais orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI (Zn, Mn e Cu); MTO75: contendo microminerais orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI (Zn, Mn e Cu) e MTO50: contendo microminerais orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI (Zn, Mn e Cu), conforme Tabela 2.

Tabela 2- Fontes, níveis de inclusão e composição analisada dos minerais das dietas experimentais (mg/kg, matéria seca).

Fonte	Dieta ¹			
	MTI	MTO100	MTO75	MTO50
Mineral inorgânico				
Zn-sulfato	79,50			
Mn-sulfato	7,00			
Cu-sulfato	4,00			
Mineral orgânico				
Zn-glicinato		79,50	59,63	29,82
Mn- glicinato		7,00	5,25	3,50
Cu- glicinato		4,00	3,00	2,00
Composição analisada				
Zn	132,51	130,46	109,17	90,98
Mn	50,91	51,94	49,06	47,28
Cu	16,81	16,87	16,14	15,22

Abreviaturas: Zn, zinco; Mn, manganês; Cu, cobre.

¹MTI, microminerais traços inorgânicos; MTO100, microminerais traços orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI; MTO75, microminerais traços orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI; MTO50, microminerais traços orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI.

Após a pesagem e homogeneização dos ingredientes, as dietas foram preparadas e extrusadas em um extrusor de rosca simples (Modelo E-62, Ferraz máquinas e engenharia LTDA, Ribeiro Preto, SP, Brasil) acoplado a um tambor secador,

com secador rotativo a 55°C (temperatura de pelletização) por 10 minutos, para produção de pellets de 2 mm de diâmetro. O processo de extrusão e secagem foi realizado na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - Apta (São José do Rio Preto, SP, Brasil).

2.3 Peixes e manejo

Foram adquiridos 1500 alevinos da tilápia do Nilo (variedade GIFT), com peso inicial médio de 0,5 g, da empresa Aquabel, localizada em Rolândia, Paraná, Brasil. Os alevinos foram distribuídos em três caixas plásticas circulares, com capacidade de 150 litros cada, e mantidos sob aeração constante (6,0 e 6,5 mg/L) e sistema de filtragem para garantir a qualidade da água. Os peixes foram aclimatados às condições experimentais e alimentados com dieta comercial microextrusada durante 40 dias, até atingirem o peso ideal para o início do experimento (0,4 mm de diâmetro e 32% de proteína bruta), o qual durou quatro semanas.

Foram utilizados 432 peixes da espécie, com peso inicial médio de 2,5 g, distribuídos em 16 aquários experimentais. Os peixes foram alimentados manualmente até saciedade aparente, oito vezes ao dia, durante 8 semanas. Foi utilizado sistema RAS (Recirculating Aquaculture System) com baixa renovação de água, no qual um filtro biológico foi usado para armazenar as bactérias responsáveis pela decomposição do material orgânico.

A filtragem física, por sua vez, contou com espumas de diversas gramaturas para remover 100% das partículas da água, enquanto um filtro UV foi empregado para descontaminar bactérias e outros contaminantes. Cada aquário utilizado tinha capacidade de 90 litros, e foram distribuídos 27 peixes por aquário. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e quatro repetições.

Os parâmetros de qualidade água foram monitorados e mantidos com temperatura entre 26 e 28°C, o pH foi mantido entre 6,5 e 7,5 utilizando ácido fosfórico (1%). A oxigenação dos aquários de coleta e digestibilidade foi realizada por meio de sistema com pedras micro porosas unidas a mangueiras de silicone, utilizando ar gerado por meio de compressor de ar radial de 0,5 CV (JKW002, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) mantendo o teor de oxigênio dissolvido entre 6,0 e 6,5 mg/L. O oxigênio dissolvido (mg/L) e temperatura (°C) foram monitorados diariamente com uma sonda multi-parâmetro (YSI® 550A, Florianópolis, SC, Brasil) e semanalmente foi determinado o pH com pHmetro de bancada (TEC-2, Tecnal®, Piracicaba, SP, Brasil). A amônia tóxica, nitrito e nitrato foram analisados com kit (Alfakit®, Florianópolis, SC, Brasil). Os valores foram mantidos em 0,01 mg/L; $0,02 \pm 0,01$ mg/L; $0,06 \pm 0,02$ mg/L; $0,02 \pm 0,01$ e $6,94 \pm 0,79$ para amônia, nitrato, nitrito e pH respectivamente, mantendo os limites de conforto para tilápias segundo Boyd e Lichtkoppler (1979).

2.4 Coleta de amostras

No início do experimento, foram amostrados aleatoriamente 90 peixes para a determinação da composição corporal proximal inicial. Ao final do período de alimentação, os peixes foram submetidos a um jejum de 24 horas, anestesiados com MS-222 (150 mg/L de água), contados e pesados para calcular o ganho de peso e a conversão alimentar. Posteriormente, sete peixes foram selecionados aleatoriamente e eutanasiados com MS-222 (800 mg/L) para análise da composição centesimal corporal. Em seguida, as amostras de peixe foram imediatamente moídas em um moedor de carne, secas em uma estufa ventilada a 55°C (modelo Tecnal, TE-394/1-MP, Piracicaba, SP, Brasil) durante 24 horas e armazenadas a -20°C até análise laboratorial.

Em seguida, três peixes de cada unidade experimental foram selecionados aleatoriamente e anestesiados para análise dos parâmetros sanguíneos. Foram coletadas alíquotas de 2 mL de sangue de uma veia caudal utilizando uma seringa de 1 mL heparinizada e agulha (0,45 x 13 mm) para análises bioquímicas. As amostras de sangue foram centrifugadas a $5000 \times g$ por 10 min a 4°C , e o plasma foi pipetado e armazenado a -80°C até a análise (SABZI; MOHAMMADIAZARM; SALATI, 2017).

Os mesmos peixes foram utilizados para determinar o índice hepatossomático, a quantidade de gordura visceral e a atividade das enzimas digestivas. Após a remoção do fígado e da gordura visceral em um banho de gelo, o intestino foi cortado longitudinalmente, lavado com solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,0) para remover o conteúdo intestinal remanescente e foi colocado em tubos Eppendorf. Em seguida, os tubos foram imersos em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até a análise das atividades das enzimas digestivas.

Para a realização das análises histológicas intestinais ao final do ensaio experimental, os peixes foram coletados aleatoriamente de cada aquário e imediatamente eutanasiados com tricafina metanosulfato (MS-222) na concentração de 800 mg/L. Foi coletada uma amostra do intestino médio de três peixes de cada aquário (totalizando 12 peixes por tratamento), após 20 cm da parte pilórica do estômago. As amostras foram fixadas em solução de formaldeído a 10% durante 8 horas, desidratadas em uma série ascendente de álcool, diafanizadas em xilol e embutidas em blocos de parafina, seguindo o protocolo de PROPHET et al. (1992), para obtenção de cortes histológicos transversais com $5,0 \mu\text{m}$ de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE), conforme o método descrito por DIMITROGLOU et al. (2010).

Para a análise de minerais nas vértebras, foram utilizados oito peixes de cada unidade experimental. Os peixes foram submetidos à cocção em forno de micro-ondas por

3 minutos e lavados com água deionizada para remoção do tecido residual. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa a 105°C por 24 horas e armazenadas com suas respectivas identificações para análises posteriores. Em seguida, foram desengorduradas, permanecendo durante 24 horas em solução éter de petróleo a temperatura ambiente. Após isso, foram desidratadas ao ar durante 12 horas, secas em estufa a 105°C por duas horas, moídas em moinho de bola e armazenadas em freezer a -20°C até as análises laboratoriais.

A coleta de fezes para o ensaio de digestibilidade foi realizada a partir de amostras coletadas no terço final (21 dias) do ensaio de crescimento. As fezes foram coletadas nos aquários utilizados para o experimento após a última alimentação, e após um período de 2 h da sifonagem, as amostras de fezes foram coletadas com o auxílio de mangueiras de silicone, peneira e balde. Em seguida, foram imediatamente centrifugadas a 3.000 x g por 15 min, agrupadas por aquário e armazenadas a -20 °C até a análise. As amostras de fezes coletadas foram secas em estufas de ventilação forçada de ar (HexisHX00, Jundiaí, SP, Brasil) a 55°C por 48 horas, moídas em moinho de bolas e armazenadas a -20°C.

2.5 Desempenho produtivo e retenção de nutrientes

Foi determinado o desempenho produtivo e a retenção de nutrientes:

-Peso inicial (P1) = peso no início do experimento;

-Peso final (PF) = peso no final do experimento;

- Ganho de peso (GP) = peso final - peso inicial;

- Consumo diário de ração % (CON) = consumo em % do PV/dia;

-Eficiência alimentar % = ganho de peso/consumo de alimento x 100;

-Eficiência de retenção de energia (%) = [retenção de energia corporal (MJ)/ingestão de energia (MJ)] × 100;

-Eficiência de retenção de proteína (%) = [retenção de proteína corporal (g)/ingestão de proteína (g)] × 100;

-Índice viscerossomático (%) = [100 × (peso das vísceras (g)/peso corporal total (g))];

-Índice hepatossomático (%) = [100 × (peso do fígado (g)/peso corporal total (g))];

- Índice de gordura visceral (%) = [100 × (peso da gordura visceral (g)/peso corporal total (g))];

- Sobrevivência (S)= 100 x (N° inicial de peixes – N° final de peixes)/N° inicial de peixes;

2.6 Determinação da digestibilidade

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) foram determinados pelo método indireto, utilizando o óxido de cromo (Cr₂O₃) como indicador, conforme recomendado pelo NRC (2011). Os CDA foram calculados de acordo com a equação estabelecida previamente por Maynard e Loosli (1969): $CDA (\%) = 100 - [(N_f/N_d) \times (Cr_2O_3d/Cr_2O_3f) \times 100]$, em que N_f é a concentração de energia ou nutriente nas fezes (kcal), N_d é a concentração de energia ou nutriente na dieta (kcal), Cr₂O₃d é a concentração de óxido de cromo na dieta (g/kg de matéria seca) e Cr₂O₃f é a concentração de óxido de cromo nas fezes (g/kg de matéria seca).

2.7 Atividade de enzimas digestivas

A atividade das enzimas digestivas foi analisada por espectrofotometria em analisador bioquímico semiautomático (BIO-2000 IL, Barueri, SP, Brasil). A atividade da Alfa – Amilase e Lipase foram determinadas através do método cinético utilizando kits comercial (Amilase Cinética K046-2.1 e Lipase K025-1; QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil). A atividade das enzimas digestivas amilase, protease alcalina totais e lipase foram avaliadas usando métodos previamente estabelecidos (Imani

et al., 2017). A atividade da protease alcalina totais foi analisada usando Azocaseína (2%) em Tris-HCl, pH = 7,5 como substrato. A atividade da enzima unitária foi expressa como 1 μ mol de n-nitrofenol liberado por mg de proteína por minuto. A atividade específica da lipase foi avaliada usando nitrofenil miristato como substrato (TOSCANO et al., 2013). Cada ensaio (0,5 mL) continha 0,53 mM de p-nitrofenilmiristato, 0,25 mM de 2-metoxietanol, 5 mM de colato de sódio e 0,25 M de Tris-HCl (pH = 9,0). Após o tempo de incubação de 15 min a 30 °C, a reação terminou com a adição de 0,7 mL de acetona/n-heptano (5:2, v/v). Após agitação vigorosa, a amostra foi centrifugada a 6080 rpm por 2 min, e a densidade óptica da solução aquosa foi registrada a 405 nm. A unidade da atividade enzimática foi expressa como 1 μ mol de n-nitrofenol liberado por mg de proteína por minuto.

2.8 Análises químicas

Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Ingredientes, dietas e fezes foram analisados quanto à matéria seca [Método 927.05 (AOAC, 2007)], proteína bruta [Método 984.13; (AOAC, 2007)], lipídios totais (Método; 920.39), fibra bruta [Método 985.29; (AOAC, 2000)] e cinzas [Método 942.05; (AOAC, 2007)]. A matéria seca foi determinada por secagem de amostras em estufa a 105 ° C durante 24 horas. A proteína bruta (N x 6,25) foi realizada em aparelho macro Kjeldahl, e o lipídeos totais seguiu o método de extração com éter de petróleo. O teor de cinzas foi determinado após a ignição de uma amostra em uma mufla a 550 ° C por 6 horas. Cálcio, fósforo, Zn, magnésio, Mn, ferro, cobre (Cu) e cromo foram determinados por espectrometria de emissões ópticas de plasma acoplado indutivamente usando um método validado internamente (Perkinelmer 8000, Waltham, MA, EUA), análise [Método 985.01 (A, B, D); (AOAC, 1990)]. A energia bruta foi determinada por um calorímetro de bomba adiabática (Parr1266; Parr Instruments Co., Moline, IL, EUA).

2.9 Parâmetros bioquímicos

As análises plasmáticas foram realizadas por espectrofotometria em analisador bioquímico semiautomático (Analisador Bioquímico MAX BIO 300 VET, Manaus – Amazonas, Brasil), por meio de kits comerciais (QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) para: alanina aminotransferase (ALT) foi adicionado 100 µl de amostra a 1,0 mL do reagente de Trabalho, misturado e transferido para a cubeta termostaticada à 37 °C durante 1 min. Feito a leitura inicial e disparando simultaneamente o cronômetro, repetindo as leituras 1,2 e 3 min, calculando a média das diferenças das absorvâncias por min ($\Delta A/\text{min}$) (BIOCLIN - Cinética K049); fosfatase alcalina (ALP) foi preparado primeiramente o reagente de trabalho, utilizando 4 partes do reagente nº 1 (tampão) com 1 parte do reagente nº 2 (substrato). Após adicionado 20 µl de amostra a 1,0 mL do reagente de trabalho, homogeneizado e transferido para a cubeta termostaticada a 37°C durante 1 min. Após foi realizado a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro e repetido as leituras após 1,2 e 3 min, calculando a média das diferenças de absorvância por min (Abs/min) e utilizar para o cálculo (BIOCLIN-IFCC K224); aspartato aminotransferase (AST), preparo da solução de trabalho misturando 4 partes do reagente nº1 (substrato) com 1 parte do reagente nº2 (coenzima). Após foi adicionado 100 µl de amostra a 1,0 mL do Reagente de trabalho, homogeneizando e transferindo para a cubeta termostaticada à 37 °C durante 1 min. Repetindo as leituras após 1, 2 e 3 min, calculando a média das diferenças de absorvância por min ($\Delta A/\text{min}$) e utilizar para cálculo do resultado (BIOCLIN - cinética K048); colesterol (HDL) foi preparado 3 tubos de ensaio B (branco), A (amostra) e P (padrão). No tubo branco foi utilizado apenas o reagente enzimático, no tudo padrão foi utilizado o reagente nº 1 (padrão) e adicionado 1,0 mL de reagente enzimático e no tubo da amostra foi adicionado 50 µl de amostra e 1,0 mL do reagente enzimático, após foi utilizado as

contas fornecidas pelo próprio kit comercial (BIOCLIN - enzimático K015-1); glicose monoreagente, foi preparado 3 tubos de ensaio B (branco), A (amostra) e P (padrão). No tubo branco foi utilizado apenas 1,0 mL do reagente nº 1 (reagente enzimático), no tubo padrão foi utilizado 1,0 mL do reagente nº 1 (reagente enzimático) e adicionado 10 µL do reagente nº 2 (padrão) e no tubo da amostra foi adicionado 10 µL de amostra e 1,0 mL do reagente nº 1 (reagente enzimático). Foi homogeneizado e deixado em banho-maria a 37°C durante 10 min, após foi feita a leitura das absorbâncias da amostra e do padrão, acertando o zero com o branco (BIOCLIN - monoreagente K082-2); proteína total monoreagente, foi preparado 3 tubos de ensaio B (branco), A (amostra) e P (padrão). No tubo branco foi utilizado apenas 2,5 mL de biureto, no tubo padrão foi utilizado 2,5 mL de biureto e adicionado 50 µL da solução padrão e no tubo da amostra foi adicionado 50 µL de amostra e 2,5 mL de biureto. Após homogeneizar bem e deixar em repouso durante 10 min, as absorbâncias da amostra e do padrão foram lidas, acertando o zero com o branco (BIOCLIN - monoreagente K031) e triglicerídeos monoreagente, foi preparado 3 tubos de ensaio B (branco), A (amostra) e P (padrão). No tubo branco foi utilizado apenas 1,0 mL do reagente nº 1 (reagente enzimático), no tubo padrão foi utilizado 1,0 mL do reagente nº 1 (reagente enzimático) e adicionado 10 µL do reagente nº 2 (padrão) e no tubo da amostra foi adicionado 10 µL de amostra e 1,0 mL do reagente nº 1 (reagente enzimático). Após homogeneizar bem foi deixado em banho-maria a 37°C durante 10 min, as absorbâncias da amostra e do padrão foram lidas, acertando o zero com o branco (BIOCLIN - monoreagente K117).

2.10 Análises histológicas

Os cortes histológicos foram examinados sob microscópio óptico acoplado a uma câmera Olympus Pro-Series da Media Cybernetics, Olympus, Japão, para captura de

imagens. A altura das vilosidades foi medida a partir do ápice das vilosidades até o início da camada muscular, utilizando o software Image-Pro Plus (versão 5.2 - Media Cibernética).

Para determinar a altura e largura das vilosidades, foram analisadas 100 vilosidades aparentemente intactas por peixe. A altura média das vilosidades foi calculada a partir da média de 300 vilosidades para cada unidade experimental, totalizando 1200 vilosidades por tratamento. A altura total das vilosidades foi medida do ápice das vilosidades até o início da camada muscular e também do ápice das vilosidades até o término da camada serosa. A largura e a espessura do epitélio das vilosidades também foram analisadas (FUKAUAMA et al, 2005).

2.11 Minerais nas vértebras

Solução mineral: Primeiramente os cadinhos foram calcinados e passaram pelas análises de matéria seca e matéria mineral (como descrito anteriormente). Após isso, foi adicionado 5 mL de HCL (1:1) dentro dos cadinhos e esses foram levados para a chapa para serem aquecidos até a evaporação total do HCL (AOAC, 2000). Posteriormente foi adicionado mais HCL na mesma medida que permaneceu até a evaporação do conteúdo de forma que restou uma borra de cinza ao fundo (para facilitar a solubilização foi utilizado um bastão de vidro para cada um dos cadinhos). Com esse processo feito, foi adicionado água destilada no cadinho e então o conteúdo foi filtrado em papel filtro e o filtrado foi armazenado em balão volumétrico (KOLMER et al., 1951).

3. Análise estatística

Os dados serão apresentados como valores médios \pm erro padrão da média (EPM). A normalidade e a homogeneidade de variância serão avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, para os parâmetros de qualidade dos filés. Os dados de

desempenho produtivo, composição corporal, atividade de enzimas digestivas e digestibilidade foram analisados por ANOVA de duas vias. Os dados foram comparados pelos testes de intervalo múltiplo de Tukey em $P < 0,05$. Todos os dados foram realizados usando SAS v. 9.1.3 (SAS, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) com significância definida em $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Desempenho

Os dados de desempenho das tilápias do Nilo alimentadas com as dietas experimentais estão apresentados na Tabela 3. Os resultados indicam que não houve efeito significativo dos tratamentos dietéticos no desempenho dos peixes ($P > 0,005$).

Tabela 3- Desempenho de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas¹.

Item	Dieta ²				P-valor
	MTI	MTO100	MTO75	MTO50	
PI (g)	2,9 ± 0,01	2,9 ± 0,03	2,8 ± 0,00	2,9 ± 0,02	0,203
PF (g)	97,2 ± 0,8	99,7 ± 2,7	94,0 ± 0,7	99,9 ± 2,7	0,163
GP (%)	3276 ± 37	3342 ± 103	32119 ± 22	33888 ± 102	0,408
CON (%PV/dia)	2,9 ± 0,00	2,9 ± 0,00	2,9 ± 0,00	2,9 ± 0,00	0,416
EA	1,09 ± 0,00	1,08 ± 0,01	1,09 ± 0,00	1,10 ± 0,01	0,480
ERE (%)	36,7 ± 0,2	36,7 ± 0,1	36,8 ± 0,4	37,6 ± 0,4	0,158
ERP (%)	44,7 ± 0,7	45,0 ± 0,4	44,3 ± 0,4	44,6 ± 0,7	0,557
IVS (%)	10,3 ± 0,4	10,6 ± 0,2	10,5 ± 0,2	9,6 ± 0,8	0,395
IHS (%)	3,1 ± 0,1	3,5 ± 0,2	3,3 ± 0,1	3,1 ± 0,1	0,351
IGV (%)	2,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,2	0,140
SOB (%)	100,0 ± 0,0	99,1 ± 0,9	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	0,426

Abreviaturas: PI, peso inicial (g); PF, peso final (g); GP, ganho de peso (%); CON, consumo (%PV/dia); EA, eficiência alimentar; ERE, eficiência de retenção de energia (%); ERP, eficiência de retenção de proteína (%); IVS, índice víscero-somático (%); IHS, índice hepato-somático; IGV, índice de gordura víscero-somática (%); SOB, sobrevivência (%).

¹ Valores são médias \pm erro padrão médio de quatro repetições (27 peixes por replicata).

²MTI, microminerais traços inorgânicos; MTO100, microminerais traços orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI; MTO75, microminerais traços orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI; MTO50, microminerais traços orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI.

4.2 Composição corporal e composição do filé

Os resultados da composição corporal e do filé de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com as dietas experimentais são apresentados na Tabela 4. Os peixes alimentados com as dietas MTO100 e MTO75 apresentaram maior teor de cinzas ($P = 0,001$) em comparação aos peixes alimentados com a dieta MTI. Os demais parâmetros da composição corporal e do filé não foram afetados pelos tratamentos dietéticos ($P > 0,05$).

Tabela 4 - Composição corporal (g/kg) de juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas¹.

Item	Dieta ²				P-valor ³
	MTI	MTO100	MTO75	TO50	
Composição corporal					
Umidade	722,0 ± 0,8	723,4 ± 2,1	727,0 ± 7,2	721,3 ± 1,0	0,727
Proteína bruta	142,3 ± 1,1	140,6 ± 1,3	136,9 ± 3,0	138,8 ± 2,9	0,401
Lipídeos totais	77,3 ± 1,5 ^a	64,4 ± 2,5 ^b	74,3 ± 2,5 ^a	77,8 ± 0,7 ^a	<0,001
Cinzas	28,9 ± 0,71 ^b	33,4 ± 0,7 ^a	33,6 ± 0,5 ^a	31,9 ± 1,4 ^{ab}	0,001
Composição do filé					
Umidade	804,2 ± 4,3	797,5 ± 3,9	794,2 ± 4,4	796,4 ± 1,8	0,310
Proteína bruta	160,0 ± 4,3	160,8 ± 1,8	165,8 ± 4,5	164,2 ± 0,8	0,559
Lipídeos totais	10,7 ± 0,5	10,7 ± 0,3	11,3 ± 0,6	10,2 ± 0,3	0,518
Cinzas	12,2 ± 0,2 ^b	14,4 ± 1,1 ^a	13,2 ± 0,4 ^a	13,6 ± 0,5 ^a	<0,001

¹ Valores são médias ± erro padrão médio de quatro repetições (27 peixes por replicata).

² MTI, microminerais traços inorgânicos; MTO100, microminerais traços orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI; MTO75, microminerais traços orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI; MTO50, microminerais traços orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI.

^{a-b} Valores distintos sobrescritos na mesma linha indicam diferenças pelo teste de Tukey (P < 0,05).

4.3 Composição de minerais corporal e nas vértebras

A composição mineral corporal e nas vértebras de juvenis de tilápia do Nilo são apresentadas na Tabela 5. Não foi observado efeito dos tratamentos dietéticos na composição mineral corporal e nas vértebras (P > 0,05).

Tabela 5 - Composição de minerais corporal e nas vértebras (mg/kg, matéria natural) de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas¹.

Item	Dieta ²				P-valor
	MTI	MTO100	MTO75	TO50	
Composição corporal					
Cálcio (g/kg)	2,5 ± 0,0	2,6 ± 0,0	2,6 ± 0,1	2,6 ± 0,0	0,231
Fósforo (g/kg)	2,0 ± 0,0	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,0	0,383
Zinco	25,5 ± 1,0	26,3 ± 1,0	25,5 ± 0,8	26,1 ± 1,0	0,928
Manganês	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,9 ± 0,1	0,664
Cobre	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,0	0,108
Ferro	72,4 ± 2,4	76,3 ± 3,2	71,5 ± 1,7	78,7 ± 1,6	0,125
Minerais nas vértebras					
Cálcio (g/kg)	114,2 ± 2,5	118,1 ± 0,8	118,3 ± 1,2	116,2 ± 1,1	0,256
Fósforo (g/kg)	135,2 ± 11,8	127,4 ± 1,5	167,8 ± 6,8	131,6 ± 16,6	0,068
Zinco	42,0 ± 1,4	42,9 ± 1,8	47,6 ± 2,9	40,6 ± 2,7	0,200
Manganês	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,354
Cobre	1,5 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,0	1,4 ± 0,1	0,138
Ferro	62,9 ± 3,9	64,7 ± 3,0	65,3 ± 4,9	72,8 ± 5,9	0,125

¹ Valores são médias ± erro padrão médio de quatro repetições (27 peixes por replicata).

² MTI, microminerais traços inorgânicos; MTO100, microminerais traços orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI; MTO75, microminerais traços orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI; MTO50, microminerais traços orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI.

4.4 Retenção corporal de minerais

Os dados de retenção de minerais em juvenis de tilápia do Nilo são apresentados na Tabela 6. Os peixes alimentados com as dietas MTO50 e MTO75 apresentaram níveis mais elevados ($P < 0,001$) de cálcio e zinco no corpo em comparação aos alimentados com a dieta MTI. Além disso, os peixes alimentados com a dieta MTO50 apresentaram maior ($P = 0,002$) retenção corporal de ferro em relação aos peixes alimentados com as

demais dietas. Não houve efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos na retenção corporal de fósforo, manganês (Mn) e cobre (Cu).

Tabela 6 - Retenção corporal de minerais em (mg/kg) juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas¹.

Item	Dieta ²				P-valor
	MTI	MTO100	MTO75	MTO50	
Cálcio (g/kg)	24,4 ± 0,6 ^b	26,9 ± 0,2 ^a	26,9 ± 0,7 ^a	26,6 ± 0,3 ^a	0,011
Fósforo (g/kg)	21,8 ± 0,2	20,3 ± 0,8	20,7 ± 1,7	20,7 ± 0,3	0,694
Zinco	20,6 ± 0,9 ^c	21,3 ± 0,9 ^{bc}	25,0 ± 0,7 ^b	30,9 ± 1,0 ^a	<0,001
Manganês	15,0 ± 0,7	15,5 ± 1,1	16,4 ± 0,3	17,8 ± 0,3	0,075
Cobre	25,4 ± 0,6	29,4 ± 1,0	25,2 ± 0,7	28,9 ± 1,1	0,138
Ferro	50,9 ± 2,1 ^b	56,5 ± 3,2 ^b	60,6 ± 2,6 ^{ab}	72,8 ± 4,3 ^a	0,002

¹ Valores são médias ± erro padrão médio de quatro repetições (27 peixes por replicata).

² MTI, microminerais traços inorgânicos; MTO100, microminerais traços orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI; MTO75, microminerais traços orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI; MTO50, microminerais traços orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI

^{a-c} Valores distintos sobrescritos na mesma linha indicam diferenças pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.5 Atividade de Enzimas Digestivas

A atividade de enzimas digestivas de juvenis de tilápia do Nilo é apresentada na Figura 4. Foi observada uma maior atividade ($P < 0,001$) das enzimas amilase, protease e lipase nos peixes alimentados com a dieta MTO100 em comparação aos peixes que receberam a dieta MTI. Além disso, os peixes que consumiram a dieta MTO100 apresentaram maior atividade ($P < 0,05$) das enzimas amilase, protease e lipase em comparação aos que consumiram as demais dietas.

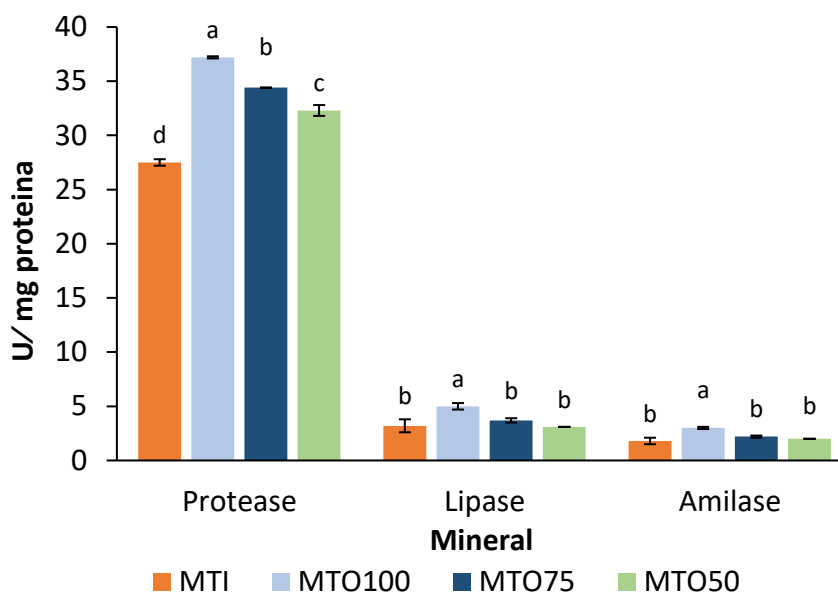


Figura 4 - Atividade de enzimas digestivas em juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas¹

¹ Valores são médias \pm erro padrão médio de quatro repetições (27 peixes por replicata).

² MTI, microminerais traços inorgânicos; MTO100, microminerais traços orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI; MTO75, microminerais traços orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI; MTO50, microminerais traços orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI.

^{a-c} Para a atividade de cada enzima, valores distintos sobrescritos na mesma linha indicam diferenças pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.6 Coeficiente de digestibilidade aparente

Os resultados de coeficiente de digestibilidade aparente de juvenis de tilápia do Nilo são apresentados na Tabela 8. Os peixes alimentados com a dieta MTO100 apresentaram maior coeficiente de digestibilidade aparente de energia bruta em relação àqueles alimentados com a dieta contendo apenas minerais inorgânicos (MTI), enquanto os peixes alimentados com a dieta MTI apresentaram o menor coeficiente de digestibilidade aparente de energia bruta em relação às demais dietas ($P < 0,001$). Os peixes que receberam a dieta MTO100 também apresentaram maior coeficiente de digestibilidade aparente de proteína bruta em relação aos que receberam as demais dietas

($P < 0,001$). Não foi observado efeito significativo dos tratamentos dietéticos no coeficiente de digestibilidade aparente dos minerais ($P > 0,05$).

Tabela 7 - Coeficiente de digestibilidade aparente (%) em dietas para juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas¹.

Item	Dieta ²				<i>P</i> -valor ³
	MTI	MTO100	MTO75	MTO50	
Energia bruta	73,6 ± 0,1 ^d	80,2 ± 0,1 ^a	78,2 ± 0,2 ^b	74,3 ± 0,2 ^c	<0,001
Proteína bruta	91,7 ± 0,3 ^b	93,8 ± 0,1 ^a	93,4 ± 0,0 ^a	92,1 ± 0,1 ^b	<0,001
Cálcio	61,1 ± 1,5	62,4 ± 0,7	61,5 ± 1,0	60,3 ± 0,5	0,333
Fósforo	60,3 ± 0,1	61,8 ± 0,1	60,7 ± 0,2	61,4 ± 1,7	0,618
Zinco	59,4 ± 1,2 ^{ab}	56,6 ± 0,7 ^b	59,9 ± 1,7 ^{ab}	61,2 ± 1,8 ^a	0,023
Manganês	58,3 ± 1,7	60,5 ± 1,2	54,4 ± 2,1	55,0 ± 2,0	0,099
Cobre	67,6 ± 6,3	62,4 ± 3,4	66,7 ± 8,4	65,5 ± 9,1	0,201
Ferro	60,6 ± 5,4 ^b	76,7 ± 2,3 ^{ab}	71,6 ± 1,5 ^{ab}	80,6 ± 6,5 ^a	0,038

¹ Valores são médias ± erro padrão médio de quatro repetições (27 peixes por replicata).

² MTI, microminerais traços inorgânicos; MTO100, microminerais traços orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI; MTO75, microminerais traços orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI; MTO50, microminerais traços orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI

^{a-d} Valores distintos sobrescritos na mesma linha indicam diferenças pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.7 Parâmetros sanguíneos

Os parâmetros sanguíneos de juvenis de tilápia do Nilo estão apresentados na Tabela 9. Os peixes que receberam a dieta MTO100 apresentaram valor significativamente maior ($P = 0,005$) da expressão da enzima ALP em comparação aos peixes que receberam a dieta MTO50. Os demais parâmetros sanguíneos não foram afetados pelos tratamentos dietéticos ($P > 0,05$).

Tabela 9- Parâmetros sanguíneos de juvenis de tilápia do Nilo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas¹.

Item	Dieta ²				<i>P</i> -valor ³
	MTI	MTO100	MTO75	MTO50	
ALP (U/l)	6,9 ± 0,8 ^{ab}	9,0 ± 0,7 ^a	6,2 ± 0,7 ^{ab}	4,0 ± 0,9 ^b	0,005
AST (mg/dl)	32,7 ± 6,4	51,5 ± 9,8	36,2 ± 5,6	31,9 ± 5,0	0,212
ALT (U/l)	1,7 ± 0,0	3,9 ± 0,4	3,1 ± 0,8	2,6 ± 0,5	0,080
PT (g/dl)	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,1	0,929
GLU (mg/dl)	65,2 ± 3,7	78,9 ± 5,0	77,4 ± 4,5	64,5 ± 3,4	0,056
TCG (mg/dl)	295 ± 321	345,9 ± 44,1	257,4 ± 25,7	397,2 ± 64,7	0,184
CHO (mg/dl)	98,0 ± 5,9	106,2 ± 10,7	99,9 ± 3,2	95,9 ± 3,9	0,720

Abreviaturas: ALP, fosfatase alcalina (U/l); AST, aspartato aminotransferase (mg/dl); ALT, alanina aminotransferase (U/l); PT, proteínas totais (g/dl); GLU, glicose (mg/dl); TCG, triglicérides (mg/dl); CHO, colesterol HDL (mg/dl).

¹ Valores são médias ± erro padrão médio de quatro repetições (27 peixes por replicata).

² MTI, microminerais traços inorgânicos; MTO100, microminerais traços orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI; MTO75, microminerais traços orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI; MTO50, microminerais traços orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI

^{a-b} Valores distintos sobrescritos na mesma linha indicam diferenças pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.8 Morfometria intestinal

Os dados de morfometria intestinal de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com as dietas experimentais encontram-se na Tabela 10. Já a morfometria intestinal dos mesmos juvenis é apresentada na Figura 5.

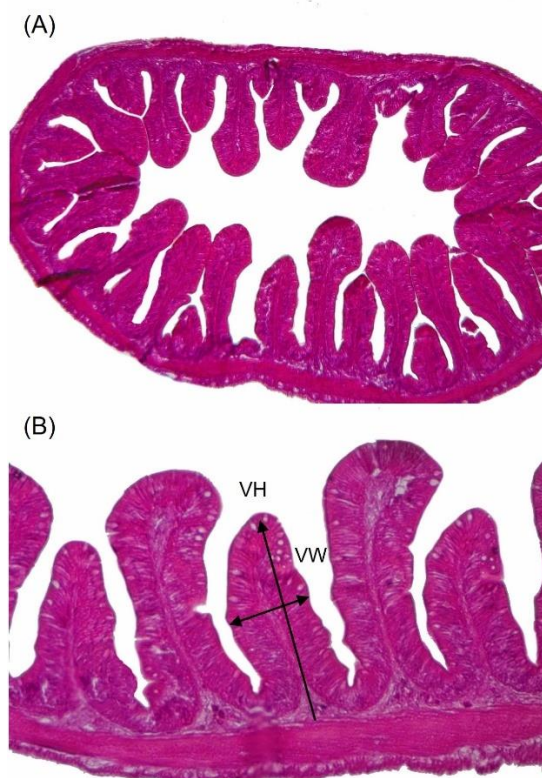


Figura 5- Morfometria intestinal de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com a dieta controle. Aumento de 10x (A) e 20x (B), coloração hematoxilina-eosina (HE).

Fonte: Arquivo pessoal.

A morfometria intestinal de juvenis de tilápia do Nilo é apresentada na Tabela 10. As dietas experimentais não influenciaram ($P > 0,05$) a altura e largura das vilosidades intestinais, assim como sua relação.

Tabela 10- Morfometria intestinal de juvenis de tilápia do Nilo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas¹.

Item	Dieta ²				<i>P</i> -valor ³
	MTI	MTO100	MTO75	MTO50	
Altura (μm)	$548,8 \pm 21,2$	$470,1 \pm 18,9$	$518,8 \pm 40,7$	$493,1 \pm 21,7$	0,249
Largura (μm)	$191,7 \pm 10,7$	$183,8 \pm 6,1$	$200,7 \pm 12,7$	$205,2 \pm 12,7$	0,537
AV/LV	$2,9 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,1$	0,167

Abreviaturas: AV, altura das vilosidades (μm); LV, largura das vilosidades (μm).

¹ Valores são médias \pm erro padrão médio de quatro repetições (27 peixes por replicata).

² MTI, microminerais traços inorgânicos; MTO100, microminerais traços orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI; MTO75, microminerais traços orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI; MTO50, microminerais traços orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI.

^{a-c} Valores distintos sobrescritos na mesma linha indicam diferenças pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.9 Balanço de minerais

A Tabela 11 apresenta o balanço de minerais de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com diferentes dietas experimentais. Os peixes que receberam as dietas MTO75 e MTO50 apresentaram menor consumo ($P < 0,05$) e excreção de zinco, manganês e cobre em comparação aos que consumiram as dietas MTI e MTO100, mantendo a retenção de zinco e manganês sem alterações ($P > 0,05$). Além disso, os peixes que consumiram a dieta MTO50 apresentaram menor consumo e excreção ($P < 0,05$) de zinco, manganês e cobre em comparação aos que consumiram as outras dietas.

Tabela 11- Balanço de minerais (mg/kg ganho de peso) de juvenis de tilápia do Nilo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas¹.

Item	Dieta ²				<i>P</i> -valor ³
	MTI	MTO100	MTO75	MTO50	
Zinco					
Consumido	120,2 ± 0,3 ^a	121,2 ± 1,4 ^a	100,3 ± 0,3 ^b	83,0 ± 0,3 ^c	<0,001
Retido	24,8 ± 1,2	25,9 ± 1,1	25,1 ± 0,8	25,6 ± 1,0	0,870
Excretado	95,4 ± 0,9 ^a	95,3 ± 1,6 ^a	75,2 ± 0,6 ^b	57,4 ± 0,5 ^c	<0,001
Manganês					
Consumido	46,9 ± 0,1 ^a	47,3 ± 0,5 ^a	45,1 ± 0,1 ^b	43,0 ± 0,4 ^c	<0,001
Retido	7,2 ± 0,4	7,3 ± 0,4	6,4 ± 0,6	7,6 ± 0,2	0,298
Excretado	39,7 ± 0,3 ^a	39,9 ± 0,9 ^a	38,6 ± 0,6 ^b	35,3 ± 0,2 ^c	<0,001
Cobre					
Consumido	15,5 ± 0,0 ^a	15,7 ± 0,2 ^a	14,9 ± 0,0 ^b	13,8 ± 0,1 ^c	<0,001
Retido	4,2 ± 0,2 ^{ab}	4,6 ± 0,2 ^a	4,0 ± 0,2 ^b	4,0 ± 0,1 ^{ab}	<0,001
Excretado	11,4 ± 0,2 ^a	11,1 ± 0,1 ^a	11,1 ± 0,1 ^a	9,8 ± 0,2 ^b	<0,001

¹ Valores são médias ± erro padrão médio de quatro repetições (27 peixes por replicata).

² MTI, microminerais traços inorgânicos; MTO100, microminerais traços orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI; MTO75, microminerais traços orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI; MTO50, microminerais traços orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI.

^{a-c}Valores distintos sobrescritos na mesma linha indicam diferenças pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.10 Excreção de minerais

A Figura 6 apresenta a excreção de minerais (mg/kg fezes, matéria seca). Os peixes alimentados com as dietas MTO75 e MTO100 apresentaram excreção significativamente menor de Zn nas fezes em comparação com os peixes alimentados com as demais dietas ($P < 0,001$). Além disso, a excreção de Zn foi significativamente

menor nos peixes que consumiram a dieta MTO50 em relação aos que consumiram as outras dietas experimentais.

Houve também menor excreção de Mn pelos peixes que receberam as dietas com minerais orgânicos em comparação com aqueles que receberam a dieta com minerais inorgânicos ($P = 0,001$), mas não houve diferença significativa entre os peixes que consumiram as dietas com minerais orgânicos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) na excreção de Cu em peixes que receberam as dietas experimentais.

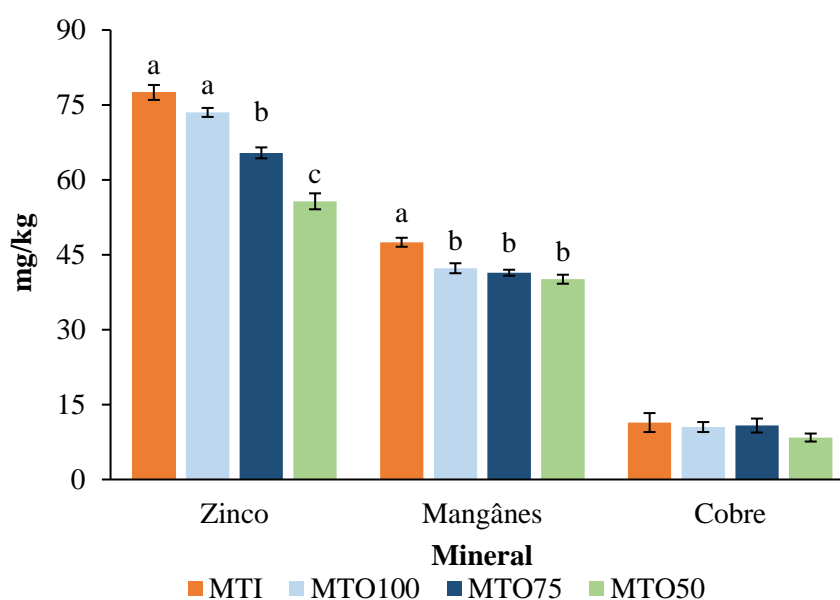


Figura 6- Excreção de minerais (mg/kg fezes, matéria seca) de juvenis de tilápia do Nilo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo alimentados com as dietas experimentais durante oito semanas¹.

¹ Valores são médias \pm erro padrão médio de quatro repetições (27 peixes por replicata).

² MTI, microminerais traços inorgânicos; MTO100, microminerais traços orgânicos para atender 100% da exigência da dieta MTI; MTO75, microminerais traços orgânicos para atender 75% da exigência da dieta MTI; MTO50, microminerais traços orgânicos para atender 50% da exigência da dieta MTI

^{a-c} Valores distintos sobrescritos na mesma linha indicam diferenças pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

5. Discussão

Essa pesquisa foi realizada com minerais orgânicos a fim de evitar a interação dos minerais entre si, vitaminas ou outros componentes da dieta, influenciando na biodisponibilidade e para redução da contaminação ambiental por parte da excreção de minerais no meio aquático. A quantificação da suplementação adequada de minerais em dietas práticas para peixes é difícil, pois os peixes podem absorver alguns minerais da água, uma fração dos minerais pode ser lixiviada das dietas experimentais, os ingredientes da dieta contêm uma certa quantidade de minerais.

Nesse presente estudo não foram encontradas diferenças no ganho de peso dos juvenis de tilápias do Nilo. Da mesma forma em outro estudo com juvenis de tilápia do Nilo não obtiveram resultados nos parâmetros de ganho de peso (PIERRI et al., 2021). Assim, o ganho de peso não é o melhor indicador de resposta para estudos com microminerais (PRABHU et al., 2014). Uma das possíveis explicações para isso é o fato de que a dieta basal utilizada continha oligoelementos suficientes para promover o crescimento adequado da tilápia.

Resultados semelhantes foram encontrados em vários outros estudos em diferentes espécies como *Oncorhynchus mykiss* (APINES et al., 2003 ; KUCUKBAY et al., 2006 ; SARKER e SATOH, 2008 ; WELKER et al., 2018 ; SHAHPAR e JOHARI, 2019), *Oreochromis niloticus* (CARMO et al., 2005a , CARMO et al., 2005b), *Scophthalmus maximus* (MA et al., 2014), *Cyprinus carpio* (DEKANI et al., 2019), *Dicentrarchus labrax* (KOKOU et al., 2020). Semelhantemente ao obtido no presente estudo, esses autores não evidenciaram alterações no crescimento dos peixes com a inclusão de minerais orgânicos em substituição aos minerais inorgânicos.

No entanto, existem muitos estudos contrastantes, onde a fonte alimentar (orgânica e inorgânica) e/ou a dose afetaram significativamente o crescimento de peixes

como *Epinephelus malabaricus* (HOUNG-YUNG ET AL., 2014), *Oreochromis niloticus* (HUANG et al., 2015), *Sparus aurata* (DOMÍNGUEZ et al., 2017), *Labeo rohita* (AKRAM et al., 2019). Da mesma forma, avaliando a suplementação dietética de Zn orgânico, inorgânico e nanopartículas em dietas para larvas de dourada (*Sparus aurata*), os autores relataram maior crescimento dos peixes alimentados com o Zn orgânico em comparação aos peixes que receberam o Zn inorgânico e na forma de nanopartículas (IZQUIERDO et al., 2017).

O efeito da duração do experimento sobre o ganho de peso é controversa na literatura. Por exemplo, em experimento de curta duração (2 semanas) com dietas suplementadas com Zn inorgânico (óxido de zinco ou sulfato de zinco) e orgânico (proteínato de zinco ou zinco-metionina) para juvenis de *Oncorhynchus mykiss*, não foi observado diferença significativa no ganho de peso dos peixes (KJOSS et al., 2006). Em um experimento de longo duração (6 meses) com inclusão de gluconato de Zn (Zn orgânico) e sulfato de Zn (Zn inorgânico) em dietas de salmão do Atlântico, também não foi observado efeito da fonte de Zn sobre o ganho de peso dos peixes (MAAGE et al., 2001).

Semelhante ao obtido no presente estudo, vários autores relataram que não encontraram diferenças na composição corporal devido à dose, tipo de Zn ou sua interação. Os autores reportaram a composição corporal não é adequado como um indicador de dose e/ou tipo de suplementação de Zn para *Oncorhynchus mykiss* (SARKER e SATOH, 2008 ; READ et al., 2014), *Sparus aurata* (DOMÍNGUEZ et al., 2017), *Labeo rohita* (AKRAM et al., 2019), *Scophthalmus maximus* (YANG et al., 2020).

No presente estudo, não houve alterações na composição corporal e nas vértebras, de cálcio, Zn e ferro. No entanto, o aumento da suplementação dietética orgânica e/ou

inorgânica de Zn resultou em aumento do conteúdo de Zn vertebral, ósseo ou corporal total em várias espécies como *Oncorhynchus mykiss* (SARKER e SATOH, 2008; READ et al., 2014; WELKER et al., 2018), Salmão do Atlântico (MAAGE et al., 2001), *Dicentrarchus labrax* (FOUNTOULAKI et al., 2010), *Scophthalmus maximus* (MA et al., 2014), *Epinephelus malabaricus* (HOUNG-YUNG et al., 2014), *Oreochromis niloticus* (HUANG et al., 2015), tilápia híbrida (LI e HUANG, 2016) e *Labeo rohita* (AKRAM et al., 2019). Devido aos efeitos de interação, é difícil tirar conclusões concretas apenas com esses dados. Mais pesquisas sobre o conteúdo de Zn vertebral poderão fornecer diferenças mais específicas entre as várias formas químicas de inclusão de Zn, particularmente entre vários tecidos do corpo. Essas discrepâncias podem ter ocorrido devido às diferenças no tamanho dos peixes, órgãos analisados (corpo inteiro versus carne), composição da dieta, bem como fonte e forma de minerais.

Nesse estudo os peixes alimentados com as dietas com minerais orgânicos apresentaram maior retenção corporal de Zn. Diferentemente, a maior deposição de Zn nas vértebras de tilápias do Nilo foi encontrada em peixes alimentados com inorgânico do que peixes que receberam dieta com Zn orgânico (CARMO et al., 2005b). Isso provavelmente está correlacionado os níveis e fontes de Zn das dietas, assim como a composição da dieta (GLOVER e HOGSTRAND, 2002; KUCUKBAY et al., 2006).

Em relação ao Mn, a análise de metadados com base na literatura mostrou que a concentração de Mn nas vértebras é o critério mais robusto (PRABHU et al., 2016). Em relação ao Cu, apesar da descrição da maior disponibilidade Cu orgânico em relação ao Cu inorgânico para promover a mineralização tecidual comparável (APINES et al. 2003; BHARADWAJ et al. 2014; LIN et al., 2010), ainda não há relato sobre qual variável é melhor para determinar sua efetiva utilização dietética.

Nesse estudo, ocorreu maior atividade das enzimas digestivas protease, lipase e amilase nos peixes que receberam a dieta com minerais orgânicos, independentemente do nível de inclusão de minerais orgânicos. Proteases ácidas são produzidas e ativadas no estômago em condições de baixo pH, sendo de fundamental importância no início da digestão de proteínas (ROTTA, 2003), fato que pode explicar a maior digestibilidade da proteína no presente estudo. Os padrões enzimáticos digestivos refletem em grande parte os hábitos alimentares dos peixes (herbívoros, detritos, onívoros e carnívoros), bem como sua capacidade digestiva (SMITH, 1980). Também foi sugerido que os minerais orgânicos podem ser mais facilmente absorvidos no intestino devido à sua estabilidade estrutural e baixo peso molecular (APINES-AMAR et al., 2004).

Nesse presente estudo, houve uma maior atividade da enzima ALP nos peixes que receberam a dieta com 100% com minerais orgânicos em relação aos peixes que receberam a dieta com metade da quantidade de minerais orgânicos. A elevada atividade da enzima ALP está relacionada a distúrbio ósseo, que pode ocorrer pela deficiência de Ca e/ou P ou pela alteração dietética da relação entre esses minerais (BERNET et al., 2001). A mineralização óssea é um processo biológico complexo e alto nível de ALP está relacionado com a atuação da enzima nos locais de mineralização óssea e cartilagem, por meio da hidrólise de fosfato orgânico para liberar fosfato inorgânico em locais de mineralização resultando em maior crescimento (DONACHY et al., 1990). Katya et al. (2016a) sugeriram uma eficiência de 2 a 4 vezes maior na utilização de minerais orgânicos em comparação com minerais inorgânicos em frangos de corte.

No presente estudo, ficou evidente que a redução em 25 e 50% dos minerais inorgânicos por minerais orgânicos não influenciou o ganho de peso e a eficiência alimentar, mas efetivamente contribuiu para a redução na excreção de minerais pelos peixes. Os minerais orgânicos devido à sua ação de ligação a moléculas orgânicas, se

tornam mais estáveis no trato digestivo e menos propensos a interações e antagonismos, tornando-os menos disponíveis para interação e ligação (APINES-AMAR et al., 2004). Isso, por sua vez, melhorou a eficiência de utilização dos minerais avaliados, otimizando sua disponibilidade de forma a atender à exigência nutricional e reduzir sua excreção. Assim, efetivamente, demonstrou-se o potencial de aplicação dos minerais orgânicos para elaborar dietas com menor potencial poluente na criação de tilápias.

Em conclusão, este estudo investigou a utilização de Zn, manganês e cobre na forma orgânica (glicinatos) em substituição aos minerais de fontes inorgânica (sulfatos) em dietas para juvenis de tilápias do Nilo. Foi demonstrado que a redução de 25 e 50% dos níveis dietéticos de Zn, manganês e cobre de fonte inorgânica por glicinatos não resulta em efeitos negativos sobre o desempenho e retenção de minerais, assim como sobre parâmetros bioquímicos plasmáticos. Notadamente, ficou evidente a possibilidade em substituir 50% dos minerais inorgânicos por minerais orgânicos sobre a excreção de zinco, manganês e cobre pelos peixes. Esses achados contribuem para o conhecimento científico e podem auxiliar na formulação de dietas mais precisas e sustentáveis ambientalmente para criação de tilápias.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa avaliou os efeitos da substituição de fontes inorgânica por fonte orgânica (glicinatos) de zinco, cobre e manganês sobre o desempenho, composição corporal, retenção e digestibilidade de minerais, atividade de enzimas digestivas, parâmetros sanguíneos e morfometria intestinal de juvenis de tilápia do Nilo. Os resultados obtidos indicam que a possibilidade de substituição de minerais inorgânicos por minerais orgânicos em até 50% sem prejuízos sobre o desempenho dos peixes. Entretanto, os peixes alimentados com as dietas com minerais orgânicos apresentaram maior teor corporal de minerais em relação aos peixes alimentados com a dieta com minerais inorgânicos. Além disso, retenção corporal de cálcio, zinco e ferro foi maior nos peixes alimentados com as dietas com 75 e 50% dos minerais contidos na dieta com minerais inorgânicos.

Os peixes alimentados com 100% de substituição de minerais inorgânicos por minerais orgânicos apresentaram maior atividade da protease e amilase e maior coeficiente de digestibilidade aparente de energia bruta e proteína bruta em relação aos peixes alimentados com as demais dietas. Assim, ficou evidente a maior disponibilidade dos minerais orgânicos em comparação aos inorgânicos, demandando maior quantidade dos respectivos minerais para os processos de digestão e absorção da amilase e proteína

dietética. Destaca-se a maior atividade da enzima fosfatase alcalina no plasma dos peixes alimentados com a dieta com 100% de substituição de minerais inorgânicos por minerais orgânicos, indicando maior disponibilidade dos minerais orgânicos avaliados na presente pesquisa.

Os peixes que receberam as dietas contendo minerais orgânicos apresentaram menor excreção de zinco e manganês, reduzindo sua excreção pelos peixes. Assim, os minerais orgânicos são importantes ferramentas nutricionais para reduzir a excreção de minerais e aumentar a sustentabilidade na criação de tilápias. Portanto, a inclusão de minerais orgânicos é uma alternativa promissora na formulação de dietas para tilápias do Nilo, proporcionando benefícios nutricionais aos peixes, além de contribuir para a redução dos impactos ambientais reduzindo a excreção de minerais no meio aquático.

REFERÊNCIAS

ADIL, S., BANDAY, T., BHAT, G. A., SALAHUDDIN, M., RAQUIB, M., & SHANAZ, S. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. *Veterinary Medicine International*, 2010, 479527, 2010.

AKRAM, M., BHATTI, S. A., ABBAS, G., HASSAN, M., & JAVID, A. Effect of different zinc sources on the growth performance, mineral content, and oxidative stability of meat in *Labeo rohita*. *Journal of Applied Animal Research*, 47(1), 466-474, 2019.

ANTONY JESU PRABHU, P., et al. Zinc in fish nutrition. In: A. M. Méndez-Vilas (Ed.), *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education* (pp. 1169-1176). Formatex Research Center, 2016.

ANTONY JESU PRABHU, P., SCHRAMA, J. W., VAN HEES, M., VERRETH, J. A. J., & SCHRAMA, J. W. Dose-response relationship between dietary manganese concentration and growth, mineral composition and liver and bone variables in common carp (*Cyprinus carpio*) fed semi-purified diets. *Aquaculture*, 453, 13-20, 2016.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (17th ed.). AOAC International, 2000.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (18th ed.). AOAC International, 2007.

APINES, M., KUCUKBAY, F. Z., SARKER, M. Z. I., & SATOH, S. Effects of dietary zinc level and its sources on growth performance and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fisheries Science*, 69(3), 589-595, 2003.

APINES-AMAR, M. J., et al. Assessment of zinc methionine, zinc sulfate and zinc oxide as zinc sources for chicks by tissue zinc response and zinc-65 retention. *British Poultry Science*, 45(4), 518-525, 2004.

APINES-AMAR, M. J., KUCUKBAY, F. Z., & SATOH, S. The effect of different dietary zinc sources on zinc absorption and zinc dependent enzyme activities in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fisheries Science*, 70(4), 677-684, 2004.

APINES-AMAR, M.J.S., SATOH, S., CAIPANG, C.M.A., KIRON, V., WATANABE, T., AOKI, T., Amino acid-chelate: a better source of Zn, Mn and Cu for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 240 (1-4), 345-358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.032>, 2004.

BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., & WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 24(5), 265-272, 2001.

BHARADWAJ, A. S., MOHANTY, S., & PRUSTY, A. K. Effect of different sources of dietary organic and inorganic copper supplementation on growth, nutrient utilization and antioxidant enzyme activities in Indian major carp (*Labeo rohita*, Hamilton) fingerlings. *Aquaculture Research*, 45(9), 1577-1588, 2014.

BIOCLIN - Química Básica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2023.

BOYD, C. E., & LICHTKOPPLER, F. R. Water quality management in fish ponds. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, 1979.

BOYD, C. E., & TUCKER, C. S. Pond aquaculture water quality management. Springer, 2014.

BUENTELLO, J. A., et al. Utilization of organic and inorganic zinc sources in hybrid striped bass *Morone chrysops* × *M. saxatilis* diets. *Aquaculture*, 288(3-4), 305-309, 2009.

CARMO E SÁ, M. I. G., et a. Influência do zinco na dieta sobre o desempenho e deposição de minerais em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33(6), 1799-1807, 2004.

CARMO, G. T., SANTOS, R. R., & GOMES, L. C. Uso de níveis crescentes de cobre em dietas para tilápias-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.) (Osteichthyes: Cichlidae). *Ciência Rural*, 35(3), 688-694, 2005a

CARMO, G. T., GOMES, L. C., & SANTOS, R. R. Efeito do excesso de ferro dietético no metabolismo de cobre em tilápias-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae). *Ciência Rural*, 35(4), 825-830, 2005b.

CHEN, D., YAMAMOTO, N., & GATLIN, D. M. Organic trace minerals enhance the performance and health of fish and shrimp. In: D. M. Gatlin, N. B. Qin, & R. P. Hardy (Eds.), *The Use of Nutraceuticals in Aquaculture: An Overview* (pp. 79-94). Springer, 2020.

CLAY, D. Environmental considerations for aquaculture. In: R. P. Phelps (Ed.), *Health and Environment in Aquaculture* (pp. 1-16). Nova Science Publishers, 2008.

DEKANI, A., GHAEDNIA, B., NAEINI, S. M., & PIRBAZARI, M. Effects of different dietary levels of zinc on growth performance, body composition and serum biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 18(3), 548-562, 2019.

DIMITROGLOU, V., ZOUPANOS, A., PAPADAKI, E., KOKOLAKIS, M., & TSOUKALAS, G. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections for histological and pathological analysis. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 588, pp. 157-166). Humana Press, 2010.

DOMÍNGUEZ, D., COTRENA, P., SALA, A., ÁLVAREZ, A., & GISBERT, E. Effect of dietary organic selenium and zinc on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)

growth, digestibility and mineral composition of whole body and selected tissues. *Aquaculture*, 468, 34-43, 2017.

DOMÍNGUEZ, D., et al. Microencapsulated organic minerals (Cu, Zn and Mn) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: Effects on growth performance, mineral accumulation and tissue oxidative status. *Aquaculture*, 505, 335-342, 2019.

DONACHY, J. H., HUME, R., LAMBERT, M., & SPEAKE, B. K. Evidence for the role of alkaline phosphatase in matrix vesicle-mediated calcification. *Journal of Cellular Biochemistry*, 42(1), 37-49, 1990.

EL-SAYED, A. M. Fish nutrition in aquaculture. Springer, 2020.

EL-SAYED, A. M., et al. Chemical analysis of diets formulated for the major cultured species of fish in Egypt. *Aquaculture Research*, 31(9), 683-692, 2000.

FOUNTOULAKI, E., DIVANACH, P., & ALEXIS, M. Interactive effects of dietary lipid level and inorganic zinc supplementation on growth performance, nutrient utilization and tissue mineral concentrations in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 300(1-4), 182-188, 2010.

FUKAYAMA, E.H.; BERTECHINI, A.G.; GERALDO, A.; KATO, R.K.; MURGAS, L.D.S. Extrato de orégano como aditivo em rações para frango de corte. *Bras. Zootec.*, Lavras, v.34, n. 6, p. 2316 - 2326, 2005.

GICHANA, Z. M., et al. Assessment of water pollution in the Morogoro urban-industrial area, Tanzania. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(7), 395, 2018.

GLOVER, C. N., & HOGSTRAND, C. Comparative aspects of gastrointestinal zinc transport. *Journal of Comparative Physiology B*, 172(6), 409-430, 2002a.

GLOVER, C.N., HOGSTRAND, C. Amino acid modulation of in vivo intestinal zinc uptake in freshwater rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 205, 151–158, 2002b.

HOUNG-YUNG, C., HUANG, S., & CHIEN, Y. Effects of dietary organic and inorganic selenium supplementation on growth performance, antioxidant capacity, selenium accumulation, and meat quality of *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, 434, 376-382, 2014.

HUANG, Y. C., CHEN, S. C., LIN, H. L., & HUNG, S. S. O. Effects of dietary organic and inorganic selenium supplementation on the growth, feed utilization, antioxidant capacity, and selenium concentration of tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, 448, 135-141, 2015.

IMANI, A., KARIMI, M., DEZFOULIAN, O., & MOHAMMADI, F.. Effects of dietary supplementation with *Mentha piperita* (peppermint) on nutrient digestibility and growth performance in calves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(5), e67-e74, 2017.

IZQUIERDO, M. S., et al. Effect of organic selenium on growth performance and tissue selenium concentrations in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed high plant protein diets. *Aquaculture Nutrition*, 23(6), 1355-1363, 2017a.

IZQUIERDO, M., SOCORRO, J., ARANTZAMENDI, L., HERNANDEZ-CRUZ, C., & AFONSO, J. M. Effect of zinc sources on larval growth, survival and biochemical composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Research*, 48(2), 481-491, 2017b.

KARACHLE, P. V., & STERGIOU, K. I. Fish nutrition as a limiting factor in fish aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*, 4(4), 209-220, 2012a.

KARACHLE, P.K., STERGIOU, K.I. Morphometrics and Allometry in fishes. In: Wahl, C. (Ed.), *Morphometrics*. InTech, New York, pp. 65–86, 2012b.

KATYA, K., et al. Effects of dietary zinc and/or copper supplementation on growth performance, tissue mineral content, antioxidant status and hepatopancreatic and gut morphology of *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Nutrition*, 23(6), 1344-1354, 2017.

KATYA, K., SHEFFY, T. B., & SHLOMO, H. Dietary mineral amino acid chelates versus inorganic mineral supplementation alters performance, carcass yield, and organ weights in broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 25(2), 261-273, 2016a.

KATYA, K., SHEFFY, T. B., & SHLOMO, H. Effect of organic versus inorganic sources of copper, zinc, manganese and selenium on broiler performance, yield, mineral excretion, and accumulation in tissues. *Livestock Science*, 186, 20-26, 2016b.

KJOSS, V. A., BREMNER, H. A., & FIVELSTAD, S. Effects of short-term feeding of zinc sources on growth performance, haematology and bone status in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) parr. *Aquaculture Nutrition*, 12(5), 354-363, 2006.

KOKOU, F., FOUNTOULAKI, E., LAZOU, T., KARACOSTAS, I., & HENRY, M. Zinc supplementation in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*): Effects on growth performance, whole body mineral content, skeletal mineralization, gut histology, and mineral digestibility. *Aquaculture*, 516, 734644, 2020.

KOLMER JA , SPAULDING EH , ROBINSON HW . Técnicas laboratoriais aprovadas . 5ª edição . Nova York : Appleton Century Crafts, 1951.

KOLMER, J. A. et al. Determination of mineral constituents in plant materials. *Journal of Agricultural Research*, v. 63, n. 11, p. 787-801, 1951.

KUCUKBAY, F. Z., APINES, M., & SARKER, M. Z. I. Dietary zinc requirement and tissue mineral concentration of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets supplemented with different levels and sources of zinc. *Aquaculture*, 252(2-4), 377-384, 2006.

Kucukbay, F. Z., Apines, M., & Satoh, S. Effects of dietary zinc levels and sources on growth performance, tissue zinc content and tissue zinc metallothionein of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fisheries Science*, 72(5), 1021-1029, 2006.

LALL, S.P. The minerals. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, New York, pp. 260–310, 2002.

LI, M. H., & HUANG, S. M. Effects of dietary zinc sources on growth, mineral bioavailability, tissue accumulation and hematological characteristics of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Aquaculture Research*, 47(2), 459-468, 2016.

LIANG, J. Q., et al. Comparison of zinc bioavailability between organic zinc and inorganic zinc in Chinese yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) diets. *Aquaculture Nutrition*, 26(1), 155-162, 2020.

LIN, H. Y., LIN, T. Y., & SHIAU, S. Y. Dietary manganese requirement of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture*, 274(1), 63-68, 2008.

LIN, S., LI, M. H., STOREBAKKEN, T., LIU, B., & HUANG, S. M. Effects of different copper sources on growth, tissue accumulation, serum and hepatopancreas enzyme activities, and intestinal microflora in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture Research*, 41(1), 85-95, 2010.

MA, S. L., QIAO, L., ZHOU, J. X., & YAN, X. F. Effect of dietary zinc sources on growth performance, digestive enzyme activities and hepatic antioxidant status of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture Research*, 45(9), 1581-1590, 2014.

MAAGE, A., AUSTRENG, E., STOREBAKKEN, T., & SHEARER, K. D. Inclusion of organic and inorganic zinc in diets for Atlantic salmon *Salmo salar* L.: Impact on growth, nutrient digestibility, zinc and copper retention, and susceptibility to infection with *Vibrio salmonicida*. *Aquaculture Nutrition*, 7(4), 217-228, 2001.

MAYNARD, L. A., & LOOSLI, J. K. Nutritional effects on the excretion of chromic oxide by sheep. *The Journal of Nutrition*, 99(4), 389-394, 1969.

NAYLOR, R. L., et al. *Aquaculture - A global analysis*. *Annual Review of Environment and Resources*, 46, 57-100, 2021.

NGUYEN, L., et al. Mineral nutrition of fish: Historical considerations, current trends, and future perspectives. *Aquaculture*, 498, 430-447, 2019.

NGUYEN, L., LAY, J. O., et al. Mineral nutrition in aquaculture: Advances and recommendations for improvement. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50(3), 583-615, 2019.

NRC (National Research Council). *Nutrient requirements of laboratory animals*. National Academies Press, 2011.

PEREIRA, R. C., CAIRES, L. C., DESTRO, F. T., ROSA, P. V., & MOREIRA, F. B. Effects of dietary organic mineral supplementation on the intestinal microbiota of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 484, 144-150, 2018.

PIERRI, D. F., et al. Effect of dietary organic trace minerals on the growth, immune response and antioxidative status of juvenile silver pompano (*Trachinotus blochii*). *Aquaculture Research*, 52(3), 1301-1311, 2021a.

PIERRI, D. F., et al. Impact of organic trace minerals on the growth, antioxidant enzyme activities, and gene expression related to mineral absorption and metabolism in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 47(3), 671-686, 2021b.

PIERRIS, V., RIGOS, G., & LAZOS, E. S. Effects of dietary organic and inorganic selenium supplementation on growth performance, selenium deposition and antioxidant response of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 27(1), 85-97, 2021.

PRABHU, P. A. J., MATLIN, S. A., & DABROWSKI, K. Effect of mineral nutrition on growth and metabolism of fish: a review. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 22(4), 257-271, 2014.

PROPHET, E. B., MILLS, B., & ARRINGTON, J. B. Method of paraffin embedding from pathological specimens. In *Laboratory Methods in Histotechnology* (pp. 35-36). American Society of Clinical Pathologists Press, 1992.

RANA, K.J., SIRIWARDENA, S., HASAN, M.R. Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production. In: *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, 2009.

READ, P., POWELL, M., & HILL, R. Influence of dietary zinc source and level on zinc bioaccumulation and tissue zinc distribution in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture Nutrition*, 20(3), 250-261, 2014.

Rotta, M. A. *Peixes de água doce no Brasil*, 2003.

SABZI, R., MOHAMMADIAZARM, H., & SALATI, A. P. Effects of dietary carvacrol on growth performance, serum biochemical parameters and immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Aquaculture Research*, 48(1), 376-385, 2017.

SAMANTA, A. K., JAYAPRAKASH, T. L., DAS, S., SINHA, S. N., GHOSH, T. K., & DAS, A. M. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, cecal microflora, and serum biochemistry of broiler chickens. *Veterinary Medicine International*, 2010.

SARKER, M. Z. I., & SATOH, S. Effect of zinc and manganese sources and their levels on growth and mineral composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in a low-mineral well water. *Animal Science Journal*, 79(5), 636-644, 2008a.

SARKER, M. Z. I., & SATOH, S. Effects of dietary zinc on growth, mineral composition and flesh quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 280(1-4), 196-202, 2008b.

SHAHPAR, H., & JOHARI, S. A. Comparison of organic and inorganic zinc source on growth performance, body composition, hematology, and histology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Reports*, 14, 100203, 2019.

SHIAU, S. Y., & NING, L. J. Dietary copper requirement of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*. *Aquaculture*, 454, 12-18, 2016.

SILVA, C., et al. Effects of organic trace minerals on growth performance, body composition and oxidative status of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 498, 117-126, 2019.

SMITH, L. L. Feeding behavior and feeding rate of juvenile hybrid striped bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, 109(2), 170-176, 1980.

SOOKYING, D., DAVIS, D.A., SOLLER DIAS DA SILVA, F. A review of the development and application of soybean-based diets for Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Nutr.* 19, 441–448, 2013.

TOSCANO, C., GÓMEZ, M., BAÑÓN, S., & GARCÍA-CARMONA, F. Effect of chitosan edible films on the stability of polyphenols and ascorbic acid in a grape juice model system. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 42-50, 2013.

TURCIOS, A. E., & PAPENBROCK, J. Sustainable treatment of aquaculture effluents—What can we learn from the past for the future?. *Sustainability*, 6(12), 8364-8410, 2014.

WATANABE, T., KIRON, V., SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*. 151, 185–207, 1997.

WELKER, T. L., LIM, C., YILDIRIM-AKSOY, M., KLESIUS, P. H., & EVANS, J. J. . Effects of dietary zinc and zinc source on growth and immune responses of channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque, 1818). *Aquaculture Research*, 49(10), 3445-3457, 2018.

WELKER, T. L., MYRICK, C. A., SHRESTHA, S., BARROWS, F. T., & HILL, J. E. Influence of dietary protein, lipid, and mineral source on growth, body composition, and hepatic gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) parr. *Aquaculture Nutrition*, 24(6), 1646-1659, 2018.

YANG, Y., CAO, L., LIU, H., YANG, C., WEN, H., & LIU, W. Effects of dietary zinc sources on growth, nutrient digestibility, hepatic antioxidant capacity and muscle composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*). *Aquaculture Research*, 51(2), 599-609, 2020.

YUAN, Y., JIN, M., LUO, J., XIONG, J., WARD, T.L., JI, F., XU, G., SUN, M., ZHOU, Q. Effects of different dietary copper sources on the growth and intestinal microbial

communities of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquac. Nutr.* 25 (4), 828–840, 2019.

ZHOU, X., et al. Comparison of bioavailability of zinc sources in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture Nutrition*, 15(5), 498-504, 2009.