



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

Prebióticos, probióticos e simbióticos em dietas de juvenis de tilápias-do-Nilo

JAQUELINE MURBACH BRAZ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia

Dourados-MS

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**Prebióticos, probióticos e simbióticos em dietas de juvenis de tilápias-do-
Nilo**

JAQUELINE MURBACH BRAZ

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Dacley Hertes Neu

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Claucia

Aparecida Honorato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia

Área Área de Concentração: Produção
Animal.

Dourados-MS

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

B827p	<p>Braz, Jaqueline Murbach. Prebióticos, probióticos e simbióticos em dietas de juvenis de tilápias-do-nilo. / Jaqueline Murbach Braz. – Dourados, MS : UFGD, 2022.</p> <p>Orientador: Prof. Dacley Hertés Neu. Coorientadora: Prof. Cláucia Aparecida Nonato. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Biotecnologia. 2. Bactérias não patogênicas. 3. Crescimento. 4. Piscicultura. I. Título.</p>
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.


**PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS EM DIETAS DE JUVENIS DE TI-
LÁPIAS-DO-NILO**

por

JAQUELINE MURBACH BRAZ

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título
de MESTRE EM ZOOTECNIA

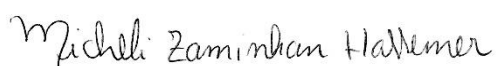
Aprovado em: 08/03/2022



Dr. Dacley Hertes Neu
Orientador – UFGD



Dra. Mariana Lins Rodrigues
UNEB



Dra. Micheli Zaminhan Hassemer
UMC

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por toda sua abundante graça, por me sustentar e estar ao meu lado a todos os momentos de dificuldade e felicidade, pelas bênçãos que me concedeu durante toda minha vida.

Aos meus pais João Braz e Nilda Murbach Braz por todo empenho que tiveram sobre minha educação e por seu imenso amor por mim, por todo incentivo que me deram durante toda minha vida, por sempre acreditarem no meu potencial e por suas orações.

Ao meu namorado Lucas Henrique Markus por sua paciência nos meus momentos de surto, por estar ao meu lado nos momentos de maior dificuldade e me apoiando no que fosse preciso, agradeço pelo seu carinho e dedicação em fazer meus dias especiais e mais felizes.

A instituição Universidade Federal da Grande Dourados, que me possibilitou ser mais crítica e atuante na sociedade por meio de minha profissão.

Ao Guilherme e Raissa Telli, proprietários da psicicultura GR Aquacultura, pela doação dos peixes para o experimento.

A empresa Biorigen, em nome do João Fernandes, pela doação do prebiótico e a empresa Biomart, em nome do Fernando Calil pela doação do probiótico.

Ao meu orientador Prof. Dr Dacley Hertes Neu, por todo ensinamento, paciência e aprendizado, por suas cobranças para que eu sempre desse o meu melhor, pelo incentivo, por acreditar em mim não medindo esforços para me auxiliar em tudo que precisasse durante todo período de orientação.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Claucia Honorato, pela orientação e apoio durante toda a pesquisa e análises realizadas, obrigada por toda a paciência e dedicação.

Ao Prof. Dr Leonardo Seno por realizar a análise estatística deste experimento, a Profa.Dra Mariana Lins Rodrigues e Profa.Dra Flávia Barbieri Bacha por todo auxílio nas análises laboratoriais, obrigada pela disponibilidade de tempo para me ensinar.

Aos meus amigos e colegas Arypes Scuteri Marcondes, Juliana Dias de Oliveira, Wellington Vilhalba, Rayane Seibt Moraes, Matheus Antonio do Amaral, por todo apoio e contribuição na condução do experimento.

Em especial agradeço aos meus amigos/irmãos Agnês Odakura e Elieser Leão que em todos os momentos estiveram presentes, por me ouvir e me dar apoio em todos os momentos de dificuldade, obrigada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida nesses dois anos.

A todos os professores em geral, por todo o conhecimento passado durante esses sete anos de estudo na UFGD.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos”

Provérbios 13:3

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract.....	2
Considerações iniciais	3
CAPÍTULO 1	5
1 Aquicultura mundial e brasileira	6
1.1 tilápia–do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	7
2 Nutrição aquícola.....	7
2.1 Uso de aditivos na nutrição aquícola.....	8
3 Composição centesimal	11
4 Integridade intestinal e hepática	12
5 Ação enzimática digestiva.....	14
Referências	16
CAPITULO 2	23
Resumo	24
1. Introdução.....	25
2. Material e métodos	26
2.1 Análises zootécnicas e índices somáticos.....	28
2.2 Análises de composição centesimal (peixes e ração)	29
2.3 Enzimas plasmática, hepática e intestinal.....	29
2.4Enzimas oxidativas	30
2.5Parâmetros do metabolismo hepático	30
2.6 Parâmetros digestivos	30
2.7Análises bioquímicas plasmáticas	31
2.8 Análises histológicas	31
2.9 Integridade hepática.....	32

2.10 Análises estatísticas	32
2.11 Análise multivariada MFA	33
3. Resultados.....	33
3.1 Desempenho produtivo e índices somáticos.....	33
3.2 Análises de composição centesimal	34
3.3 Enzimas oxidativas	35
3.4 Parâmetros do metabolismo hepático	35
3.5- Parâmetros digestivos.....	36
3.6- Parâmetros bioquímicos	36
3.7 Análises histológicas	36
3.8 Integridade hepática.....	37
3.9 Correlação de Pearson Desempenho x histologia.....	38
3.10 Análise Multivariada MFA.....	40
4. Discussão	42
4.1. Desempenho produtivo e índices somáticos.....	42
4.2. Enzimas oxidativas	44
4.4 Parâmetros bioquímicos	45
4.5. Análises histológicas	45
4.6 Correlação de Pearson desempenho X histologia.....	46
4.7 Análise Multivariada	46
5. Conclusão	47
6. Considerações finais	47
Referências bibliográficas	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis de garantia da dieta base utilizada para a inclusão de aditivos em ração comercial extrusada para alevinos de tilápia-do-Nilo	27
Tabela 2. Desempenho produtivo de juvenis de tilápia-do-Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.	34
Tabela 3. Composição centesimal de juvenis de tilápia-do-Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.	35
Tabela 4. Metabólitos de juvenis de tilápias-do-Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.	35
Tabela 5. Variáveis do metabolismo hepático de juvenis-de-tilápias do Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.	35
Tabela 6. Parâmetros digestivos de juvenis de tilápias-do-Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.	36
Tabela 7. Metabólitos plasmáticos de juvenis de tilápias-do-Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.	36
Tabela 8. Intestino de juvenis de tilápia-do-Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.	36
Tabela 9- Fígado de juvenis de tilápia-do-Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.	37
Tabela 10- Correlação de Pearson entre as variáveis de desempenho e histológicas.	39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismo de ação das bactérias probióticas no lúmen intestinal. Fonte: Adaptado de Cunha (2016).10
- Figura 2.** Ação das bactérias probióticas e prebióticos no lúmen intestinal. Fonte: Adaptado de EducaPoint (2019).11
- Figura 3.** Trato digestório da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), peixe onívoro, com estômago pequeno, ausência de cecos pilóricos e intestino longo. E: estômago, CP: cecos pilóricos, I: intestino. Morfologia e Fisiologia do Sistema Digestório de Peixes. Adaptado de Golçalves et al., (2012).13
- Figura 4.** Índice de lesões histopatológicas de alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), nos tratamentos PROB = Probiótico 4g.kg^{-1} ; PREB = Prebiótico 4g.kg^{-1} ; SIMB I = Simbiótico (2g.kg^{-1} probiótico+ 2g.kg^{-1} prebiótico) e SIMB II = Simbiótico (4g.kg^{-1} probiótico+ 4g.kg^{-1} prebiótico).38
- Figura 5.** Qualidade de representação das variáveis dentre as cinco dimensões estudadas. ...41
- Figura 6.** Qualidade de representação das variáveis dentre as cinco dimensões estudadas.....41
- Figura 7.** Médias dos valores em cada unidade experimental. Cores em verde referem-se ao tratamento controle (isento de aditivos), cores em amarelo referem-se ao tratamento com inclusão de prebiótico (4g.kg^{-1}), valores em vermelho refere-se ao tratamento com inclusão de probiótico (4g.kg^{-1}), cores em azul referem-se ao grupo de peixes alimentados com simbiótico (2g.kg^{-1} de prebiótico + 2g.kg^{-1} de probiótico), e, cores em cinza referem-se ao grupo de peixes alimentados com simbiótico (4g.kg^{-1} de prebiótico + 4g.kg^{-1} de probiótico).....42

Resumo

Braz, J.M. **Prebióticos, probióticos e simbióticos em dietas de juvenis de tilápias-do-Nilo.** 2022. 54p. Defesa (mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inclusão de prebiótico, probiótico e simbiótico na produtividade e nos parâmetros fisiológicos de juvenis de tilápia-do-Nilo. Foram utilizados 300 animais com peso médio inicial de $11,3 \pm 0,32$ g e comprimento médio inicial de $8,5 \pm 0,57$ cm, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em 15 caixas d'água (2000 L), com três repetições em cada tratamento, durante um período de 60 dias. Os peixes foram alimentados com uma dieta comercial de 32% de proteína bruta e adicionados aditivos por meio de banho de óleo (2%), além de uma dieta isenta do aditivo. Os tratamentos foram denominados, Controle (isento de aditivo), PROB (4g.kg^{-1}) composto por um mix de probióticos como *Bacillus subtilis*, PREB MOS (4g.kg^{-1}), SIMB I (2g.kg^{-1} probiótico + 2g.kg^{-1} prebiótico) e SIMB II (4g.kg^{-1} probiótico + 4g.kg^{-1} prebiótico). A inclusão dos aditivos promoveu efeito nos seguintes parâmetros de desempenho produtivo: conversão alimentar, taxa de eficiência proteica diferindo os aditivos apenas do tratamento controle, e para o quociente intestinal o tratamento SIMB II foi o que obteve maior valor deste parâmetro. A composição centesimal não foi alterada pela adição dos aditivos nas dietas, porém os aditivos melhoraram a retenção de proteína, enquanto o tratamento SIMB II apresentou maior índice de glicose plasmática. O desenvolvimento das células hepáticas foi influenciado pela inclusão dos aditivos, sendo altura e largura dos hepatócitos reduzidos, mas a integridade do órgão não diferiu significativamente entre os tratamentos. Não foram verificadas diferenças entre os tratamentos nas histológicas de intestino médio, assim como nas análises enzimáticas do fígado e intestino, apenas a glicose plasmática obteve diferenças significativas dentre os tratamentos em que o SIMB II apresentou maiores níveis de glicose. A análise multivariada demonstrou que o grupo controle se diferenciou totalmente dos demais. O uso dos aditivos MOS e mix de probióticos composto com *Bacillus subtilis* (em concentrações de 5×10^9 UFC), melhorou tanto o desenvolvimento e o estado de saúde de juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*) ao longo do crescimento e recomenda-se o uso da dose SIMB I (2g.kg^{-1} de probiótico + 2g.kg^{-1} MOS).

Palavras-chave: Biotecnologia, bactérias não patogênicas, crescimento, piscicultura

Abstract

Braz, J.M. **Prebiotics, probiotics and symbiotics in Nile tilapia juvenile diets**. 2022. 54p. Defense (Master's) - Faculty of Agrarian Sciences, Federal University of Grande Dourados.

The aim of this study was to evaluate the effect of prebiotic, probiotic and symbiotic inclusion on productivity and physiological parameters of Nile tilapia juveniles. A total of 300 animals with an initial average weight of 11.3 ± 0.32 g and an initial average length of 8.5 ± 0.57 cm were used, distributed in a completely randomized design in 15 water tanks (2000 L), with three replications. In each treatment, during a period of 60 days. The fish were fed a commercial diet of 32% crude protein and additives were added through an oil bath (2%), in addition to a diet free of the additive. The treatments were named Control (additive free), PROB (4g.kg⁻¹) composed of a mix of probiotics such as *Bacillus subtilis*, PREB MOS (4g.kg⁻¹), SIMB I (2g.kg⁻¹ probiotic + 2g.kg⁻¹ prebiotic) and SIMB II (4g.kg⁻¹ probiotic + 4g.kg⁻¹ prebiotic). The addition of the additives effected the treatment, and improved the performance in the following efficiency rates: feed conversion coefficient of the additives only of the intestinal treatment, and for which the SIMB II obtained the highest value of this parameter. The proximate composition was not altered by the addition of additives in the diets, but the additives improved protein retention, while the SIMB II treatment showed a higher plasma glucose index. The development of liver cells was influenced by the inclusion of additives, with reduced height and width of hepatocytes, but organ integrity did not differ significantly between treatments. There were no differences between treatments in midgut histology, as well as in liver and intestine enzymatic analysis, only plasma glucose showed significant differences among treatments in which SIMB II showed higher glucose levels. The multivariate analysis showed that the control group was completely different from the others. The use of MOS additives and probiotic mix composed with *Bacillus subtilis* (in concentrations of 5×10^9 CFU) improved both the development and the health status of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) throughout the growth period and the use is recommended of the SIMB I dose (2g.kg⁻¹ of probiotic + 2g.kg⁻¹ MOS).

Key words: Biotechnology, non-pathogenic bacteria, growth, fish farming

Considerações iniciais

Nas últimas décadas o consumo do pescado tem se mostrado promissor dentre os produtos de origem animal, batendo o recorde de 20,5 kg *per capita*, de acordo com os dados da FAO (2020). Isso se deve a inúmeros aspectos, dentre eles o valor nutricional da carne. O pescado é uma fonte rica de ácidos graxos poli-insaturados, ômega-3, aminoácidos essenciais (Durmus, 2019), e confere inúmeras vantagens para o organismo humano como a proteção contra possíveis doenças como carcinoma hepatocelular, doenças cardiovasculares e neurológicas (Larsson et al., 2004), portanto, apresentando efeitos benéficos para a saúde humana.

Todo o desenvolvimento na produção de pescado das últimas décadas exigiu melhorias nos pilares essenciais da produção, tais como o melhoramento genético, boas práticas de manejo, sanidade, nutrição e nos sistemas produtivos. Fato este, que possibilitou o aumento na produção espécies como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), terceira espécie mais cultivada mundialmente, em que o melhoramento genético possibilitou um rápido crescimento ao animal, contribuiu na melhoria da rusticidade, e junto com os estudos nutricionais foi possível estabelecer suas exigências dietéticas proporcionando um aumento no rendimento de filé, e ainda uma melhor qualidade da carne estabelecendo uma alta na procura do pescado pelos consumidores, devido a busca por uma alimentação mais equilibrada e de maior valor nutricional (Boscolo et al., 2001; Meuer et al., 2002; Kubitzka, 2011).

Com a intensificação da produção do pescado, os animais são submetidos a um maior nível de estresse, como o maior número de animais por área, manejos cotidianos, não sendo realizados adequadamente podem afetar diretamente o sistema imunológico dos peixes, causando um baixo crescimento e alta mortalidade (Adamante et al., 2008), além da variação climática em que o controle é restrito a ambientes pequenos. Dito isto, a dieta fornecida aos animais torna-se fundamental, por atuar na saúde, desempenho e fortalecimento do sistema imune, servindo como primeira proteção do organismo contra possíveis infecções de patógenos. Além disso, atualmente as rações apresentam alto desempenho, formuladas levando em consideração a fisiologia digestiva e exigências de cada espécie (Ribeiro et al., 2012).

Os aditivos alimentares comumente são incorporados a dieta como forma alternativa para melhorar a imunidade dos peixes e o aproveitamento dos nutrientes da ração, agindo positivamente no desempenho dos animais; como exemplo desse grupo estão os probióticos, que são microrganismos vivos que atuam na saúde e no desempenho do hospedeiro devido a colonização destes microrganismos benéficos na microbiota intestinal dos animais excluindo por competição as bactérias patogênicas (Saad, 2006); os prebióticos, que permitem maior

tempo de ação dos microrganismos probióticos favorecendo a saúde intestinal servindo como “alimento” para as bactérias probióticas potencializando a sua ação no organismo (Hoseinifar et al., 2014; Mörschbacher et al., 2014) e os simbióticos, que é a combinação de ambos, prebióticos e probióticos, e que agem melhorando as taxas de sobrevivência e modulação da microbiota intestinal (Gibson e Roberfroid, 1995).

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inclusão de prebiótico, probiótico e simbiótico, sobre os parâmetros de desempenho zootécnico, bioquímico plasmático (SOD, CAT, proteína total, glicose e triglicerídeo) e enzimático hepático (ALB, AST e ALT), intestinal (protease, amilase e lipase) e histológicos (intestino e fígado).

O presente estudo está estruturado em dois capítulos, sendo o Capítulo 1 uma revisão de literatura, compilando informações a respeito dos entraves encontrados na piscicultura e possíveis alternativas para incrementar a produção. O capítulo 2, artigo científico intitulado “Prebióticos probióticos e simbióticos em dietas de juvenis de tilápias-do-Nilo” apresenta resultados do estudo redigido conforme as normas da Revista Aquaculture ISSN: 0044-8486.

CAPÍTULO 1
REVISÃO DE LITERATURA

1 Aquicultura mundial e brasileira

A atividade aquícola é um dos setores que mais cresceram nos últimos anos, devido a seu vasto potencial de desenvolvimento e a busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis. Segundo dados da FAO (2020), a produção global de peixes foi de aproximadamente 179 milhões de toneladas no ano de 2018. Do total produzido neste ano, cerca de 156 milhões de toneladas foram destinadas ao consumo humano, e o restante foi destinado a produção de farinhas e óleos de peixe.

Dentre os países produtores de pescado, a China lidera o ranking representando 35% da produção mundial, superando o continente Asiático (34%), Américas (14%), Europa (10%), África (7%) e Oceania (1%). Entre as espécies com maior produção, as carpas (carpa capim – *Ctenopharyngodon idellus* e carpa prateada – *Hypothalmichthys molitrix*) estão em primeiro e segundo lugar, seguido da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (FAO, 2020).

O Brasil possui uma vasta disponibilidade de reservas hídricas, clima tropical, insumos para a produção de ração, mão de obra, entre outras características que são favoráveis a produção de peixes. Apesar destes fatores o país encontra-se apenas na 13ª posição dentre os maiores produtores de peixes em cativeiro e em 8ª na produção de peixes de água doce (FAO, 2020). Apesar dos desafios e incertezas encontradas para a produção de pescado do país, no ano de 2019 a piscicultura brasileira obteve um desempenho positivo, com crescimento de 1,74%, produzindo 529.621 mil toneladas (IBGE, 2020). O maior gargalo para o aumento da produção nacional é atribuído principalmente à falta de assistência técnica, implantação de tecnologias, mão de obra especializada, alto custo de produção, especialmente com rações, assim como a legislação ambiental que difere entre cada Unidade da Federação.

Dos desafios da produção de peixes, em sua maioria estão relacionados aos custos operacionais como a implantação dos sistemas de criação, mão-de-obra qualificada, energia elétrica, manutenção, questões sanitárias e de biossegurança, e em especial aos insumos como a ração, em que a alimentação dos animais com o uso de ração comercial pode chegar a 70% dos custos totais de produção (Palma et al., 2010), e caso seja realizado de forma equivocada pode afetar diretamente o desempenho econômico da atividade.

Apesar de todas as dificuldades ligadas a atividade, as exportações do pescado aumentaram 8% em 2020, e os produtos mais comercializados foram os filés frescos e refrigerados, os quais permitem um maior retorno econômico ao país, representando 45,13% das exportações totais (Souza e Dias, 2021).

1.1 tilápia-do-Nilo (Oreochromis niloticus)

A tilápia-do-Nilo é globalmente comercializada, com elevada produção anual, devido a vários fatores e características da espécie que contribuem para sua alta produtividade. El-Sayed e Kawanna (2008) salientam que a tilápia se enquadra dentro das espécies mais indicadas para produção em sistema intensivo, visto que possui características de interesse zootécnico, tais como alta taxa de crescimento, flexibilidade às mudanças ambientais, fácil reprodução além da rusticidade e fácil adaptação ao confinamento (Watanabe et al., 2002).

Segundo a FAO (2020), a produção mundial de tilápia chegou a 4,5 milhões de toneladas, sendo a terceira espécie mais produzida em âmbito mundial, e no Brasil a representatividade deste peixe se destaca ainda mais, sendo que no ano de 2019 houve um aumento de 3,47% em relação ao ano anterior, obtendo a quantidade de 323.714 mil toneladas se estabelecendo assim como o quarto país com maior produção desta espécie (IBGE, 2020).

Além das vantagens atribuídas à espécie, um dos fatores que colaboram para o aumento da sua demanda ocorre devido a qualidade da carne da tilápia, que apresenta características organolépticas desejáveis, como ausência de espinho em forma de “Y”, além da sua excelente qualidade nutricional e baixo teor de gordura, o que é benéfico para a produção de filés (Boscolo et al., 2007). Além disso, quanto a aceitação de dietas artificiais, a tilápia aproveita bem os ingredientes de origem vegetal (Kubtiza, 1999), tanto proteicos quanto energéticos, mesmo durante a fase larval e de alevinos, o que contribui para a redução dos custos com alimentação (Souza et al., 2000), e ainda, possui todo o ciclo produtivo determinado, portanto, é possível estimar o ganho em peso, conversão alimentar, taxa de eficiência proteica e as curvas de crescimento ao longo do período de criação.

2 Nutrição aquícola

Conhecer os fatores que interferem no aproveitamento dos nutrientes nos diferentes sistemas de produção é essencial, visto que quanto melhor esse insumo for manejado e balanceado, menores os gastos na produção, trazendo maiores retornos para o piscicultor (Iwashita et al., 2014).

Sabe-se que a dieta fornecida aos peixes desempenha papel fundamental no desenvolvimento destes, e é justamente nesta fase em que os peixes possuem um rápido desenvolvimento, portanto, fornecendo uma dieta adequada o aporte nutricional essencial para seu crescimento é garantido, assim como a manutenção da saúde (Hayashi et al. 2002; Filipetto et al. 2005; Kim et al., 2003; Honorato et al., 2013). Deste modo, o manejo integrado com a

escolha dos ingredientes de qualidade e nas quantidades corretas para a formulação da dieta é o caminho para o sucesso da atividade.

No mercado de rações de peixes existe uma variedade de matérias-primas que podem ser incluídas na formulação, desde os alimentos convencionais como a farinha de peixe (Masumoto et al., 1996), até os alternativos que podem entrar nas fórmulas para atender alguma característica específica ou mesmo substituir uma fonte convencional devido à sua indisponibilidade ou mesmo com o intuito de reduzir o custo final da ração (Fontaínhas-Fernandes et al., 1999; Stone et al., 2000; Chong et al., 2002; Kaushik et al., 2004).

De forma geral, a exigência na quantidade de proteína bruta na ração para os peixes varia de acordo com a espécie, fase de desenvolvimento (Fracalossi e Cyrino, 2013), entre outros aspectos. Na realidade os peixes requerem os aminoácidos das proteínas, assim como os ácidos graxos que estão presente nos lipídeos (Nishioka, 2017). As vitaminas e os minerais também devem estar disponíveis, pois, esses constituintes garantem o crescimento, a deposição de carne, a saúde, reprodução e o bem estar durante o ciclo produtivo dos animais (Ribeiro et al., 2012).

O uso destes micronutrientes, suplementos e aditivos na dieta dos peixes se fazem essenciais para que os animais obtenham uma dieta saudável e equilibrada para cada espécie, permitindo um aumento na produtividade, devido ao fortalecimento do sistema imune destes animais e conseqüentemente contribuindo para a uma maior rentabilidade. Recentemente novas tecnologias têm sido incluídas na ração dos peixes, essas novas abordagens surgem como alternativa aos antibióticos, atuando como melhoradores da microbiotaintestinal e mitigadores de perdas nas etapas iniciais de vida garantindo melhorias nas fases subseqüentes desses animais (Hayashi et al., 2002).

Esses compostos também tem por objetivo contribuir para que a nutrição assegure condições dos animais expressarem seu máximo potencial de produção, por permitir uma melhor absorção dos nutrientes, sendo uma boa alternativa para aumentar a produtividade nas pisciculturas (Araujo et al., 2007; Melo et al., 2010; Brito et al., 2014).

2.1 Uso de aditivos na nutrição aquícola

A utilização de aditivos na alimentação animal tem tornado-se uma alternativa viável para melhorar o desempenho, saúde e aproveitamento dos nutrientes pelos animais (Ribeiro et al., 2012). De acordo com a Instrução Normativa nº 13 de novembro de 2004, a qual regulamenta a utilização de aditivos na nutrição animal no país, os aditivos são descritos como “substância”, microrganismos ou produto formulado, adicionados de forma intencional aos

produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, que apresentem ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhorando o desempenho dos animais saudáveis atendendo suas exigências nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano (Instrução Normativa 15/2009/MAPA).

Dos aditivos existentes, os da categoria “aditivos zootécnicos” tem mostrado resultados benéficos expressivos nos estudos realizados, e dentro desta categoria os que mais se destacam são os prebióticos, probióticos e simbióticos. Os prebióticos são substratos de carboidratos, como oligossacarídeos ou fibras alimentares com baixa digestibilidade, que contribuem para a proliferação de bactérias na flora intestinal dos animais, que resulta na melhora na saúde e nas respostas zootécnicas da produção, além de agir intimamente aos probióticos, constituindo assim o “alimento” para bactérias probióticas (Hoseinifar et al., 2014; Mörschbacher et al., 2014).

O prebiótico de maior uso em dietas animais é o mananoligossacarídeo (MOS), que é derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e que possui aproximadamente 40% de β -glucanos, 40% de α -mananos, 28% de proteínas, 7% de lipídeos, 3% de substâncias inorgânicas e 2% de hexosaminas e quitina (Hough, 1990). Geralmente utilizados em dietas para tilápias, sendo recomendada a inclusão em níveis abaixo de 1% nas formulações (Mörschbacher et al., 2014). Os autores também atribuíram sua inclusão nas dietas ao potencial de melhoria da morfologia intestinal e redução dos marcadores de estresse (cortisol).

Os probióticos são microrganismos vivos, geralmente bactérias, mas também leveduras que, quando ingeridos vivos em quantidade suficiente, têm um efeito positivo na saúde, que vai além dos nutricionais comumente conhecidos (Anadon et al., 2006). Isto se dá devido a fácil adesão das bactérias probióticas ao lúmen intestinal, por competição com as bactérias indesejáveis, permitindo o aumento destas bactérias benéficas ao meio, as quais produzem substâncias antimicrobianas que inibem a instalação de patógenos no intestino melhorando a saúde animal e promovendo a absorção de nutrientes (Figura 1). Zaineldin et al. (2018) ao suplementar a dieta de *Pagrus major* com o aditivo *Bacillus subtilis*, nas concentrações de 1×10^4 , 1×10^6 , 1×10^8 e 1×10^{10} obteve resultados benéficos nas variáveis de desempenho zootécnico peso corporal final, ganho em peso e taxa de crescimento específico, assim como permitiu que os animais conseguissem utilizar de forma mais eficiente os nutrientes da ração.

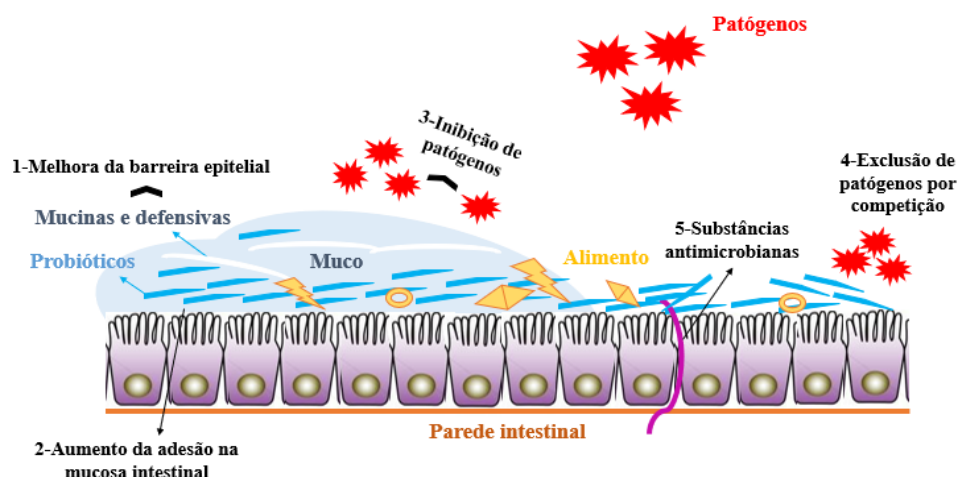


Figura 1- Mecanismo de ação das bactérias probióticas no lúmen intestinal. Fonte: Adaptado de Cunha (2016).

Com a associação de prebióticos e probióticos forma-se outro produto denominado de simbiótico, os quais podem melhorar as taxas de sobrevivência e modulação da microbiota intestinal (Gibson e Roberfroid, 1995). Ao utilizar aditivo simbiótico na dieta animal, permite o aumento das bactérias probióticas no intestino do hospedeiro que por sua vez realiza o controle de bactérias patogênicas, melhorando o sistema imune e aproveitamento dos nutrientes (Rodrigues et al., 2015) (Figura 2). Segundo um estudo executado por Moraes & Jacob (2006), esta mistura pode exercer seus efeitos de forma competitiva com os patógenos, modulando o ambiente intestinal, resposta inflamatória e imunológica.

Estudos recentes relatam que os simbióticos contribuem em maior digestão enzimática pelo hospedeiro, além de aumentar a produção de ácidos acéticos, lático e butírico (produtos de fermentação de bactérias prebióticas e probióticas) e ativação do sistema imunológico inato (Huynh et al., 2017; Ringo e Song, 2016). Ao testar a inclusão de simbióticos ($3,5 \text{ g kg}^{-1}$ de probiótico *Saccharomyces cerevisiae* e $7,5 \text{ g kg}^{-1}$ de prebiótico mananoligossacarídeo) na dieta de *Salmo salar*, Abd et al. (2013), obtiveram resultados significativos na ação protetora na microbiota intestinal sobre as células da mucosa e melhora na resposta inata sem afetar negativamente o crescimento e a utilização dos alimentos da dieta.



Figura 2- Ação das bactérias probióticas e prebióticos no lúmen intestinal. Fonte: Adaptado de EducaPoint (2019).

Nesse contexto, estudos sobre a ação dos aditivos no organismo animal tornam-se necessários, podendo contribuir na elaboração de dietas que atendam às exigências nutricionais das espécies comerciais, aumentando a digestibilidade dos ingredientes, assim como a imunidade.

3 Composição centesimal

As análises de composição centesimal além de serem de grande importância para detalhar os alimentos destinados ao consumo humano, também são de significativa relevância para a nutrição animal, visto que saber o real valor nutricional do alimento fornecido na dieta animal é uma forma de aperfeiçoar a sua eficiência, permitindo assim uma melhor resposta na produção e um maior retorno financeiro ao produtor (Ber-Chielli, 2006).

A carne de peixe é caracterizada por ser uma ótima fonte proteica para dieta humana, sendo o alimento composto por diferentes constituintes químicos como a umidade (água), proteínas, lipídeos, carboidratos, matéria inorgânica e vitaminas, podendo variar os valores destes compostos de acordo com a espécie, sexo, idade e a nutrição (Correa et al., 2016).

O conhecimento da composição centesimal do pescado é de fundamental importância para a padronização dos produtos alimentares de acordo com os critérios nutricionais, além de

fornecer subsídios para decisões de carácter dietético na alimentação humana e na formulação de rações, processamento e conservação do peixe (Simões et al., 2007).

Segundo Colponi et al. (2017), ao realizar a análise centesimal de tilápias-do-Nilo alimentadas com diferentes níveis de proteína e energia digestível encontraram valores de até 28% de proteína, 69% de umidade, 4% de cinzas e 7% de lipídeos, demonstrando ser uma excelente fonte proteica, além de possuir todos os aminoácidos essenciais.

Inicialmente, as dietas fornecidas aos animais eram desenvolvidas apenas para maximizar o crescimento dos peixes, porém, atualmente são formuladas para atender outras necessidades, tais como a sustentabilidade ambiental das criações, o que pode ser atingido pela otimização dos nutrientes da dieta, necessitando assim, um adequado balanço entre a energia e a proteína (McGoogan e Gatlin, 2003). Dito isto, saber a composição da dieta fornecida aos peixes é de vital importância, por afetar diretamente a integridade estrutural do pescado, saúde e funções fisiológicas, tal como na qualidade do pescado, como a cor, aparência, aroma, sabor, valor nutricional e tempo de vida útil, sendo que estes fatores irão interferir diretamente nos preços da carne e a procura do produto pelo consumidor (Cyrino et al., 2010).

4 Integridade intestinal e hepática

O aparelho digestivo consiste em um dos aspectos anatômicos mais estudados, desde o comprimento, arranjo da cavidade peritoneal até a estrutura da mucosa (Menin e Mimura, 1993). Segundo Fugi e Hahn (1991), o intestino é um órgão geralmente tubular, por onde transita o alimento e onde ocorre a digestão alcalina e absorção de nutrientes.

Nos peixes, o intestino possui funções de absorção e digestão de alimentos, portanto, para que se obtenha um bom desenvolvimento da piscicultura deve-se atentar ao conhecimento da biologia da espécie cultivada (Silveira et al., 2009). Nos peixes onívoros por exemplo, a estrutura dos intestinos se caracteriza por ser um tubo simples de tamanho mediano, com comprimento digestório total de 1,5 a 2,5 vezes o tamanho do corpo do animal (Rotta, 2003).

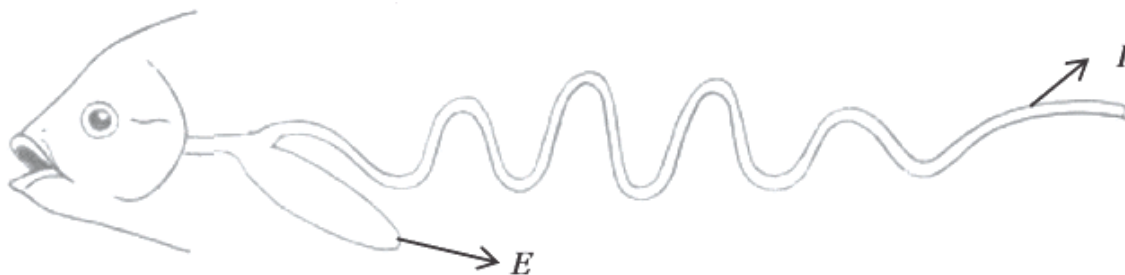


Figura 3- Trato digestório da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), peixe onívoro, com estômago pequeno, ausência de cecos pilóricos e intestino longo. E: estômago, I: intestino. *Morfologia e Fisiologia do Sistema Digestório de Peixes*. Adaptado de Golçalves et al., (2012).

O intestino pode atuar como a primeira barreira contra infecções de patógenos, isto porque há uma comunidade microbiana composta por bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas e/ou obrigatórias, que colaboram para o fortalecimento do sistema imune, além de ser o local que ocorre a maior parte da absorção dos nutrientes, íons e água oriundos da dieta, sendo os produtos da digestão mantidos em solução, o que facilita a absorção (Rawls et al., 2004; Nayak, 2010). Desse modo, análises histológicas para a observação da estrutura deste órgão tão importante para o desempenho animal mostra-se essencial.

Análises das vilosidades podem demonstrar o quanto de nutriente o animal conseguiu absorver do alimento fornecido na dieta. Carvalho et al. (2011), verificaram que o tamanho das vilosidades é maior quando ocorre a suplementação de prebióticos ou probióticos na dieta de tilápias-do-Nilo quando comparado à dieta controle, acarretando em um aumento na área de absorção de nutrientes.

O tecido hepático, atua fortemente sobre o desempenho animal, por possuir funções de assimilar e armazenar nutrientes, produzir a bile, manter a homeostase corporal com o processamento de carboidratos, proteínas, lipídios e vitaminas e também desempenha um papel chave na síntese de proteínas do plasma, como albumina, fibrinogênio e fatores complementares (Genten et al., 2009).

Segundo Hinton e Lauren (1990), o fígado também possui funções de desintoxicar o metabolismo e excreção de substâncias tóxicas do corpo, sendo também um órgão crucial para o metabolismo de nutrientes e indicador de patologias nutricionais (Fujimoto et al., 2008, Rašković et al., 2011). Em casos onde ocorre disfunção hepática causada por infecções por patógenos e alimentação inadequada, pode gerar prejuízos na produção, como redução da taxa de crescimento e em casos mais sérios pode levar o animal à óbito.

Portanto, o conhecimento da morfofisiologia do fígado dos peixes é necessário para a compreensão de alterações neste órgão, seja patológica, relacionadas a doenças infecciosas, sobrecarga ou deficiência de nutrientes nas dietas artificiais, no qual, a histologia, permite-nos avaliar como a análise de integridade hepática (Honorato et al., 2013).

5 Ação enzimática digestiva

Grande parte da digestão e absorção de alimentos nos peixes ocorre em função da ação das enzimas (Rotta, 2003), devido a habilidade do animal em secretar tais enzimas para hidrolisar os polímeros e monômeros presentes nos alimentos, dependendo dos níveis dos nutrientes na dieta ingerida. Como definição, pode-se afirmar que as enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, que atuam como catalisadores biológicos, possibilitando o aumento da velocidade das reações químicas no organismo (Champe e Havey, 1989).

Saber a quantidade e especificidade de cada enzima presente no trato digestório, assim como as condições em que ocorre a hidrólise, pode ser uma ferramenta significativa para entender o processo digestivo dos peixes, bem como a digestibilidade da dieta fornecida a estes animais (Stech et al., 2009), podendo ser alterado de acordo com a espécie estudada.

A secreção destas enzimas está associada a presença de nutrientes no quimo, tais como os monossacarídeos, monoglicerídeos, proteínas desnaturadas, ácidos graxos, peptídeos e aminoácidos, onde há a ação das enzimas como tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidases, amilases, lipases e quitinase que são produzidas pelas células pancreáticas (Silva e Anderson, 1995). As enzimas agem sobre o sistema imune dos peixes, fazendo a primeira linha de defesa do organismo contra possíveis infecções por patógenos, as quais são conhecidas como enzimas antioxidantes. Um exemplo seria a enzima superóxido dismutase (SOD), que desempenha papel antioxidante central e regulação da concentração de O_2^- intramitochondrial (Halliwell e Gutteridge, 2015). Estudos relatam maior quantidade desta enzima quando os animais são expostos a algum ambiente contaminado podendo demonstrar o impacto ambiental sobre o desempenho animal (Van Der Oost et al., 2003).

A análise da enzima catalase (CAT) é utilizada como marcador de estresse oxidativo, de forma a complementar a SOD, pois exerce atuação eficaz na descontaminação celular devido as altas concentrações intracelulares de hidrogênio, decompondo e transformando-o em água e oxigênio molecular (Vasylykiv et al., 2011). Está envolvida diretamente no metabolismo dos ácidos graxos. Sua atividade também se correlaciona com os hábitos alimentares dos peixes, e, diferentemente do que acontece com a SOD, a atividade da CAT tende a ser menor nos

herbívoros do que nos onívoros (Lackner, 1998). Isto posto, a determinação da atividade enzimática é de suma importância para aquicultura para esclarecer problemas nutricionais ocorrentes na fisiologia dos peixes (Hofer e Kock, 1989).

Referências

- Adamante, W.B., Nuñez, A.P.O., Barcellos, L.J.G., Soso, A.B., Finco, J.A., 2008. Stress in *Salminus brasiliensis* fingerlings due to different densities and times of transportation. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 60, 755–761. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000300034>
- Anadon, A., Larrañaga, M.R.M., Martínez, M.A., 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation na safety assessment. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 45 (1), 91-95. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.02.004>
- Araujo, J.A., Silva, J.H.V., Amâncio, A.L.L., Lima, M.R., Lima, C.B., 2007. Uso de aditivos na alimentação de aves. *Acta Veterinária Brasileira*.1(3), 69–77. <https://doi.org/10.21708/avb.2007.1.3.488>
- Boscolo, W. R., Hayashi, C., Soares, C.M., Furuya, W.M., Meurer, F., 2001. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases iniciais e de crescimento. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 30(5), 1391-6. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000600001>
- Boscolo, W.R., Feinden, A. *Industrialização de tilápias*. Toledo: GFM, 172p, 2007.
- Brito, J.M., Ferreira, A.H.C., Santana Junior, H.A., Araripe, M.N.B.A., Lopes, J.B., Duarte, A.R., Cardoso, E.D.S., Rodrigues, L., 2014. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos na Alimentação de Não- Ruminantes. *Revista Eletrônica Nutritime*. 10(4), 3070–3084.
- Carvalho, E.D., Camargo, A.L.S., Zanatta, A.S., 2010. Desempenho produtivo da tilápia-do-nilo em tanques-rede numa represa pública: modelo empírico de classificação. *Ciência Rural*, Santa Maria, 40(7), 1616-1622. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010000700021>
- Champe, P.C., Harvey, R.A., 1989. Enzimas. In: *Bioquímica Ilustrada*, 2 ed. São Paulo: Artes médicas, 446, pp.53-66.
- Chong, A.S.C., Hashim, R., Ali, A.B, 2002. Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using in vivo and in vitro methods. *Aquaculture Nutrition*, 8, 229-238. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2002.00214.x>
- Colponi, L.M.S., Castro, L.E.N., Durães, N.C., Carneiro, W, F., Neto, A.T., Meurer, F., 2017. Valor nutricional do filé e carcaça de tilápias do Nilo alimentadas com rações contendo valores diversos de proteína e energia digestível. *Rev.Bras.Eng.Pesca* 10 (2), 41-52. <https://doi.org/10.18817/repesca.v10i2.1345>

Cyrino, J.E.P., Bicudo, A.J.A., Sado, R.Y., Borghesi, R., Dairiki, J.K., 2010. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 38, 68-87. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300009>

Durmus, M., 2019. Fish oil for human health: omega-3 fatty acid profiles of marine seafood species. *Food Science and Technology*. 39(2), 454-461. <http://dx.doi.org/10.1590/fst.21318>

El-sayed, A.F.M., Kawanna, M., 2008. Optimum water temperature boosts the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in a recycling system. *Aquaculture Research*, Hoboken. 39(6),670-672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01915.x>

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Sustainability in action. Disponível em: <http://www.fao.org/publications/sofia/2020/en/> (Acesso em 10 de agosto de 2021).

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of World Fisheries and Agriculture-Meeting the sustainable development goals. Disponível em: <http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf> (Acesso em 10 de agosto de 2021).

Filipetto, J.E.S., Neto, J.R., Silva, J.H.S., Lazzari, R., Pedron, FA., Veiverberg., 2005. Substituição de fígado bovino por glúten de milho, glúten de trigo e farelo de soja em rações para pós-larvas de piavas (*Leporinus obtusidens*). *Ciência Rural*, Santa Maria, 35(1), 192-197. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000100031>

Fontainhas-Fernandes, A., Gomes, E., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 1999. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia: digestibility and growth performance. *Aquaculture International*, v.7, p.57-67, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1009296818443>

Fracalossi, D.M., Cyrino, J.E.P., 2013. Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. 1ed. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, pp.375.

Fugi, R., Hahn, N.S., 1991. Espectro alimentar e as relações morfológica com o aparelho digestivo de três espécies de peixes comedores de fundo do rio Paraná, Brasil. *Rev. Brasil. Biol.*, 51, (4), 873-879.

Fujimoto, R.Y.C., Moraes, C., Ruas, F., 2008. Análise de efluente e histologia da pele, fígado e rim de Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente. Boletim do Instituto de Pesca. São Paulo: Inst Pesca. 34(1), 117-124.

Genten, F.; Terwinghe, E.; Danguy, A., 2009. Atlas of Fish Histology, Enfield, NH: Science Publishers, 1, 224.

Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. J. Nutr. 125, 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>

Gonçalves, A., 2009. Hematologia e macrófagos policariontes em *Colossoma macropomum*, mantidos em duas densidades de estocagem, alimentados com dieta contendo probiótico e espirulina. 2009. Tese (Doutorado em Aquicultura) –UNESP, Jaboticabal.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015. Free radicals in biology and medicine, 3rd ed. Oxford, Oxford University Press. pp.936. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>

Hayashi, C., Boscolo, W.R., Soares, C.M., Meurer, F., 2002. Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a reversão sexual. Revista Brasileira de Zootecnia. 31(2), 823-828. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000400003>

Hinton, D.E., Lauren, D.J., 1990. Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. In: American Fisheries Society. 8, 51-66.

Hofer, R., Köck, G., 1989. Method for quantitative determination of digestive enzymes in fish larvae. Polish Archives Hydrobiology. 36(4), 439-441.

Honorato C.A., Assano, M., Cruz C., Carneiro D.J., Machado M.R.F., 2013. Histologia do intestino de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo diferentes fontes de proteína. Nucleus Animalium. 5(1), 85-92. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.771>

Honorato, C.A., Almeida, L.C., Moraes, G., 2013. Processamento de dieta – seus efeitos no aproveitamento de carboidrato para peixes. Revista Eletrônica Nutritime 10(5), 2700–2715.

Hoseinifar, S.H., Sharifian, M., Vesaghi, M.J., Khalili, M., Esteban, M.Á., 2014. The effects of dietary xylooligosaccharide on mucosal parameters, intestinal microbiota and morphology and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. Fish Shellfish Immunol. 39, 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.009>

Hough, J.S., 1990. Biotecnologia de la cerveza y de malta. Zaragoza: Acribia.

Huynh, T.G., Shiu, Y.L., Nguyen, T.P., Truong, Q.P., Chen, J.C., Liu, C.H., 2017. Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol.* 64, 367–382. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.035>

IBGE, 2020. Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) 2019: crescimento de todas as atividades englobadas na pesquisa em relação a 2018. Comunicado técnico, ed.30. <http://www.cnabrazil.org.br/> (acessado em 09 de agosto de 2021).

Instrução normativa 15/2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 15, DE 26 DE MAIO DE 2009. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-15-de-26-de-maio-de-2009.pdf> (Acessado em 16 de setembro de 2021)

Iwashita, M.K.P., Moro, G.V., Nakandakare, I.V., 2014. Incorporação de aditivos na ração de peixes. Palmas: Embrapa, 4 p. (Embrapa. Circular Técnica, 1). <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1012845/incorporacao-de-aditivos-na-acao-de-peixes> (Acessado em 16 de setembro de 2021)

Kaushik, S.J.; Covès, D.; Blanc, D., 2004. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, v.230, p. 391-404. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00422-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00422-8)

Kim, K.W., Wang, X., Choi, S.M., Park, G.J., Koo, J.W., Bai, S.C., 2003. No synergistic effects by the dietary supplementation of ascorbic acid, α -tocopheryl acetate and selenium on the growth performance and challenge test of *Edwardsiella tarda* in fingerling Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research*. 34(12), 1055-1058. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00908.x>

Kubitza, F., 2011. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. 2ª ed; Jundiaí: Kubitza.

Kubitza, F., 1999. Nutrição e alimentação de Tilápias. <https://panoramadaaquicultura.com.br/nutricao-e-alimentacao-de-tilapias-parte-1/> (Acesso em 14/09/2021)

Lackner, R., 1998. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E., Streit, B. (eds.) *Fish ecotoxicology*. Basel, Switzerland, Birkhäuser Verlag, pp. 203-224.

Larsson, S.C., Kumlin, M., Sundberg, M.I., Wolk, A., 2004. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms The American journal of clinical nutrition.79(6), 935 – 945. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.6.935>

Masumoto, T., Ruchimat, T., Ito, Y., Hosokawa H., Shimeno, S., 1996. Amino acid availability values for several protein sources for yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). Aquaculture. 146, 109-119. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01364-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01364-6)

Mcgoogan, B.B., Gatlin, D.M., 2003. Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus*: II. Effects of energy level and nutrient density at various feeding rates. Aquaculture, 182, 271- 285.

Mello, H., Moraes, J.R.E., Niza, I.G., Moraes, F.R., Ozório, R.O.A., Shimada, M.T., Filho, J.R.E., Claudiano, G.S., 2013. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de tilápia-do-nilo. Pesq. Vet. Bras. 33(6), 724–730. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600006>

Menin, E., Mimura, O.M., 1993. Anatomia funcional comparativa do intestino de dois peixes Teleostei de água doce de hábito alimentar onívoro. Rev. Ceres v.40, n.231, p. 450-478. <https://locus.ufv.br/handle/123456789/20712/> (acessado em 25/082021).

Meuer, F., Hayash, C., Boscolo, W.R., Soares, C.M.,2002. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus L.*). Revista Brasileira de Zootecnia. 31(2), 566-73.

Morais, M.B., Jacob, C.M.A., 2006. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. J. Pediatr. (Rio. J). 82(5), 189–197. <https://doi.org/10.2223/JPED.1559>

Mörschbacher, E.F., Marengoni, N.G., Albuquerque, D.M., 2014. Mananoligossacarídeo durante a reversão sexual de tilápia do Nilo. Biosci. J. 30(4), 1168–1176.

Nayak, S.K., 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. Aquaculture Research, v.41, 11, 1553–1573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>

Nishioka, A., 2017. Organismos aquáticos exigem ácidos graxos e não lipídios. Nutrição Aquícola. <https://www.aquaculturebrasil.com/coluna/60/organismos-aquaticos-exigem-acidos-graxos-e-nao-lipidios> (Acesso em 02/12/2021).

Oost, R.V.D., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology. 13, p. 57-149, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

Palma, E.H., Takahashi, L.S., Dias, L.T.S., Gimbo, R.Y., Kojima, J.T., Nicodemo, D., 2010. Estratégia alimentar com ciclos de restrição e alimentação no desempenho

produtivo de juvenis de tilápia do Nilo da linhagem GIFT. *Ciência Rural*, Santa Maria. 40(2), 421-426. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010000200026>

Rašković, B.S., Stanković, M.B., Marković, Z.Z., Poleksić V.D., 2011. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *J. Agricult. Sci.* 56(1), 87-100. <https://doi.org/10.2298/JAS1101087R>

Rawls, J.F., Samuel, B.S., Gordon, J.I., 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 101(13), 4596–4601. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400706101>

Ribeiro, P. A. P., Melo, D.C., Costa, L.S., Teixeira, E.A., 2012. Manejo nutricional e alimentar de peixes de água doce. Belo Horizonte: FEPMVZ. 1,89.

Ringø, E., Song, S.K., 2016. Application of dietary supplements (synbiotics and probiotics in combination with plant products and β -glucans) in aquaculture. *Aquac. Nutr.* 22, 4–24. <https://doi.org/10.1111/anu.12349>

Rodrigues, R., Meurer, F., Boscolo, W.R., 2015. Aditivos na nutrição de peixes. *Rev. Colombiana Cienc anim*, 7(2), 228-236.

Rotta, M.A., 2003. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura/Marco Aurélio Rotta. -Corumbá: Embrapa Pantanal. 48. (Documentos/Embrapa Pantanal ISSN 1517-1973; 53). <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/811108/1/DOC53.pdf> (Acessado 8 de janeiro de 2022)

Saad, S.M.I., 2006. Probióticos e Prebióticos: O estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. São Paulo, 42(1), 2-12. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000100002>

Silva, S. S., Anderson, T. A., 1995. *Fish nutrition in aquaculture*, first ed. London: Chapman Hall, pp.319.

Silveira, U.S., Logato, P.V.R., Pontes, E.C., 2009. Fatores estressantes em peixes. *Revista Eletrônica Nutritime*. 6(4), 1001 – 1017.

Souza, F., Dias, I., 2021. Peixe BR da Piscicultura1-140. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2021/> (Acessado em 15/08/2021)

Souza, M.L.R., Marengoni, N.G., Pinto, A.A., Caçador, W.C., 2000. Rendimento do processamento da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): tipos de corte da cabeça em duas categorias de peso. *Acta Scietiarum*. 22(3), 701-706. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v22i0.2926>

Stech, M.R., Carneiro, D.J., Pizauro, J., Martins, J., 2009. Fatores que afetam a produção de enzimas digestivas em peixes eo uso de enzimas exógenas como ferramentas em nutrição de peixes. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde* [en linea], v.XIII, n.2, p.79-93l. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=26015684008/> (acessado em 15/08/2021).

Stone, D.A.J.; Allan, G.L.; Parkinson, S., Rowland, S.J., 2000. Replacement of fish meal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*, III. Digestibility and growth using meat meal products. *Aquaculture*. 186, 311-326. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00381-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00381-6)

Vasylykiv, O.Y., Kubrak, O.I., Storey, K.B., Lushchack, V.I., 2011. Catalase activity as a potencial vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriaze. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 10, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.05.005>

Watanabe, W.O., Losordo, T.M., Fitzsimmons, K., HANLEY, F., 2002. Tilapia production systems in the americas: technological advances, trends, and challenges. *Reviews in fisheries Science*. 10(3), 465-498. <https://doi.org/10.1080/20026491051758>

Zaineldin, A.I., Hegazi, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Bakr, A., El-Kareedy, A.M.S., Dawood, M.A.O., Dossou, S., Wang, W., Yukun, Z., 2018. *Bacillus subtilis* as probiotic candidate for red sea bream: Growth performance, oxidative status and immune response traits. *Fish & Shellfish immunology*, 79, 303-312. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.035>

CAPITULO 2

Prebióticos, probióticos e simbióticos em dietas de juvenis de tilápias-do-Nilo.

O manuscrito foi formatado segundo as normas da Revista Aquaculture.

Qualis capes A2 na área de Zootecnia e Recursos Pesqueiros.

Fator de impacto de 4,242.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inclusão de prebiótico, probiótico e simbiótico na produtividade e nos parâmetros fisiológicos de juvenis de tilápia-do-Nilo. Foram utilizados 300 animais com peso médio inicial de $11,3 \pm 0,32$ g e comprimento médio inicial de $8,5 \pm 0,57$ cm, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em 15 caixas d'água (2000 L), com três repetições em cada tratamento, durante um período de 60 dias. Os peixes foram alimentados com uma dieta comercial de 32% de proteína bruta e adicionados aditivos por meio de banho de óleo (2%), além de uma dieta isenta do aditivo. Os tratamentos foram denominados, Controle (isento de aditivo), PROB (4g.kg^{-1}) composto por um mix de probióticos como *Bacillus subtilis*, PREB MOS (4g.kg^{-1}), SIMB I (2g.kg^{-1} probiótico + 2g.kg^{-1} prebiótico) e SIMB II (4g.kg^{-1} probiótico + 4g.kg^{-1} prebiótico). A inclusão dos aditivos promoveu efeito nos seguintes parâmetros de desempenho produtivo: conversão alimentar, taxa de eficiência proteica diferindo os aditivos apenas do tratamento controle, e para o quociente intestinal o tratamento SIMB II foi o que obteve maior valor deste parâmetro. A composição centesimal não foi alterada pela adição dos aditivos nas dietas, porém os aditivos melhoraram a retenção de proteína, enquanto o tratamento SIMB II apresentou maior índice de glicose plasmática. O desenvolvimento das células hepáticas foi influenciado pela inclusão dos aditivos, sendo altura e largura dos hepatócitos reduzidos, mas a integridade do órgão não diferiu significativamente entre os tratamentos. Não foram verificadas diferenças entre os tratamentos nas histológicas de intestino médio, assim como nas análises enzimáticas do fígado e intestino, apenas a glicose plasmática obteve diferenças significativas dentre os tratamentos em que o SIMB II apresentou maiores níveis de glicose. A análise multivariada demonstrou que o grupo controle se diferenciou totalmente dos demais. O uso dos aditivos MOS e mix de probióticos composto com *Bacillus subtilis* (em concentrações de 5×10^9 UFC), melhorou tanto o desenvolvimento e o estado de saúde de juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*) ao longo do crescimento e recomenda-se o uso da dose SIMB I (2g.kg^{-1} de probiótico + 2g.kg^{-1} MOS).

Palavras-chave: Biotecnologia, bactérias não patogênicas, crescimento, piscicultura

1. Introdução

A elaboração de dietas que permitam um melhor desempenho e aproveitamento dos nutrientes, tem-se tornado essencial para a produção do pescado, devido ao crescimento expressivo no consumo de carne de peixe mundialmente, sendo que a associação de tais tecnologias aplicadas à nutrição animal, como a inclusão de aditivos na dieta animal. Os aditivos atuam diretamente na saúde animal e na eficiência de absorção dos nutrientes, permitindo um maior aproveitamento do alimento, sendo este ponto de suma importância, visto que a alimentação do pescado é o fator de maior impacto econômico para o piscicultor, e por consequência reduzindo o volume de efluentes no meio ambiente (Romulo et al., 2015).

A capacidade dos nutrientes quando associados aos aditivos alimentares como probióticos e prebióticos proporcionam o estímulo na imunidade dos peixes, além de promover melhoria da microbiota intestinal e aumento da atividade de enzimas (digestivas e antioxidantes) (Caipang & Lazado, 2015; Conte, 2004). Nesse sentido, estes aditivos visam aumentar a produtividade do pescado, podendo ser alternativa ao uso dos antibióticos, os quais quando incorporados indevidamente nas rações contribuem para a incidência de bactérias resistentes (Yang et al., 2018).

Os probióticos utilizados na nutrição animal são definidos como microrganismos vivos que produzem efeitos úteis sobre o hospedeiro, modificando os padrões associados ou a comunidade de microrganismos, proporcionando uma melhor absorção dos nutrientes das rações ou aumentando seu valor nutricional e, conseqüentemente, melhorando a resposta do hospedeiro à doença e ainda aumentando a qualidade microbiológica do ambiente exposto (Ibrahim, 2015). As bactérias probióticas *Bacillus subtilis* e *B. cereus* quando inseridos em dietas de peixes resultaram em aumento no crescimento e assimilação de nutrientes, devido melhorar a atividade das enzimas digestivas, além de impulsionar a imunidade dos animais (Li et al., 2021).

Os prebióticos são compostos alimentares não-digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro a partir de estímulo seletivo da proliferação ou atividade de populações de bactérias benéficas, as quais atuam modificando a morfologia intestinal, permitindo uma maior densidade de microvilosidades e redução da exposição a bactérias patogênicas, pois são derivados da parede celular de leveduras, os quais se ligam aos patógenos bloqueando a colonização no intestino e aumentando a capacidade de absorção de nutrientes (Dimitroglou et al., 2010).

O uso combinado de prebióticos e probióticos podem atuar em três padrões: aditividade, sinergismo ou potencialização, o que permite o aumento da ação das bactérias probióticas por meio dos prebióticos, em razão da atribuição deste composto no aumento da atividade das

bactérias probióticas, e no metabolismo de crescimento e ativação destas (Akhter et al., 2015; Meseguer e Cerezuela, 2011).

O tipo de aditivo, assim como a dose de inclusão é um fator chave para efeitos benéficos nos animais hospedeiros. Portanto o objetivo deste estudo foi verificar a ação de prebiótico MOS, mix de probióticos com *Bacillus subtilis* e simbiótico em duas doses, sobre o desempenho de crescimento e parâmetros fisiológicos de juvenis de tilápias-do-Nilo.

2. Material e métodos

Os procedimentos experimentais deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso Animal da Universidade Federal da Grande Dourados (CEUA/UFGD), sob protocolo nº 28/2020.

O experimento foi realizado na Área Aquícola da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), por um período de 60 dias. Foram utilizados 300 peixes, com peso inicial de $11,3 \pm 0,32$ g e comprimento inicial de $8,5 \pm 0,57$ cm, distribuídos em sistema de recirculação de águas verdes, composto por 15 caixas d'água de 2000 litros com aeração constante; estas caixas estavam dispostas em um sistema de decantação e filtros mecânicos e biológicos, e após essa filtragem a água retornava ao sistema, cerca de 10% da água das caixas eram renovadas ao dia.

O desenho experimental foi inteiramente casualizado sendo cinco tratamentos e três repetições ($n = 15$). Os animais foram alimentados com ração comercial extrusada contendo 32% de proteína bruta (Tabela 1) e sobre a ração foi feito a inclusão dos aditivos: PROB = 4g de probiótico (*Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, todos na concentração 5×10^9 UFC/g por kg^{-1} de ração; PREB = 4g de prebiótico (Proteína bruta máx 30%, umidade máx 8%, fibra bruta máx 3%, cinzas máx 6%, carboidratos 55% sendo que desses: 25% é mananoligossacarídeo (MOS) e 30% de β -glucanos) por kg^{-1} de ração; SIMB I = simbiótico ($2\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ probiótico + $2\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ MOS); e, SIMB II = simbiótico ($4\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ de probiótico + $4\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ MOS); além de uma dieta controle (sem inclusão de aditivos).

Os aditivos foram incorporados de forma manual na ração para garantir a sobrevivência das espécies bacterianas (Dias et al., 2012), os quais foram homogeneizados em óleo de soja (2% do peso da ração) e armazenadas sob refrigeração; este procedimento era realizado uma vez por semana. Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia (07h00min, 10h00min, 13h00min e 16h00min) até a saciedade aparente.

Tabela 1. Níveis de garantia da dieta base utilizada para a inclusão de aditivos em ração comercial extrusada para alevinos de tilápia-do-Nilo

Nutriente	Nível de garantia
Umidade (máx)	100 g/Kg
Proteína Bruta (mín)	320 g/Kg
Extrato Etéreo (mín)	40 g/Kg
Matéria Fibrosa (máx)	50 g/Kg
Matéria Mineral (máx)	86,5 g/Kg
Cálcio (máx)	22 g/Kg
Cálcio (mín)	16 g/Kg
Fósforo (mín)	13,5 g/Kg
Sódio (mín)	3,7 g/Kg
Cobalto (máx)	0,20 mg/Kg
Cobre (mín)	10 mg/Kg
Ferro (mín)	50 mg/Kg
Iodo (mín)	1 mg/Kg
Manganês (mín)	70 mg/Kg
Selênio (mín)	0,2 mg/Kg
Zinco (mín)	50 mg/Kg
Vitamina A (mín)	10.000,00 µi/Kg
Vitamina D3 (mín)	3.200,00 µi/Kg
Vitamina E (mín)	12 µi/Kg
Vitamina K3 (mín)	3,4 mg/Kg
Vitamina B1 (mín)	2 mg/Kg
Vitamina B2 (mín)	5 mg/Kg
Vitamina B6 (mín)	6 mg/Kg
Vitamina B12 (mín)	20 mg/Kg
Vitamina C (mín)	250 µg/Kg
Cloreto de colina (mín)	210 mg/Kg
Niacina (mín)	45 mg/Kg
Ácido Fólico (mín)	2 mg/Kg
Ácido Pentatônico (mín)	13 mg/Kg
Biotina (mín)	0,1 mg/Kg

Lisina (mín)	15,5 mg/Kg
Metionina (mín)	1.500,00 mg/Kg
Treonina (mín)	12,4 mg/Kg
Triptofano (mín)	4.000,00 mg/Kg

Composição centesimal determinada em laboratório (%) após a inclusão dos aditivos

	Matéria seca	Matéria mineral	Proteína Bruta	Extrato etéreo
Controle	94,76	8,26	30,76	11,53
Probiótico (4g.kg ⁻¹)	95,84	8,36	28,75	10,19
Prebiótico (4g.kg ⁻¹)	94,59	8,31	28,69	8,68
Simbiótico I (2g.kg ⁻¹ PROB + 2g.kg ⁻¹ MOS)	95,89	8,22	28,76	10,90
Simbiótico II (4g.kg ⁻¹ PROB + 4g.kg ⁻¹ MOS)	96,17	8,24	27,75	8,72

Probiótico: (*Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, todos na concentração 5×10^9 UFC/g). Prebiótico Mananoligossacarídeo (MOS).

Os parâmetros de qualidade de água oxigênio dissolvido, temperatura (Ysi EcoSense DO200A), pH (Medidor de pH/ORP Portátil Impermeável Hanna) e condutividade elétrica (TDS & EC Medidor), foram aferidos uma vez por semana, com potenciômetros digitais portáteis. As médias obtidas das variáveis de qualidade de água foram: temperatura $24,3 \pm 3,76^\circ\text{C}$; oxigênio dissolvido $7,55 \pm 1,53$ mg L⁻¹; pH $7,27 \pm 0,37$ e condutividade elétrica $113,0 \pm 2,0$ $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, mantendo-se dentro do esperado para a espécie durante o experimento (Boyd, 1990; Conama, 2005; Lourenço et al., 1999; New, 1990; Minello et al., 2010; Sandoval et al., 2013).

2.1 Análises zootécnicas e índices somáticos

Após o período experimental, todos os peixes foram capturados e insensibilizados em eugenol na dose de 100 mg.L⁻¹ (Delbon & Ranzani Paiva, 2012) para a realização da biometria final. Posteriormente, foram realizadas as avaliações das variáveis de desempenho produtivo a partir das seguintes fórmulas: sobrevivência (SOB) = (número de animais vivos/total de peixes) x 100; ganho em peso (GP) = peso final (g) – peso inicial (g); conversão alimentar aparente (CAA) = consumo de ração/ganho em peso; taxa de crescimento específico (TCE) = ((ln peso final (g) – ln peso inicial (g))/período experimental) x 100; taxa de eficiência proteica (TEP) = 100 x (ganho em peso (g)/proteína bruta consumida (g)); uniformidade (UNI) = (nº de animais com peso final dentro do intervalo de média \pm desvio padrão/número de peixes sobreviventes em cada unidade experimental) x 100.

Após a biometria, três animais por unidade experimental foram capturados aleatoriamente e retirados uma alíquota de 3 mL de sangue para análises de metabólitos plasmáticos, e posteriormente eutanasiados de acordo com métodos do CONCEA (anestesiados com eugenol na dose de 100 mg.L⁻¹ (Delbon e Ranzani Paiva, 2012) e ao não apresentarem nenhum movimento foram feitos cortes na medula), o que totalizou 9 animais por tratamento. Desses animais foram retirados o fígado, intestino e a gordura visceral para determinar o índice hepatossomático (IHS) = (peso do fígado/peso do peixe) x 100; gordura visceral (GV) = (peso da gordura visceral/peso do peixe) x 100 e quociente intestinal (QI) = comprimento do intestino/comprimento do peixe. Coletou-se ainda amostras de fígado e intestino desses mesmos nove animais por tratamento para a realização de análises enzimáticas as quais foram encaminhadas para o laboratório de Fisiologia Vegetal da UFGD para posteriores análises, assim como os órgãos destinados a histologia. O restante das vísceras e a carcaça foram armazenados e levados ao laboratório para análises centesimais.

2.2 Análises de composição centesimal (peixes e ração)

Para análise bromatológica foram pesados aproximadamente 100 g de peixe inteiro de cada unidade experimental e 20 g de ração por tratamento. A composição centesimal dos animais e das rações seguiu o preconizado pela AOAC (2005) para análises de umidade (pré secagem a 55°C por 72 horas seguida de secagem a 105°C por oito horas), proteínas (método de Kjeldhal), extrato etéreo (extrator de Soxhlet com hexano como solvente), matéria mineral (calcinação das amostras a 550°C por 6 horas), também foi realizada a análise de retenção de proteína de acordo com a seguinte equação: $RT = ((\text{peso corporal final} \times \text{proteína bruta da carcaça ao final experimento}) - (\text{peso corporal inicial} \times \text{proteína bruta da carcaça no início experimento}))/\text{consumo de proteína}$.

2.3 Enzimas plasmática, hepática e intestinal

Na avaliação da atividade enzimática dos peixes do experimento, foram realizadas análises em três animais por unidade experimental. As enzimas hepáticas analisadas foram: albumina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), proteína e enzimas dos metabolismos oxidativo, superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Já para as enzimas digestivas (intestino) foram avaliadas a amilase, lipase e protease.

Antes do início das análises enzimáticas os materiais foram homogeneizados na solução tampão de fosfato de sódio (glicerol v/v em tampão de fosfato de sódio 20 mM e Tris 10 mM – pH 7,0) e uniformizado com o aparelho Potter-Elvehjem. Após este procedimento os materiais foram centrifugados 600 x g por 4°C por oito minutos, onde o sobrenadante foi destinado a

análise enzimática por espectrofotometria (espectrofotômetro semiautomático Bioplus S-200), segundo a metodologia de Reitman e Frankel (1957).

2.4 Enzimas oxidativas

A enzima SOD foi realizada por auto oxidação do pirogalol, que é inibida na presença de SOD (Beutler, 1984). As leituras de absorbância foram realizadas em 420 nm, considerando que 0,1 UI inibe 50% a auto oxidação do pirogalol. A atividade da CAT foi avaliada pela diminuição da absorbância de H₂O₂ a 230 nm (Beutler, 1984). Uma unidade de CAT foi definida como a quantidade de enzima necessária em 1,0 μmol de H₂O₂.min⁻¹ de oxidação, e a absorvidade molar usada foi (H₂O₂) $\epsilon_{\lambda 230} = 0,071 \text{ mM.cm}^{-1}$. A proteína foi determinada com reagente de Bradford contra uma solução padrão de BSA (Kruger, 2009). Concentrações proteicas em extratos brutos enzimáticos foram determinadas conforme Bradford (1976) em 450nm, e 1,0 mg.mL⁻¹ de albumina foi usado como padrão.

2.5 Parâmetros do metabolismo hepático

Para análises do tecido hepático, inicialmente efetuou a homogeneização do material em solução tampão fosfato de sódio glicerol v/v em tampão fosfato de sódio 20 mM e Tris 10 mM - pH 7.0 com um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, encaminhando-os para centrifugação a 6000 g a 4°C por três minutos e o sobrenadante originado eram submetidos novamente a centrifugação a 6000 g a 4°C por oito minutos. Subsequente, o sobrenadante foi coletado para análise enzimática por espectrofotometria (espectrofotômetro semiautomático BIOPLUS S200), em comprimentos de onda adequados para cada teste (Reitman e Frankel 1957). A análise da albumina foi realizada com o uso de kits comerciais (Gold Analisa Diagnóstica®) conforme as instruções do fabricante, e a especificação do método se deu pela leitura em espectrofotômetro, realizado em equipamento semiautomático BioPlus S-200.

2.6 Parâmetros digestivos

Na avaliação da atividade da enzima protease seguiu-se o método de avaliação de acordo com a atividade proteolítica total, sendo avaliada por hidrólise de caseína (Walter, 1984). Para avaliar a atividade da protease no intestino foi empregada a solução tampão Tris-HCL 0,1 M 2,0. A composição da reação da mistura era de: tampão adequado para porção do trato digestório (500 μl) e caseína 1% (500 μl) como substrato de fonte de enzima. Após 60 minutos de incubação a 25°C, a reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (TCA) a 7% e volume final de 1,5 mL, sendo mantida em banho de gelo pelo período de 30 minutos, removendo o precipitado seguido de centrifugação a 14,400 x g durante três minutos e o sobrenadante levado ao espectrofotômetro para leitura do material com comprimento de onda

de 280 nm. Foi utilizada solução de tirosina como padrão e a atividade específica expressa em μmol de tirosina por minuto⁻¹ (U), e expressa em miligrama de proteína⁻¹ (UI).

Na análise da enzima digestiva lipase utilizou-se a metodologia de Albro et al. (1985) seguindo algumas adequações (Ziemniczak, 2021). Para a mistura de reação um volume final de 1,0 mL contendo 0,4 mM de p-nitrofenil miristato (dissolvido em tampão de bicarbonato de amônio 24 mM pH 7,8 mais 0,5% de Triton X-100) ficando incubada por 30 minutos a 25°C. A reação foi interrompida através da adição de NaOH 25mM e transferida para banho de gelo por 15 minutos, posteriormente foi feita a leitura em 405 nm. Uma unidade (1,0 UI) de lipase foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μmol de substrato por minuto (U) e expressa por mg de proteína (UI).

Para atividade amilohidrolítica seguiu-se o protocolo proposto por Bernfeld (1955), em que a mistura de reação continha volume final de 1,5 mL com 1,5% de amido; tampão citrato/fosfato 0,07 M (pH 7,0); 0,028 M de Cl^- como cofator de enzima em uma quantidade ajustada de homogeneizado de tecido, sendo incubada a 25°C por 30 minutos e a reação interrompida pelo acréscimo de 1,0 mL de mistura de ZnSO_4 a 5%: $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,3 N. Após a centrifugação de 3 minutos a 11.000 x g o precipitado gerado foi removido e a concentração de glicose livre foi determinada a 690 nm no sobrenadante (Park e Johnson, 1949). Uma unidade de 1,0 UI de amilase foi estabelecida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de açúcar por minuto e expressa em UI por mg de proteína (UI).

2.7 Análises bioquímicas plasmáticas

Na avaliação bioquímica plasmática, foram separadas amostras de três animais por unidade experimental. A coleta do sangue foi realizada por punção caudal, utilizando seringas descartáveis contendo heparina, o material foi centrifugado a 2500 rpm durante cinco minutos, e posteriormente procedeu-se as análises de glicose plasmática (mg/dl), triglicerídeos (mg/dl), e proteína total (mg/dl), por meio de avaliações colorimétricas, com o auxílio de kits de análise Gold Analisa Diagnostica e um espectrofotômetro (BioPlus S-200).

2.8 Análises histológicas

Para as análises histológicas foram coletados uma fração de intestino médio e uma porção do fígado de três animais por caixa. O processamento histológico dessas amostras foi realizado no Laboratório de Patologia Veterinária da Unigran, conforme métodos de rotina de elaboração de lâminas histológicas. As amostras coletadas foram inseridas em solução de formol 10% para fixação, mantidas por 24 horas e então substituída por solução alcoólica 70%, para serem melhores manuseados.

Logo após, os tecidos foram processados em rotina histológica, organizados em histocassetes e desidratados em série alcoólica crescente de 70%, 80%, 95% e 100%; diafanizados em xilol e infiltrados com parafina liquefeita num processador automático de tecidos. Após infiltração, os tecidos foram emblocados em parafina, seguido da montagem das lâminas histológicas, sendo realizados dois cortes semiseriados por amostra, com cinco micrômetros de espessura, em micrótomo rotativo (Leica 2025).

Após a realização dos cortes, as amostras foram inseridas em banho-maria para eliminar dobras nos tecidos e então coletados em lâminas de vidro. Após aderência dos tecidos às lâminas, estas foram submetidas a coloração em hematoxilina-eosina e a duplicata corada em PAS e analisadas em microscópio óptico (Bancroft e Gamble, 2007).

Para análise os cortes histológicos foram observados em microscópio utilizando objetiva de 10X para intestino e 40X para fígado para capturar os campos de observação. Foi utilizado o sistema de análise de imagens Image Pro-Plus versão 4.5. Posteriormente, fotografados e procedeu-se a histomorfometria e a documentação do material. Para a morfometria do material foram selecionadas seis lâminas por tratamento, no qual, foram fotografadas sete seções para fígado e 25 vilos cada para intestino. Posteriormente foram mensurados o tamanho dos vilos do intestino e células caliciformes, e para fígado foi avaliado o tamanho do hepatócito e o diâmetro do hepatócito e integridade hepática.

2.9 Integridade hepática

Para a análise de integridade hepática avaliou-se as alterações morfológicas qualitativamente por meio do índice de lesões de Bernet et al. (1999), segundo a fórmula: Bernet = Σ fator de importância (w) x escore (α). Foram utilizados três fatores de importância: (1) lesão leve; (2) lesão moderada; e (3) lesão irreversível a qual leva à perda parcial ou total do órgão. Para cada alteração histopatológica avaliou-se através de escores (α) que variaram de 0 a 6, dependendo do grau de alteração, sendo (0) sem alteração; (2) pouca ocorrência; (4) moderada ocorrência; (6) lesão de ocorrência grave. Para determinar as lesões, foi desenvolvida uma tabela própria para o respectivo estudo, indicando as principais lesões histopatológicas encontradas.

2.10 Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e homogeneidade de Levene. Os dados de desempenho zootécnico, composição centesimal e análises enzimáticas foram submetidos à análise de ANOVA, e quando observadas diferenças estatísticas aplicou-se o teste *Tukey* a 5% de significância. O programa estatístico

computacional utilizado foi o R (R Core Team, 2019). Para a análise de integridade hepática os dados foram submetidos de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

Através do mesmo programa, realizou-se a análise de correlação de Pearson para verificar as possíveis correlações entre as variáveis selecionadas (Sokal & Rohlf, 1981) na qual é estabelecido que coeficientes variando entre 1 a 0,7 positivo ou negativo são considerados fortes, 0,3 a 0,7 positivo ou negativo são considerados moderados e 0,3 a 0 positivo ou negativo são considerados fracos.

2.11 Análise multivariada MFA

Diversas variáveis foram mensuradas durante o estudo para avaliar a inclusão dos aditivos na ração, por isso, foi realizada uma análise de (MFA). Para a execução da análise multivariada, considerando que o conjunto de dados contém variáveis quantitativas e qualitativas, foi utilizado uma extensão do método da análise de componentes principais (PCA), denominada Análise Fatorial de Dados Mistos (FAMD), que é dedicada à análise de dados mistos (PAGÈS, 2004).

Os coeficientes de correlação de Pearson entre as medidas de peso final, índice hepatossomático, gordura visceral, quociente intestinal, ganho em peso, conversão alimentar, retenção de proteína, taxa de eficiência proteica, amilase, lipase, protease, triglicerídeos, glicose, altura dos vilos, largura dos vilos, área dos vilos, altura dos hepatócitos, largura dos hepatócitos, e área dos hepatócitos, geraram a matriz de correlação que é o dado primário necessário para geração de componentes principais.

A partir das novas variáveis, conhecidas como componentes principais, que devem explicar a maior variabilidade dos dados foram estudadas as relações entre os tratamentos (Controle, Probiótico, Prebiótico, Simbiótico I e Simbiótico II), com as relacionadas aos resultados: peso final, índice hepatossomático, gordura visceral, quociente intestinal, ganho em peso, conversão alimentar, retenção de proteína, taxa de eficiência proteica, amilase, lipase, protease, triglicerídeos, glicose, altura dos vilos, largura dos vilos, área dos vilos, altura dos hepatócitos, largura dos hepatócitos, e área dos hepatócitos.

3. Resultados

3.1 Desempenho produtivo e índices somáticos

As variáveis PF, CF, SOB, GP, TCE, UNI, IHS e GV não apresentaram diferenças significativas entre os níveis de inclusão de aditivos ($p > 0,05$). Entretanto, a CA, TEP e QI foram afetados positivamente pela inclusão dos aditivos na dieta, diferindo significativamente do tratamento controle ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Desempenho produtivo de juvenis de tilápia-do-Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.

Variáveis	Tratamentos					Valor p
	Controle	PROB (4g.kg ⁻¹)	PREB (4g.kg ⁻¹ MOS)	SIMB I	SIMB II	
PI (g)	11,40±0,47	11,30±0,40	10,80±0,50	11,6±0,27	10,90±0,56	0,27
PF (g)	104,98±6,02	97,74±1,29	101,90±2,78	109,92±6,54	104,11±3,34	0,08
SOB (%)	93,33±2,89	96,67±5,77	100	88,33±7,64	98,33±2,89	0,07
CA	1,67±0,15b	1,20±0,10a	1,15±0,03a	1,22±0,08a	1,15±0,07a	<0,001
GP (g)	93,62±6,12	86,43±1,12	91,06±2,73	98,33±6,30	93,21±3,33	0,08
TCE (% dia ⁻¹)	3,70±0,12	3,59±0,06	3,74±0,08	3,75±0,07	3,76±0,10	0,21
TEP (%)	1,96±0,19a	2,91±0,22b	3,04±0,09b	2,85±0,18b	3,14±0,18b	<0,001
UNI (%)	68,03±9,95	70,93±6,44	66,67±2,89	68,18±6,95	62,81±4,86	0,67
IHS (%)	1,64±0,25	1,77±0,28	1,60±0,14	1,49±0,29	1,66±0,14	0,68
GV (%)	2,27±0,78	2,01±0,36	2,00±0,19	1,90±0,37	2,13±0,46	0,88
QI	6,21±0,26b	6,41±0,23ab	6,56±0,06ab	6,43±0,17ab	6,73±0,06a	0,04

Legenda: PROB = Probiótico 4g.kg⁻¹; PREB = Prebiótico 4g.kg⁻¹; SIMB I = Simbiótico (2g.kg⁻¹ probiótico+2g.kg⁻¹ prebiótico) e SIMB II = Simbiótico (4g.kg⁻¹ probiótico+4g.kg⁻¹ prebiótico). PF = Peso final (g); CF = Comprimento final (cm); SOB = Sobrevivência (%); CA = conversão alimentar; GP = Ganho em peso (g); TCE = Taxa de crescimento específico (% dia⁻¹); TEP = Taxa de eficiência proteica (%); UNI = Uniformidade (%); IHS = índice hepatossomático (%); IGV = Gordura visceral (%); QI = Quociente intestinal.

3.2 Análises de composição centesimal

Não houve alteração dos parâmetros centesimais entre os tratamentos alimentares testados. Entretanto, a retenção de proteínas aumentou significativamente nos animais alimentados com alguma dieta contendo a inclusão dos aditivos (p<0,05) em relação à dieta controle (Tabela 3).

Tabela 3. Composição centesimal de juvenis de tilápia-do-Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.

Composição (%)	Tratamentos					Valor p
	Controle	PROB (4g.kg ⁻¹)	PREB (4g.kg ⁻¹)	SIMB I	SIMB II	
Umidade	75,64±3,11	73,99±1,49	74,73±3,79	73,69±1,07	74,45±0,85	0,87
Proteína	20,37±2,95	19,61±1,39	19,37±2,53	19,89±3,57	19,93±2,07	0,99
Lípido	6,43±2,55	6,86±1,37	7,73±1,14	6,57±0,97	6,75±1,34	0,86
Cinzas	2,60±0,73	2,51±0,40	3,03±0,66	3,01±0,80	2,98±0,98	0,84
RT	38,60±3,06b	54,79±4,52a	56,42±8,15a	61,47±1,89a	64,00±1,66a	0,002

Legenda: PROB = Probiótico 4g.kg⁻¹; PREB = Prebiótico 4g.kg⁻¹; SIMB I = Simbiótico (2g.kg⁻¹ probiótico+2g.kg⁻¹ prebiótico) e SIMB II = Simbiótico (4g.kg⁻¹ probiótico+4g.kg⁻¹ prebiótico). RT= retenção de proteína corporal.

3.3 Enzimas oxidativas

As variáveis enzimáticas oxidativas CAT e SOD, não obtiveram diferenças significativas quando comparados à dieta controle (p>0,05) (Tabela 4).

Tabela 4. Metabólitos de juvenis de tilápias-do-Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.

	Dietas					Valor p
	Controle	PROB (4g.kg ⁻¹)	PREB (4g.kg ⁻¹)	SIMB I	SIMB II	
Enzimas oxidativas mmol/min/mg proteína						
CAT	7,41±1,52	6,24±0,66	7,58±2,08	6,48±0,71	4,21±0,84	0,06
SOD	1,33±0,39	1,61±0,11	1,22±0,40	1,08±0,17	1,34±0,35	0,36

Legenda: PROB = Probiótico 4g.kg⁻¹; PREB = Prebiótico 4g.kg⁻¹; SIMB I = Simbiótico (2g.kg⁻¹ probiótico+2g.kg⁻¹ prebiótico) e SIMB II = Simbiótico (4g.kg⁻¹ probiótico+4g.kg⁻¹ prebiótico). CAT = Catalase; SOD = Superóxido dismutase.

3.4 Parâmetros do metabolismo hepático

Os parâmetros do metabolismo hepáticos ALB, AST e ALT das tilápias-do-Nilo juvenis não foram afetados significativamente pela inclusão dos aditivos na dieta (p>0,05) (Tabela 5).

Tabela 5. Variáveis do metabolismo hepático de juvenis-de-tilápias do Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.

	Dietas					Valor p
	Controle	PROB (4g.kg ⁻¹)	PREB (4g.kg ⁻¹)	SIMB I	SIMB II	
Metabolismo hepático UI/mg proteína						
ALB	4,06±0,56	4,05±1,39	3,41±0,62	4,71±1,86	3,90±1,35	0,79
AST	17,32±6,45	15,12±3,04	18,51±3,29	19,40±8,23	16,09±2,15	0,84
ALT	20,53±5,20	25,19±12,60	20,12±9,35	21,06±12,20	15,88±4,92	0,82

Legenda: PROB = Probiótico 4g.kg⁻¹; PREB = Prebiótico 4g.kg⁻¹; SIMB I = Simbiótico (2g.kg⁻¹ probiótico+2g.kg⁻¹ prebiótico) e SIMB II = Simbiótico (4g.kg⁻¹ probiótico+4g.kg⁻¹ prebiótico). ALB = Albumina; AST = Aspartato aminotransferase; ALT = Alanina aminotransferase.

3.5- Parâmetros digestivos

As enzimas digestivas analisadas neste estudo não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao tratamento controle ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros digestivos de juvenis de tilápias-do-Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.

	Dietas					Valor p
	Controle	PROB (4g.kg ⁻¹)	PREB (4g.kg ⁻¹)	SIMB I	SIMB II	
Enzimas digestivas (UI/mg)						
Amilase	90,50±16,90	78,09±33,20	60,78±29,50	81,71±28,80	77,94±25,10	0,74
Lipase	3,03±1,34	3,31±1,54	2,90±1,18	1,79±1,45	1,81±1,35	0,54
Protease	239,04±30,31	196,83±24,58	241,14±23,95	217,60±37,60	208,79±12,90	0,27

Legenda: PROB = Probiótico 4g.kg⁻¹; PREB = Prebiótico 4g.kg⁻¹; SIMB I = Simbiótico (2g.kg⁻¹ probiótico+2g.kg⁻¹ prebiótico) e SIMB II = Simbiótico (4g.kg⁻¹ probiótico+4g.kg⁻¹ prebiótico).

3.6- Parâmetros bioquímicos

Para os metabólitos plasmáticos avaliados, apenas a glicose obteve diferenças significativas entre as dietas fornecidas às tilápias, em que a dieta contendo probiótico (4g.kg⁻¹ de 5×10⁹ UFC) e dieta com simbiótico II (4g.kg⁻¹ probiótico + 4g.kg⁻¹ prebiótico) apresentaram os maiores níveis de glicose plasmática em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$) como apresentado na tabela 7.

Tabela 7. Metabólitos plasmáticos de juvenis de tilápias-do-Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.

	Dietas					Valor p
	Controle	PROB (4g.kg ⁻¹)	PREB (4g.kg ⁻¹)	SIMB I	SIMB II	
Metabólitos plasmáticos (mg/dl)						
Proteína	3,10±0,78	3,55±1,12	3,92±1,60	5,79±0,26	4,25±1,63	0,14
Triglicerídeo	62,72±16,30	103,26±26,80	108,55±33,95	98,68±39,99	92,51±52,01	0,57
Glicose	67,44±23,20ab	83,80±26,50ab	86,70±7,51ab	49,33±11,01b	111,33±14,70a	0,02

Legenda: PROB = Probiótico 4g.kg⁻¹; PREB = Prebiótico 4g.kg⁻¹; SIMB I = Simbiótico (2g.kg⁻¹ probiótico+2g.kg⁻¹ prebiótico) e SIMB II = Simbiótico (4g.kg⁻¹ probiótico+4g.kg⁻¹ prebiótico).

3.7 Análises histológicas

Nas variáveis histológicas de intestino não foi verificado diferenças significativas dentre o controle e os demais tratamentos com inclusão de aditivos ($p > 0,05$).

Tabela 8. Intestino de juvenis de tilápia-do-Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.

	Dietas					Valor p
	Controle	PROB (4g.kg ⁻¹)	PREB (4g.kg ⁻¹)	SIMB I	SIMB II	
Altura vilo(μm)	203,33±56,60	185,10±22,00	242,42±54,20	214,45±13,60	241,54±88,40	0,65
Largura vilo(μm)	77,69±10,70	63,43±9,96	73,95±1,19	78,83±15,20	67,84±10,00	0,37
Área vilo(μm ²)	14,595,36±2,988	10,980,28±2,835	17,464,84±3,279	17,320,84±3,182	16,878,57±8,765	0,46
Espessura (μm)	42,51±9,66	40,41±6,96	41,50±1,78	42,00±5,63	41,24±8,41	0,99
Células caliciformes(μm)	12,65±2,83	7,97±1,60	12,35±1,44	9,12±0,83	10,90±1,56	0,1

Legenda: PROB = Probiótico 4g.kg⁻¹; PREB = Prebiótico 4g.kg⁻¹; SIMB I = Simbiótico (2g.kg⁻¹ probiótico+2g.kg⁻¹ prebiótico) e SIMB II = Simbiótico (4g.kg⁻¹ probiótico+4g.kg⁻¹ prebiótico).

Apenas as variáveis altura e largura do hepatócito obtiveram diferenças significativas dentre os tratamentos, em que a inclusão dos aditivos diminuiu significativamente estes parâmetros histológicos ($p < 0,05$), como apresentado na tabela 9.

Tabela 9- Fígado de juvenis de tilápia-do-Nilo submetidas a uma alimentação com probiótico, prebiótico e simbióticos.

	Dietas					Valor p
	Controle	PROB (4g.kg ⁻¹)	PREB (4g.kg ⁻¹)	SIMB I	SIMB II	
Altura hepatócito(μm)	8,76±0,21a	7,75±0,22b	7,59±0,15b	7,39±0,41b	8,26±0,54ab	0,003
Largura hepatócito(μm)	8,03±0,08a	7,48±0,05b	7,38±0,07b	7,11±0,15b	7,48±0,41b	0,003
Área hepatócito(μm ²)	52,01±5,32	50,59±4,15	51,18±9,26	47,41±5,03	57,45±3,43	0,38
Número hepatócito	56,33±5,77	60,33±17,00	55,00±5,29	56,83±15,1	52,32±9,71	0,93

Legenda: PROB = Probiótico 4g.kg⁻¹; PREB = Prebiótico 4g.kg⁻¹; SIMB I = Simbiótico (2g.kg⁻¹ probiótico+2g.kg⁻¹ prebiótico) e SIMB II = Simbiótico (4g.kg⁻¹ probiótico+4g.kg⁻¹ prebiótico).

3.8 Integridade hepática

Os dados de integridade hepática deste estudo não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao tratamento controle ($p > 0,05$) (Figura 4).

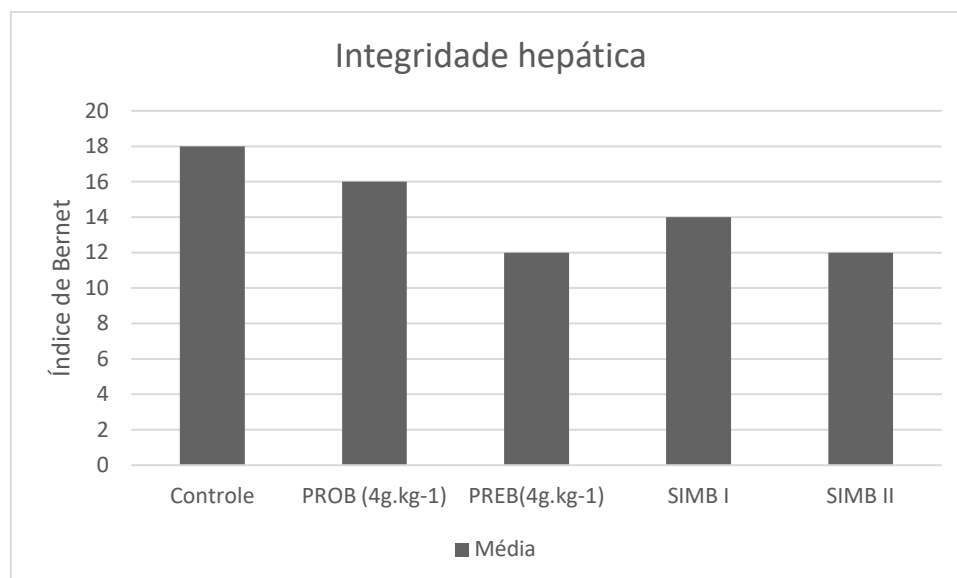


Figura 4.- Índice de lesões histopatológicas de alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), nos tratamentos PROB = Probiótico 4g.kg-1; PREB = Prebiótico 4g.kg-1; SIMB I = Simbiótico (2g.kg-1 probiótico+2g.kg-1 prebiótico) e SIMB II = Simbiótico (4g.kg-1 probiótico+4g.kg-1 prebiótico).

3.9 Correlação de Pearson Desempenho x histologia

Os dados de correlação obtidos das variáveis desempenho e histologia demonstram que há correlação positiva forte entre os fatores PF com GP e TCE e moderada com largura de vilo, sendo atribuída correlação negativa moderada com o parâmetro IHS. No quesito IHS apenas foi obtida uma correlação negativa moderada com GP, e para QI há a correlação forte e positiva com as variáveis RT e TEP e moderada negativa para CA. Observou-se também para o parâmetro GP ocorre uma correlação positiva forte e moderada com as variáveis TCE e largura do vilo.

A CA apresentou correlação forte e negativa com as variáveis RT e TEP e positiva forte e moderada com a largura dos hepatócitos e vilos, respectivamente. Em relação a RT, esta demonstrou possuir uma forte correlação positiva com TEP e moderada negativa com largura e altura de hepatócito, enquanto a TEP obteve correlação negativa moderada com altura de hepatócito. A altura de vilo apresentou correlação forte positiva com a área do vilo e a largura do vilo correlação positiva moderada com área do vilo. Para os dados de hepatócitos, a altura de hepatócito apresentou correlação positiva com a conversão alimentar e negativa com RT e TEP(Tabela9).

Tabela 10-Correlação de Pearson entre as variáveis de desempenho e histológicas

	IHS	GV	QI	GP	CA	TCE	RT	TEP	Altura vilo	Largura vilo	Área vilo	Altura hepatócito	Largura hepatócito	Área hepatócito
PF	-0,54	-0,11	0	1	0,03	0,7	0,1	-0,06	-0,22	0,54	0,07	-0,18	-0,3	-0,24
IHS		0,27	0,16	-0,54	-0,01	-0,41	-0,08	0,07	-0,13	-0,41	-0,27	0,43	0,38	0,55
GV			0,01	-0,09	0,33	0,02	-0,07	-0,23	-0,06	-0,03	-0,12	0,2	0,18	0,37
QI				0,02	-0,63	0,14	0,7	0,7	0,34	-0,21	0,3	-0,18	-0,46	0,22
GP					0	0,75	0,12	-0,03	-0,19	0,55	0,1	-0,18	-0,31	-0,22
CA						-0,22	-0,73	-0,99	-0,03	0,2	0	0,63	0,74	-0,03
TCE							0,2	0,24	0,14	0,45	0,28	-0,14	-0,34	-0,02
RT								0,76	0,17	-0,24	0,1	-0,52	-0,63	0,02
TEP									0,08	-0,26	0,02	-0,57	-0,72	0,13
Alt vilo										0,18	0,91	0,06	0	0,08
Larg vilo											0,53	-0,07	0,06	-0,21
Área vilo												-0,01	-0,05	-0,05
Alt hepatócito													0,89	0,52
Larg hepatócito														0,41

Valores em vermelho são significativos em 5%. Legenda: peso final (PF); índice hepatossomático (IHS); gordura visceral (GV); quociente intestinal (QI); ganho em peso (GP); conversão alimentar (CA); taxa de crescimento específico (TCE); retenção de proteína (RT), taxa de eficiência proteica (TEP).

3.10 Análise Multivariada MFA

De acordo com a análise multivariada MFA, apresentada pela figura 5, é possível verificar que quando analisados 5 dimensões, há uma explicação de 74,2% da variação dos dados. Sendo que a dimensão 1 apresenta a maior explicação.

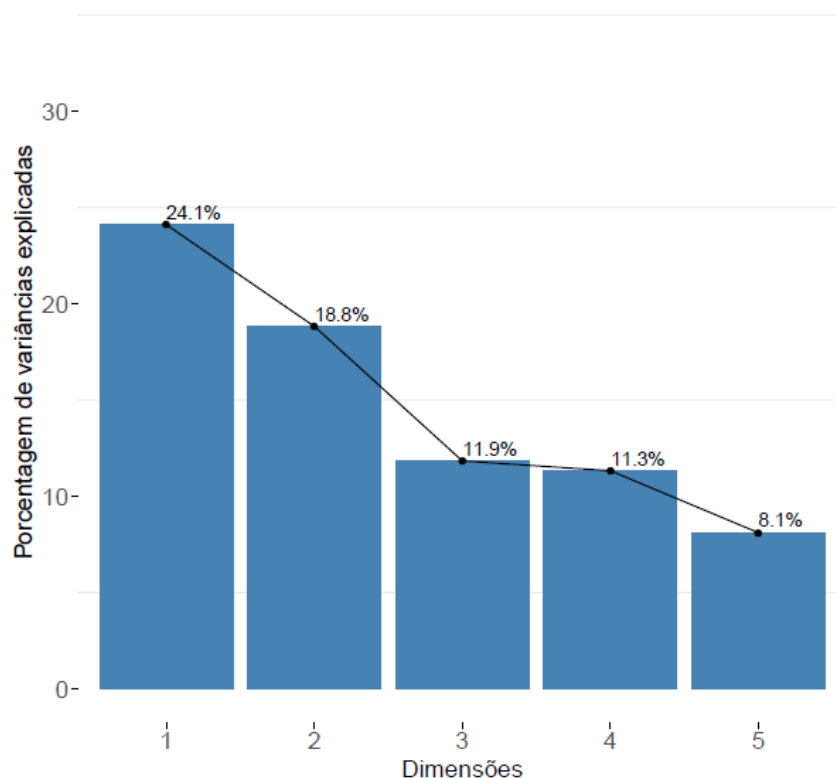


Figura 5. Porcentagem de variâncias dentre as cinco dimensões analisadas.

Os dados apresentados na figura 6 demonstram a qualidade de representação das variáveis, isto é, o quão expressivo foi a interferência de cada parâmetro estudado na variação dentre as dimensões, sendo estas, fortes, moderadas e fracas. É evidente que as maiores implicações estão demonstradas nas dimensões 1 e 2.

Para a dimensão 1 pode-se observar que os parâmetros CA, TEP e largura do hepatócito apresentaram maiores impactos na variância, seguidos de RT e altura de hepatócitos moderados e QI com baixa interferência na variação. Para a dimensão 2, as unidades PF e GP impactam na variância com maior importância, enquanto largura de vilo foi moderada e IHS e TCE baixa.

Na dimensão 3 apenas houve interferência moderada e baixa sendo lipase, triglicérido, altura do vilo e área do vilo respectivamente. Para dimensão 4 apenas os parâmetros altura de vilo, área do vilo, altura de hepatócitos e área de hepatócitos afetaram moderadamente a

variância. Assim como a dimensão 4 a 5 apresentou apenas variações moderadas para amilase, protease e glicose.

Qualidade de representação das variáveis

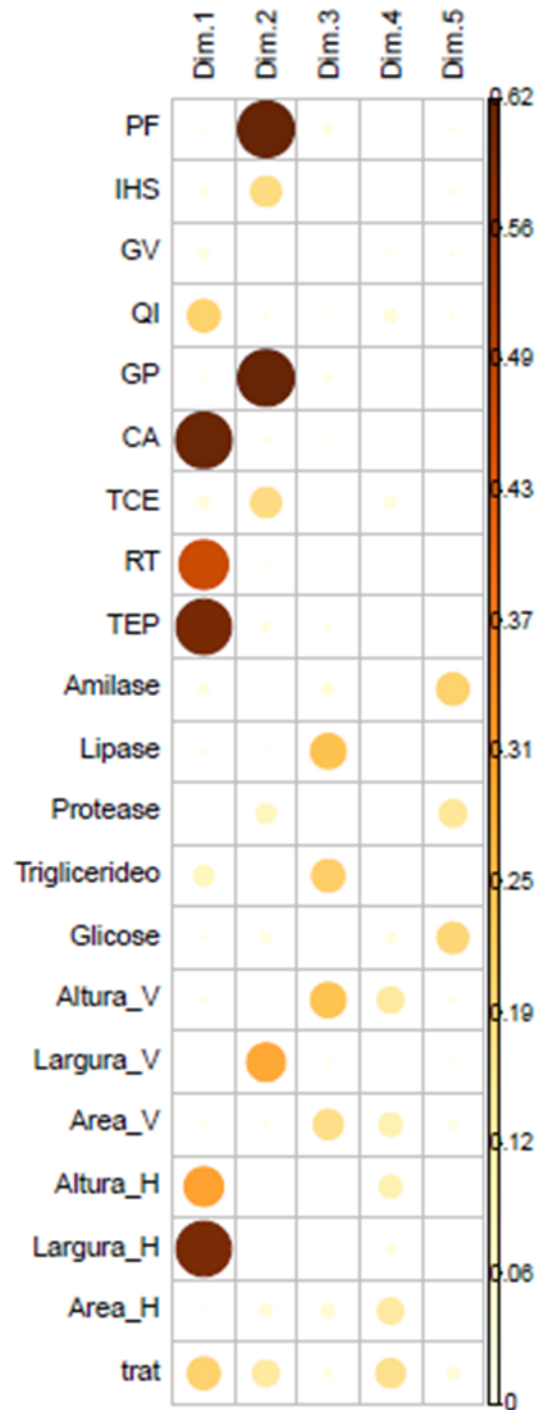


Figura 6. Qualidade de representação das variáveis dentre as cinco dimensões estudadas.

Quando todas as variáveis são analisadas em conjunto, é possível notar os efeitos dos aditivos. Há uma separação nítida entre as unidades experimentais que receberam o tratamento controle (em verde), distribuídas na parte esquerda do gráfico, e das unidades experimentais que receberam algum dos aditivos, agrupadas na parte direita do gráfico (Figura 7).

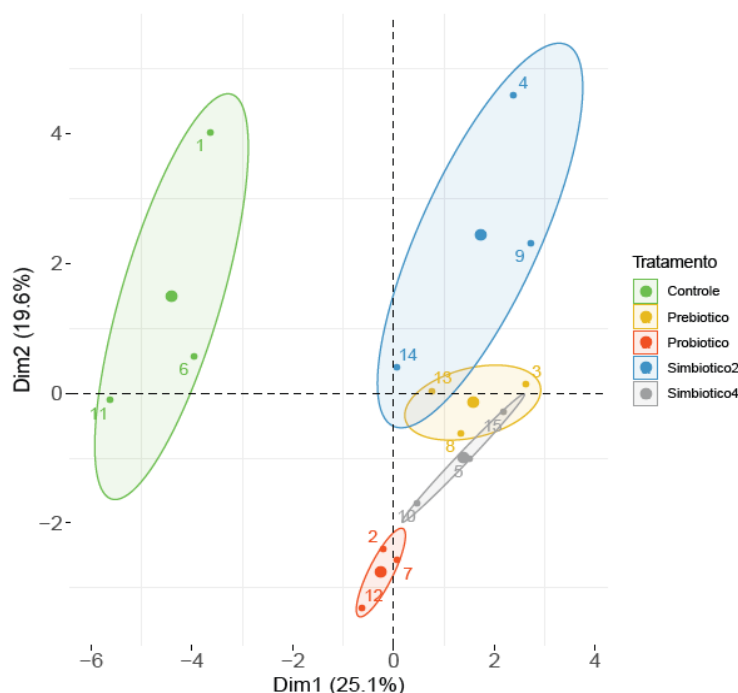


Figura 7. Médias dos valores em cada unidade experimental. Cores em verde referem-se ao tratamento controle (isento de aditivos), cores em amarelo referem-se ao tratamento com inclusão de prebiótico (4g.kg^{-1}), valores em vermelho refere-se ao tratamento com inclusão de probiótico (4g.kg^{-1}), cores em azul referem-se ao grupo de peixes alimentados com simbiótico (2g.kg^{-1} de prebiótico + 2g.kg^{-1} de probiótico), e, cores em cinza referem-se ao grupo de peixes alimentados com simbiótico (4g.kg^{-1} de prebiótico + 4g.kg^{-1} de probiótico).

4. Discussão

4.1. Desempenho produtivo e índices somáticos

Os aditivos zootécnicos têm sido utilizados na dieta animal em diferentes fases de cultivo, como forma de proporcionar melhores índices zootécnicos e saúde animal (El-Asely et al., 2014; Freccia et al., 2016). No presente estudo, as variáveis de CA e TEP dos peixes alimentados com o uso dos aditivos PROB, PREB, SIMB I e SIMB II apresentaram melhoras significativas quando comparados à dieta controle, confirmando a hipótese de que o uso de aditivos na nutrição animal permite um maior aproveitamento do alimento, devido à

proliferação de bactérias benéficas na microbiota intestinal que atuam convertendo a proteína consumida em ganho em peso.

Sankar et al., (2017), afirmam que com a inclusão de *Bacillus* na dieta de tilápias-do-Nilo, ocorre ação a nível celular, onde os microrganismos e suas exoenzimas têm um papel significativo no processo de digestão, aumentando a atividade enzimática total do intestino (Ziaei-Nejad et al., 2006) e estimulando a produção de enzimas endógenas (Wang 2007) que por sua vez podem aumentar a digestibilidade dos alimentos e, conseqüentemente, a utilização de nutrientes, desta forma reduzindo a conversão alimentar e aumentando a taxa de eficiência proteica, resultados também demonstrado no presente estudo.

Segundo estudos de Schwarz et al. (2010) a utilização de MOS na dieta de juvenis de tilápia-do-Nilo resultou em uma maior taxa de eficiência proteica, e a junção dos dois aditivos (*Bacillus subtilis* e MOS) na concentração de 4 g.kg⁻¹ de dieta promoveu ativamente menor conversão e maior taxa de eficiência proteica em *Cirrhinus mrigala* devido a ação sinérgica entre os prebióticos e os probióticos (Kumar et al., 2018), contribuindo para o melhor aproveitamento dos nutrientes e resultando no melhor desempenho zootécnico.

Apesar da adição dos aditivos na nutrição dos juvenis de tilápia-do-Nilo não terem alterado a composição centesimal da carcaça, houve ação benéfica na retenção de proteína da carcaça em relação a dieta controle, validando a hipótese que os aditivos permitem que os peixes utilizem de forma mais eficiente a proteína fornecida na dieta transformando-a em musculo, fato também demonstrado por Cornélio et al. (2013) com a mesma espécie.

Segundo Gatesoupe (1999) e Ziemer & Gibson (1998), os efeitos no desempenho zootécnico (ganho em peso, conversão alimentar, retenção de nutrientes) dos animais que recebem ração suplementada com aditivo podem ser atribuídos à melhoria da atividade digestiva como um todo, por meio do aumento da síntese de vitaminas, cofatores e atividades enzimáticas, o que favorece a digestão, absorção de nutrientes e conseqüentemente o ganho em peso. Podendo ser confirmada tal afirmação com a melhora nas variáveis de desempenho produtivo (CA, TEP e QI), além de demonstrar que a suplementação dos prebióticos, probióticos e simbióticos deste estudo nestas concentrações não causaram impactos negativos na qualidade da carcaça, podendo ser incorporados na nutrição aquícola, visto que a qualidade das carcaças dos peixes implica diretamente na lucratividade.

O quociente intestinal (QI) é um importante aspecto para avaliar a dieta do animal, por ser o resultado da divisão entre o comprimento do intestino e o comprimento padrão do peixe (Zavala-Camin 1996). No presente estudo o maior QI foi obtido no tratamento SIMB II diferindo do tratamento controle, o que pode ser explicado pela intensa atividade das bactérias

benéficas no intestino, permitindo um melhor aproveitamento dos nutrientes e a maior disponibilidade de glicídios, provocando o aumento do comprimento do intestino e na absorção da glicose (Rotta, 2003).

4.2. Enzimas oxidativas

As enzimas antioxidantes também desempenham um importante papel na manutenção da saúde animal, inibindo e/ou reduzindo os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais (Barbosa et al., 2010). A saúde do animal depende principalmente das espécies reativas de oxigênio (ROS), assim como o funcionamento do sistema imunológico (Midhun et al., 2019), sendo que o metabolismo das ROS envolve as enzimas SOD e CAT, que são produzidas como primeira linha de defesa contra os radicais livres e protegem o corpo do estresse oxidativo (Ramos, et al., 2015). Neste estudo não foram evidenciados aumentos das atividades SOD e CAT ao incluir os aditivos probiótico, prebiótico ou simbióticos nas dietas de juvenis de tilápia, confirmando a hipótese os aditivos não causaram toxicidade no organismo animal, evidenciado pela manutenção dos níveis de albumina, ALT e AST. A não diferença nesses parâmetros pode estar relacionada ao aos níveis adequados da dieta, visto que nem o tratamento controle afetou tais parâmetros, sendo estes resultados resposta ao metabolismo nutricional dos peixes.

Os parâmetros enzimáticos também são de suma importância para detectar anormalidades tanto da saúde animal, como para estratégias nutricionais. As enzimas do metabolismo hepático têm sido utilizadas como uma das principais formas de avaliar a saúde animal, pois tanto a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), demonstram os danos teciduais, principalmente no fígado, por ser o principal órgão que sofre efeito das substâncias tóxicas (Montanha, 2012).

Ao suplementar probióticos variados na dieta de alevinos de tilápias-do-Nilo nas concentrações de $5,6 \times 10^8$ UFC g^{-1} de *Saccharomyces cerevisiae* e 1×10^6 UFC g^{-1} de *Bacillus spp*, para avaliar a tolerância e à saúde destes animais sob estresse de transporte, Sutthi et al. (2020) obtiveram resultados significativos quanto aos parâmetros ALT e AST, em que os animais suplementados com os aditivos apresentaram os níveis mais baixos destas enzimas, 24 horas após o transporte, quando comparado a dieta controle. Tais referências confirmam a hipótese que a inclusão das dosagens dos aditivos neste estudo não teve ação hepatóxica, mesmo a dieta simbiótica II que continha a maior dosagem de prebiótico e probióticos, podendo ser utilizados todos os níveis de inclusão com segurança.

4.4 Parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos no sangue são ferramentas úteis, de baixo custo e práticas para avaliar o estado de saúde dos peixes (Martínez-Porchas et al., 2009). A glicose é um carboidrato, utilizado para produzir energia no corpo dos peixes (Ye et al., 2011) e quando encontrado um aumento do teor de glicose na corrente sanguínea indica um maior consumo de energia a uma resposta metabólica mais elevada, além de ser utilizada para determinar o aproveitamento dos nutrientes fornecidos na dieta (Gomes et al., 2005; Simões e Gomes, 2009).

No presente estudo o nível glicêmico dos juvenis de tilápias encontrara-se elevado na dieta contendo simbiótico II (4g.kg⁻¹ de probiótico + 4g.kg⁻¹ de prebiótico), com maior inclusão dos aditivos, estando próximo aos valores encontrados por Abdel-Tawwab et al. (2008) que ao suplementar a dieta de tilápias na dosagem de 0,25 g/Kg de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), obteve o valor de 196,3 ± 9,8 g dL⁻¹ de glicose plasmática, entretanto todos os demais tratamentos ainda se encontram na faixa ideal de homeostase da espécie avaliada que varia de 14,1 a 92,1 g dL⁻¹ (Tavares et al., 2015).

Esse alto valor de glicose pode ser explicado pelo aumento da atividade de bactérias no trato intestinal dos peixes (Martin et al., 2008), permitindo uma maior absorção dos nutrientes e possivelmente a modulação dos genes que agem no metabolismo da glicose (Stancu et al., 2014) e, por consequência, aumentando o nível glicêmico plasmático.

4.5. Análises histológicas

O fígado é o órgão responsável pelo metabolismo dos nutrientes, sendo resposta ao estado nutricional dos peixes, quando encontrado alterações neste órgão, como adaptações, lesão ou morte celular, pode ser resultado de uma dieta desbalanceada e/ou exposição a substâncias químicas (Honorato et al., 2014). Desta forma a análise histomorfométrica dos hepatócitos torna-se uma ferramenta essencial como biomarcador do estado metabólico dos animais (Rodrigues et al., 2017).

A inclusão dos aditivos na dieta dos juvenis de tilápia promoveram uma redução dos parâmetros morfométricos altura e largura dos hepatócitos, em relação à dieta controle, tal fato pode estar relacionado a perda de materiais armazenados no citoplasma, além da alteração da atividade nuclear o que reduz a sobrecarga do fígado durante os processos metabólicos e consequentemente redução dos danos teciduais (Power et al., 2000).

Tais dados confirmam a hipótese que o uso dos aditivos melhorou o estado nutricional dos peixes devido ao papel positivo desempenhado pelos microrganismos no sistema digestivo e melhorando assim a saúde do hospedeiro e atividade hepática.

4.6 Correlação de Pearson desempenho X histologia

A análise de correlação nos permite entender o quanto um fator do desempenho animal está relacionado com os demais parâmetros do organismo animal. No presente estudo uma vasta proporção de correlações foi obtidas, para o peso final a correlação positiva com largura do vilo é benéfica, pois uma maior superfície de absorção dos nutrientes promove uma melhora na TCE e por consequência no GP do animal, não sobrecarregando o fígado o que é confirmado pela correlação negativa com IHS devido ao bom aproveitamento dos nutrientes fornecidos na dieta e, portanto, reduzindo a sobrecarga no fígado, sendo esta hipótese confirmada pela correlação positiva do IHS com área do hepatócito.

No quociente intestinal foi observado correlação forte e positiva com os parâmetros de retenção proteica e taxa de eficiência proteica, demonstrando que nestes animais com intestinos maiores, ocorreu uma melhor utilização da proteína da dieta transformando-a em músculo, visto que o maior comprimento dos intestinos implica em um aumento da área de superfície de absorção dos nutrientes disponíveis na dieta (Caspary, 1992), o que é afirmado na correlação negativa de QI com CA.

A CA é um parâmetro primordial para analisar a eficiência da dieta fornecida aos animais e a utilização dos nutrientes. No presente estudo há uma correlação negativa entre CA com RT e TEP, isto ocorre, pois, o aumento da conversão alimentar leva ao menor aproveitamento dos nutrientes, dessa forma, os animais teriam que consumir mais alimentos para obter o mesmo peso final dos demais peixes que recebiam dietas com aditivos, e isso corresponde em uma sobrecarga no fígado, visto que é um órgão fundamental do metabolismo dos peixes, e essa resposta está de acordo com o verificado na análise de integridade hepática nos peixes do tratamento controle que como constatado, obteve maior grau de alterações, como perda de limite celular e vacualização plasmática, podendo ser confirmada com a correlação positiva com altura e largura dos hepatócitos alterando a morfofisiologia do fígado.

4.7 Análise Multivariada

A análise multivariada MFA permite verificar todos os parâmetros estudados agrupando-os em apenas um produto. Tal análise revelou que há uma separação dentre os grupos estudados, mas principalmente a separação entre o grupo controle e o grupo contendo aditivos.

A separação do grupo controle para os demais ocorre principalmente devido aos parâmetros de qualidade de representação das variáveis, em que a conversão alimentar, taxa de eficiência proteica, retenção e largura dos hepatócitos, têm maior importância na dimensão 1, bem como é justamente onde o grupo controle teve os piores resultados. Dentre o grupo dos aditivos, o tratamento PROB (4g.kg^{-1}), foi o que mais se diferenciou dos aditivos testados, representado pela dimensão dois, o qual apresentou as variáveis PF e GP como as obtiveram maior peso nesta dimensão, seguidos de largura do vilo, IHS e TCE (Figura 6).

O uso dos aditivos na nutrição animal é uma alternativa eficiente e viável para maximização da produção, porém deve se atentar a seleção destes compostos, uma vez que quando utilizados simbióticos, caso ocorra uma combinação ineficiente pode acarretar problemas fisiológicos e na diversidade microbiana (Cerezuela et al., 2013). As características estruturais dos prebióticos devem ser avaliadas de acordo com sua interação com as bactérias probióticas por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo* (Huynh et al., 2017). Neste experimento pode-se afirmar que a inclusão tanto dos aditivos de forma isolada quanto combinadas proporcionou efeitos benéficos na produção o que indica boa interação entre as cepas utilizadas para suplementação.

5. Conclusão

O uso dos aditivos MOS e mix de probióticos composto com *Bacillus subtilis* (em concentrações de 5×10^9 UFC), melhorou tanto o desenvolvimento e o estado de saúde de juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*) ao longo do crescimento e recomenda-se o uso da dose SIMB I (2g.kg^{-1} de probiótico + 2g.kg^{-1} MOS).

6. Considerações finais

Futuros estudos com maior tempo de suplementação são necessários para melhor elucidar seu modo de ação, assim como à viabilidade econômica quanto à utilização destes aditivos poderão auxiliar na melhor definição dos níveis de suplementação em cultivos comerciais para juvenis de tilápia.

Referências bibliográficas

Abdel-Tawwab, M., Abdel-Rahman, A.M., Ismael, N.E.M., 2008. Evaluation of comercial live baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilápia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280 (1-4), 185-189. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.055>

Akhter, N., Wu, B., Memon, A.M., Mohsin, M., 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.038>.

Albro, P.W., Hall, R.D., Corbett, J.T., Schroeder, J., 1985. Activation of nonspecific lipase by bile salts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism.* 835(3), 477-490. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(85\)90117-1](https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90117-1)

AOAC (2005). Official methods of analysis of analyses of the Association Analytical Chemists, 18th ed. Association of Official Analytical Chemist.

Barbosa, K.B.F., Costa, N.M.B., Alfenas, R.C.G., Paula, S.O., Minim, V.P.R., Bressan, J., 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição (Brazilian Journal of Nutrition).* 23(4), 629-643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., & Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22(1), 25–34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>

Bernfeld, P., 1955. Amylase α and β In: Colowick, S. P., Kaplan, N. O (Eds), *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press. 1, 149-158. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01021-5](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5)

Beutler, E.M.D., 1984. *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. third ed. New York: Grune & Stratton.

Boscolo, W.R., Feinden, A., 2013. *Industrialização de tilápias*. Toledo: GFM, 172p, 2007. Brasil. Ministério da Pesca e Aquicultura. Censo aquícola nacional, ano 2008. Brasília: República Federativa do Brasil.

Boyd, C., 1990. *Water quality in ponds for aquaculture*. Alabama: Birmingham, 1º ed., pp.482.

Bradford, M.M., 1976. “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.” *Analytical Biochemistry*.72,248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Caipang, C.M.A., Lazado, C.C., 2015. Nutritional impacts on fish mucosa: Immunostimulants, pre- and probiotics. In: Beck, B.H., Peatman, E. (Eds.), *Mucosal Health in Aquaculture*. Aquaculture. Elsevier Inc. Edition: First, 211–272. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00009-1>.

Caspary, W.F., 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 55 (1), 299-308. <https://doi.org/10.1093/ajcn/55.1.299s>

Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S.T., Meseguer, J., Moriñigo, M.A., Esteban, M.A., 2013. Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1063–1070. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.015>.

Conselho Nacional do Meio Ambiental (CONAMA) - Resolução Nº. 357 de 17 de março de 2005, alterada pela resolução 410 de 2009 e pela resolução 430 de 2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. (Acesso em 17 de setembro de 2021)

Conte, F., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Appl. Anim. Behav. Sci* 86, 205–223. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.003>

Cornélio, F.H.G., Ferreira, E.C., Borga, M.R., Mouriño, J.L.P., Fernandes, V.A.G., Fracalossi, D.M., 2013. Crescimento, digestibilidade e resistência à infecção por patógeno em tilápia-do-nilo alimentada com probióticos. *Pesq. agropec. bras.* 48 (8). <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000800008>

Delbon, M.C.E., Paiva, M.J.T.R., 2012. Eugenol em juvenis de tilápia do Nilo: concentrações e administrações sucessivas. *Boletim do Instituto de Pesca*, 38(1), 43-52.

Dias, D.C., Leonardo, A.F.G., Tachibana, L., Corrêa, C.F., Bordon, I.C.A.C., Romagosa, E., Ranzani-Paiva, M.J.T., 2012. Effect of incorporating probiotics into the diet of matrinxã (*Brycon amazonicus*) breeders. *J. Appl. Ichthyol.* 28, 40–45. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2011.01892.x>.

Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R., Davies, S.J., 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 300(1), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.015>

El-Asely, A. M., Abbass, A. A., Austin, B. 2014. Honey bee pollen improves growth, immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 40(2), 500-506. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.017>

El-sayed, A.F.M., Kawanna, M., 2008. Optimum water temperature boosts the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in a recycling system. *Aquaculture Research*, Hoboken. 39(6),670-672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01915.x>

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Sustainability in action. Disponível em: <http://www.fao.org/publications/sofia/2020/en/> (Acesso em 10 de agosto de 2021).

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of World Fisheries and Agriculture-Meeting the sustainable development goals. Disponível em: <http://www.fao.org/3/I9540EN/i9540en.pdf> (Acesso em 10 de agosto de 2021).

Freccia, A., Meuer, E.S., Filho, J.C., Jerônimo, G.T, Emerenciano, M.G.C. 2016. Farinha de inseto em dietas de alevinos de tilápia. *Archivos de Zootecnia*. 65(252), 541-547. <https://doi.org/10.21071/az.v65i252.1923>

Gatesoupe, F.J. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, v.180, p.147-165, 1999.[https://doi.org/10.1016/S00448486\(99\)001878](https://doi.org/10.1016/S00448486(99)001878)

Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>

Gomes, L.C., Chagas, E.C., Crescêncio, R., Pessoa, M.A., Silva, A.L.F., Carvalho, E.S., Andrade, G.J., Brito, M.V.T., Porto, M.S.A., 2005. Validation of a simple portable instrument for measurement of blood glucose in four amazon fishes. *Journal of Aquaculture in the Tropics*, Nova York, v. 20, n. 2, pág. 101-109. Disponível em: <http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/316860> (Acesso em 10 de agosto de 2021)

Honorato, C.A., Cruz, C.D., Carneiro, D.J., Machado, M.R., Nascimento, C.A., Saturnino, K.C., 2014. Histologia do fígado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dietas contendo silagem biológica de pescado. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(1), 64-68. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014001300012>

Huynh, T.G., Shiu, Y.L., Nguyen, T.P., Truong, Q.P., Chen, J.C., Liu, C.H., 2017. Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in aquaculture: A review. *Fish Shellfish Immunol.* 64, 367–382. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.035>.

Ibrahem, M.D., 2015. Review: Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects the current status in Egypt and recent prospectives. *Journal of Advanced Research*, 6, 765-791. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.004>

Kruger, N.J., 2009. "The Bradford Method For Protein Quantitation." in *The Protein Protocols Handbook*, (3eds), edited by J. Walker. Totowa, NJ: Humana Press. LXX, 1984. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7>

Kumar, P., Jain, K.K., Sardar, P., Jayant, M., Tok, N.C., 2018. Effect of dietary synbiotic on growth performance, body composition, digestive enzyme activity and gut microbiota in *Cirrhinus mrigala* (Ham.) fingerlings. *Aquac. Nutr.* 24, 921–929. <https://doi.org/10.1111/anu.12628>.

Levene, H., 1960. Robust Tests for the equality of variance. In: Olkin, I(Ed.) *Contributions to Probability and Statistics*, Palo Alto, California: Stanford University Press, .278–292.

Lourenço, J.N.P., Malta, J.C.O., SOUZA, F.N., 1999. A importância de monitorar a qualidade da água na piscicultura. *Instruções Técnicas*. n.5. Disponível em: <https://www.embrapa.br> (Acesso em 17 de setembro de 2021).

Martin, F.P.J., Wang, Y., Sprenger, N., Yap, I. K. S., Lundstedt, T., Lek, P., Rezzi, S., Ramadan, Z., Bladeren, P. V., Fay, L. B., Kocchar, S., Lindon, J. C., Holmes, E., Nicholson, J. K., 2008. Probiotic modulation of symbiotic gut microbial–host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Molecular Systems Biology*.4(157), 1–15. <https://doi.org/10.1038/msb4100190>

Martínez, M.P., Martínez, L.R.C., Ramos, R.E., 2009. Cortisol and glucose: Reliable indicators of fish stress?. *Pan Am.J.Aquatic. Sci.* 4(2), 158-178.

Meseguer, J., Cerezuela, R., 2011. Current Knowledge in Synbiotic Use for Fish Aquaculture: A Review. *J. Aquac. Res. Dev.* 1, 1–7. DOI: <https://doi.org/10.4172/2155-9546.S1-008>.

Midhun, S.J., Arun, D., Neethu, S., Vysakh, A., Radhakrishnan, E.K., Jyothis, M., 2019. Administration of probiotic *Paenibacillus polymyxa* HGA4C induces morphometric, enzymatic and gene expression changes in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. 508, 52-59. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.061>

Minello, M.C.S., Paçó, A.L., Caetano, L., Castro, R.S.D., Ferreira, G., Pereira, A.S., Padilha, P.M.; Castro, G.R., 2010. Avaliação sazonal de alguns parâmetros indicadores da qualidade de água no reservatório da usina hidrelétrica de Ilha Solteira-SP, Brasil. *Global*

Science and Technology, 3, 98-104. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/134495>>. (Acesso em 17/09/2021)

Montanha, F.P., Pimpão, C.T., 2012. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes. Rev. Científica Eletrônica Med. Veterinária 9, 58. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2746.1601>

New, M. B., 1990. Freshwater prawn culture: a review. Aquaculture. 88(2), 99-143.

Pagès, J., 2004. Analyse factorielle de données mixtes. Statistique Appliquée, 52(4), 93–111.

Park, J.T., Johnson, M.J., 1949. A sub micro determination of glucose. Journal of Biological Chemistry, 181, 149-151.

Power, D.M., Melo, J., Santos, R. A., 2000. The effect of food deprivation and refeeding on the liver thyroid hormones and transthyretin in sea bream. Journal of Fish Biology, 56, 374–387. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb02112.x>

R Core Team., 2019. R: A language and environment for statistical computing. Austria: R Foundation for Statistical Computing Vienna. URL: <https://www.R-project.org/>

Ramos, M.A., Gonçalves, J.F.M., Batista, S., Costas, B., Pires, M.A., Rema, P., Ozório, R.O.A., 2015. Growth, immune responses and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) supplemented with commercial probiotics. Fish Shellfish Immunol. 45, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.04.001>

Reitman, S., and S. Frankel. 1957. “A Colorimetric Method for the Determination of Serum Glutamic Oxalacetic and Glutamic Pyruvic Transaminases.” American Journal of Clinical Pathology. 28(1),56–63.: <https://doi.org/10.1093/ajcp/28.1.56>

Rodrigues, R.A., Saturnino, K.C., Fernandes, C.E., (2017). Liver histology and histomorphometry in hybrid sorubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* × *Pseudoplatystoma corruscans*) reared on intensive fish farming. Aquaculture Research. 48(9), 5083–5093. <https://doi.org/10.1111/are.13325>

Rodrigues, M.L., Damasceno, D.Z., Gomes, R.L.M., Sosa, B.S., Moro, E.B., Boscolo, W.R., Bittencourt, F., Signor., 2020. Probiotic effects (*Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*) on growth and physiological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Aquaculture Nutrition. 27(2), 454-467. <https://doi.org/10.1111/anu.13198>

Rotta, M.A., 2003. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura/Marco Aurélio Rotta. -Corumbá: Embrapa Pantanal. 48. (Documentos/Embrapa Pantanal ISSN 1517-1973; 53). <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/811108/1/DOC53.pdf> (Acessado 8 de janeiro de 2022)

Sandoval, J.P., Trombeta, T.D., Mattos, B.O., Sallum, W.B., Sorrana, M.R.G. S., 2013. Manual de Criação de Peixes em Tanques-Rede. Brasília: Ed. Codevasf. https://www.pesca.pet/wp-content/uploads/2018/10/Codevasf_2010.pdf (Acessado 8 de agosto de 2021)

Sankar, H., Philip B., Philip R., Singh I.S.B., 2017. Effect of probiotics on digestive enzyme activities and growth of cichlids, *Etilapia suratisensis* (Pearl spot) and *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Aquaculture Nutrition*, 23(4), 852–864. <https://doi.org/10.1111/anu.12452>

Schwarz, K. K., Furuya, W. M., Natali, M.R.M., Gaudezi, M. C., Lima, P. A. G. 2011. Manan oligossacarídeo em dietas para larvas de tilápia. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(12), 2634-2640. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011001200003>

Schwarz, K. K., Furuya, W. M., Natali, M.R.M., Michelato, M., Gaudezi, M. C. 2010. Manan oligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo. *Acta Scientiarum - Animal Sciences*. 32(2), 197-203. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v32i2.7724>

Shapiro, S.S, Francia R., 1972. An approximate analysis of variance test for normality. *J Am Stat Assoc*. 67(337), 215-6. <http://dx.doi.org/10.1080/01621459.1972.10481232>

Simões, L.N., Gomes L.C., 2009. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(3), 613-620. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352009000300014>

Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. *Biometry*. New York: W.H. Freeman. 1981. 859 p.

Stancu, C.S., Sanda, G.M., Deleanu, M., Sima, A.V., 2014. Probiotics determine hypolipidemic and antioxidant effects in hyperlipidemic hamsters. *Molecular Nutrition & Food Research*. 58(3), 559–568. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300224>

Sutthi, N., Thaimuangphol, W., Rodmongkoldee, M., Leelapatra, W., Panase, P., 2018. Growth performances, survival rate, and biochemical parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in water treated with probiotic. *Comp. Clin. Pathol.* 27 (3), 597–603. <https://doi.org/10.1007/s00580-017-2633-x>.

Walter, H.E., 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 5, 270-277.

Wang, Y.B., 2007 Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 269, 259–264. <https://doi.org.ez50.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.aquaculture.2007.05.035>

Yang, S., Du, J., Duan, Y.L., Xiao, Q., Li, N.Q., Lin, Q., Zhao, L.L., Du, Z.J., Zhou, J., Du, J., 2018. Differences in the digestive enzyme activity, intestinal mucosa and microbial community in loach cultivated in two separate environments. *BMC Microbiology*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1237-1>

Ye, J., Liu, X., Wang, Z., Wang, K., 2011. Effect of partial fish meal replacement by soybean meal on the growth performance and biochemical indices of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquac. Int.* 19(1), 143-153. <https://doi-org/10.1007/s10499-010-9348-1>

Zavala-Camin, L., 1996. Introdução ao estudo sobre alimentação natural de peixes. In: EDUEM (Org.) Maringá, 129p.

Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi, A.R. & Shakouri, M., 2006. The effect of *Bacillus spp.* bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252, 516–524. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021>

Ziemer, C.J.; Gibson, G.R., 1988. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, 8, 473-479. [https://doi.org/10.1016/S09586946\(98\)000715](https://doi.org/10.1016/S09586946(98)000715)

Ziemniczak, H.M., 2021. Adsorvente a base de probiótico como protetor hepático para *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas contendo aflatoxina B1. 2015. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.