



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Rosana Oliveira Batista

**Suplementação de lecitina de soja como fonte dietética de fosfolipídios para
tilápia-do-nilo criada em temperatura subótima**

Florianópolis - SC
2023

Rosana Oliveira Batista

**Suplementação de lecitina de soja como fonte dietética de fosfolipídios para
tilápia-do-nilo criada em temperatura subótima**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutora em Aquicultura e Recursos
Pesqueiros.

Orientadora: Profa. Débora Machado Fracalossi, Dra.
Coorientador: Prof. Delano Dias Schleder, Dr.

Florianópolis - SC

2023

Batista, Rosana Oliveira

Suplementação de lecitina de soja como fonte dietética de fosfolipídios para tilápia-do-nilo criada em temperatura subótima /Rosana Oliveira Batista ; orientadora, Débora Machado Fracalossi, coorientador, Delano Dias Schleder, 2023.

90 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Oreochromis niloticus. 3. Fosfolipídios. 4. Dietas de inverno. 5. Lipidômica. I. Fracalossi, Débora Machado. II. Schleder, Delano Dias. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Rosana Oliveira Batista

**Suplementação de lecitina de soja como fonte dietética de fosfolipídios para
tilápia-do-nilo criada em temperatura subótima**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 14 de julho de 2023,
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Débora Machado Fracalossi, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Renata Guimarães Moreira Whitton, Dra.
Universidade de São Paulo

Camila Fernandes Corrêa, Dra.
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

Felipe Nascimento Vieira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de Doutora em Aquicultura.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

Insira neste espaço a
assinatura digital

Profa. Débora Machado Fracalossi, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria José e Francisco de Assis, que
sempre me apoiaram e me deram os melhores exemplos de vida.
Dedico a minha mesma, por nunca desistir e ter a força de buscar e realizar
este sonho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder essa vida e todas as oportunidades possíveis.

À minha mãe, Maria José, por sempre acreditar nos meus sonhos, me apoiar incondicionalmente e ser meu exemplo de mulher guerreira, amorosa, feminista e arretada. Ao meu pai, Francisco de Assis, que mesmo em outro plano de vida é presente todos os dias, me trazendo enorme felicidade ao lembrar de todos nossos momentos e ensinamentos. Vocês me ensinaram o maior valor da vida que é o amor.

Ao meu padrinho, Pe. Reginaldo Mazzon, por me inspirar a sempre buscar conhecimento e ao transmitir suas mensagens com tanto amor e dedicação. Aos demais familiares, meus tios, primos e amigos da família que sempre apoiaram e colaboraram com essa jornada.

A todos os professores que já passaram em minha vida. Em especial, a minha orientadora, Professora Débora Machado Fracalossi, pela orientação e ensinamentos. Ao meu co-orientador, Delano Schleder, por ser sempre tão atencioso e pela enorme colaboração.

Aos demais professores da UAST/UFRPE, universidade a qual me formei Engenheira de Pesca. Mesmo ao longo dos anos estes professores fazem parte da minha vida com sua amizade, apoio e eterna inspiração, em especial aos professores Dario Falcon, José Carlos Pacheco, Renata Akemi, Jacqueline Santos, Francisco Marcante e Ugo Lima.

À toda equipe do LABNUTRI: Renata, Rafael, Jorge, Maria Fernanda, Sônia, Vitória, Virian e Guto, pela troca e ajuda em todas as etapas do doutorado. Aos colegas e amigos do LAPAD, sempre presentes e colaborando com sua ajuda em todos os momentos necessários.

À Kathy, Bianca e Nathalia, amigas e companheiras de trabalho que me ajudaram enormemente durante os experimentos. Aos demais amigos que mesmo longe também se fizeram presente em todos os momentos: Penélope, Bárbara, Maria Izabel, Allana, João Paulo.

À técnica do Laboratório de Biologia Molecular, Martina Blank, por auxiliar nas análises de lipidômica e compartilhar seus conhecimentos e colaboração neste trabalho.

À Pós-Graduação em Aquicultura da UFSC. A todos os funcionários da Pós, em especial ao Carlito, e a todos os professores.

À Alltech® pelo financiamento da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Acredite, pense e faça,
use sua intuição,
transforme sonho em suor,
pensamento em ação.
Enfrente cada batalha
sabendo que a gente falha
e que isso é natural,
cair pra se levantar,
aprender para ensinar
que o bem é maior que o mal.

BESSA, Bráulio.
Poesia que transforma. Rio de Janeiro: Sextante, 2018.

RESUMO

A lecitina de soja (LS) é uma fonte de fosfolipídios, os quais desempenham um papel crucial na determinação da estrutura, fluidez e funcionalidade da membrana celular. O objetivo desta tese foi avaliar a suplementação dietética de LS para tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) criada em temperatura subótima de 22°C, em particular sobre o seu desempenho zootécnico, digestibilidade e metabolismo lipídico, o que culminou na produção de dois artigos. No primeiro artigo da tese, foram avaliados o desempenho zootécnico e a digestibilidade, por meio da realização de dois experimentos. No ensaio de crescimento, os peixes (peso médio inicial de 12,22 g) foram alimentados com as dietas experimentais, contendo níveis crescentes de LS (0, 21, 43 e 64 g kg⁻¹) por 90 dias. Os melhores resultados de ganho em peso e eficiência alimentar ocorreram com a inclusão de 42,2 e 49,8 g kg⁻¹ de LS, respectivamente, níveis estes estimados por meio de regressão quadrática. A composição corporal dos peixes também foi afetada pela suplementação crescente com LS, havendo diminuição dos lipídios corporais totais e dos índices viscerossomático e hepatossomático, porém um aumento dos ácidos graxos polinsaturados no corpo. Após o ensaio de crescimento, foi realizado um ensaio de digestibilidade, utilizando-se apenas dois níveis de suplementação: 0 e 43 g kg⁻¹, sendo as dietas denominadas 0LSD e 43LSD, respectivamente. Este ensaio revelou aumento significativo da digestibilidade de lipídios e ácidos graxos em peixes alimentados com a dieta 43LSD. Portanto, o consumo de nutrientes digestíveis foi maior nos peixes alimentados com a dieta 43SL. No segundo artigo, foram abordadas as alterações no lipidoma do hepatopâncreas dos peixes alimentados com níveis crescentes de LS após o ensaio de crescimento, utilizando-se três técnicas de detecção: cromatografia gasosa (CG), injeção de fluxo direto acoplado à espectrometria de massas (FIA-MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). O hepatopâncreas é um órgão muito importante para o metabolismo lipídico e, por meio da análise de CG, foi possível observar um acúmulo crescente de ácido docosaenoico e, consequentemente, do total de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa. Inversamente, houve diminuição dos ácidos graxos α -linolênico e eicosapentaenoico. Os resultados da lipidômica, determinados por FIA-MS e submetidos à análise estatística multivariada, mostraram uma segregação clara do perfil lipídico nos peixes alimentados com 64LS, em comparação aos demais. Com auxílio da técnica LC-MS/MS foi possível identificar as classes de lipídios que demonstraram padrões distintos em resposta à suplementação com LS. Foram identificados marcadores lipídicos diferenciais nos peixes alimentados com a dieta 43LS, possivelmente relacionados ao melhor desempenho destes no ensaio de crescimento, além de marcadores associados a um excesso de lipídios e LS na dieta, detectados no hepatopâncreas dos peixes alimentados com a dieta 64LS. Portanto, a suplementação de LS, na faixa de 42 a 50 g kg⁻¹ da dieta, pode ser benéfica em dietas de outono/primavera para juvenis de tilápia-do-nylo, pois melhora o crescimento, a digestibilidade lipídica e a composição corporal. Por meio das análises de lipidômica, que permite a avaliação de uma ampla gama de moléculas lipídicas, foi possível investigar profundamente a resposta dos peixes à inclusão de LS e detectar possíveis marcadores lipídicos de crescimento e excesso de lipídios, em condições de temperatura subótima de crescimento.

Palavras-chave Aquicultura, *Oreochromis niloticus*, fosfolipídios, dieta de inverno, lipidômica.

ABSTRACT

Soy lecithin (SL) is a source of phospholipids, which play a crucial role in determining the structure, fluidity and functionality of the cell membrane. The objective of this thesis was to evaluate the dietary supplementation of SL for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at a suboptimal temperature of 22°C, in particular on its zootechnical performance, digestibility and lipid metabolism, which culminated in the production of two articles. In the first article of the thesis, the zootechnical performance and the digestibility were evaluated, through the accomplishment of two experiments. In the growth test, the fish (initial average weight of 12.22 g) were fed with the experimental diets, containing increasing levels of SL (0, 21, 43 and 64 g kg⁻¹) for 90 days. The best results in weight gain and feed efficiency occurred with the inclusion of 42.2 and 49.8 g kg⁻¹ of SL, respectively, levels estimated using quadratic regression. The body composition of fish was also affected by increasing supplementation with SL, with a decrease in total body lipids and viscerosomatic and hepatosomatic indices, but an increase in polyunsaturated fatty acids in the body. After the growth test, a digestibility test was carried out, using only two levels of supplementation: 0 and 43 g kg⁻¹, the diets being called 0SLD and 43SLD, respectively. This trial revealed a significant increase in the digestibility of lipids and fatty acids in fish fed the 43SLD diet. Therefore, the intake of digestible nutrients was higher in fish fed the 43SL diet. In the second article, alterations in the hepatopancreas lipidoma of fish fed with increasing levels of SL after the growth assay were addressed, using three detection techniques: gas chromatography (GC), direct flow injection coupled with mass spectrometry (FIA-MS) and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). The hepatopancreas is a very important organ for lipid metabolism and, through GC analysis, it was possible to observe an increasing accumulation of docosahexaenoic acid and, consequently, of total long-chain polyunsaturated fatty acids. Conversely, there was a decrease in α -linolenic and eicosapentaenoic fatty acids. The results of lipidomics, determined by FIA-MS and submitted to multivariate statistical analysis, showed a clear segregation of the lipid profile in fish fed with 64SL, compared to the others. With the aid of the LC-MS/MS technique, it was possible to identify the lipid classes that showed different patterns in response to SL supplementation. Differential lipid markers were identified in fish fed the 43SL diet, possibly related to their better performance in the growth assay, in addition to markers associated with an excess of lipids and SL in the diet, detected in the hepatopancreas of fish fed the 64SL diet. Therefore, SL supplementation, in the range of 42 to 50 g kg⁻¹ of the diet, can be beneficial in autumn/spring diets for Nile tilapia juveniles, as it improves growth, lipid digestibility and body composition. Through lipidomics analysis, which allows the evaluation of a wide range of lipid molecules, it was possible to deeply investigate the response of fish to the inclusion of SL and to detect possible lipid markers of growth and excess lipids, under conditions of suboptimal growth temperature.

Keywords: Aquaculture, *Oreochromis niloticus*, phospholipids, winter diet, lipidomics.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	CRIAÇÃO DE TILÁPIA EM REGIÕES SUBTROPICAIS	12
1.2	EFEITOS DA TEMPERATURA E NUTRIÇÃO NA ADAPTAÇÃO FISIOLÓGICA DOS PEIXES A BAIXAS TEMPERATURAS	13
1.3	FOSFOLIPÍDIOS EM DIETAS	16
1.3.1	Suplementação de fosfolipídios em dietas para peixes	16
1.3.2	Ingredientes fonte de fosfolipídios.....	18
1.4	ESPECTROMETRIA DE MASSAS BASEADA EM LIPIDÔMICA	19
1.4.1	Lipidômica por injeção de fluxo direito FIA-MS	19
1.4.2	Lipidômica por LC-MS	20
1.5	OBJETIVOS	22
1.5.1	Objetivo geral	22
1.5.2	Objetivos específicos	23
2	ARTIGO 1: SOY LECITHIN SUPPLEMENTATION PROMOTES GROWTH AND INCREASES LIPID DIGESTIBILITY IN GIFT NILE TILAPIA RAISED AT SUBOPTIMAL TEMPERATURE	24
2.1	INTRODUCTION.....	25
2.2	MATERIALS AND METHODS	27
2.2.1	Experimental design and diets	27
2.2.2	Experimental procedures	30
2.2.3	Fish biometrics and sample collection	31
2.2.4	Digestibility trial	31
2.2.5	Chemical analyses	33
2.2.6	Statistical Analysis	34
2.3	RESULTS	34
2.3.1	Growth performance, protein retention, and somatic indices	34
2.3.2	Body and fillet composition	36
2.3.3	Whole-body fatty acid profiles	37
2.3.4	Selected nutrient digestibility and digestible intake	38
2.4	DISCUSSION	40
2.5	CONCLUSIONS	44

	REFERENCES.....	45
3	ARTIGO 2: ANÁLISE DE LIPIDÔMICA REVELA INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM LECITINA DE SOJA NO PERFIL LIPÍDICO DO HEPATOPÂNCREAS DE TILÁPIA-DO-NILO, QUANDO CRIADA EM TEMPERATURA SUBÓTIMA.....	51
3.1	INTRODUÇÃO	52
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.2.1	Planejamento experimental, peixes e dietas	54
3.2.2	Coleta de amostras	55
3.2.3	Análises químicas.....	56
3.2.3.1	<i>Análises lipídicas.....</i>	56
3.2.3.2	<i>Reagentes químicos</i>	57
3.2.3.3	<i>Ácidos graxos por cromatografia gasosa</i>	57
3.2.3.4	<i>Extração dos lipídios para FIA-MS e LC-MS/MS</i>	57
3.2.3.5	<i>Análise de espectrometria de massas</i>	58
3.2.3.6	<i>Instrumentação FIA-MS</i>	58
3.2.3.7	<i>Instrumentação LC-MS/MS.....</i>	59
3.2.3.8	<i>Matriz dos dados.....</i>	60
3.2.3.9	<i>Identificação dos lipídios</i>	61
3.2.4	Análise estatística dos dados	61
3.3	RESULTADOS.....	62
3.3.1	Composição de ácidos graxos no hepatopâncreas.....	62
3.3.2	Perfil lipídico por FIA-MS.....	63
3.3.3	Perfil lipídico por LC-MS/MS	65
3.4	DISCUSSÃO	70
3.5	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS.....	75
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 CRIAÇÃO DE TILÁPIA EM REGIÕES SUBTROPICAIS

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies de maior interesse para aquicultura, sendo a terceira espécie de peixe mais produzida no mundo (FAO, 2022) e a espécie mais produzida no Brasil, que por sua vez, constitui o quarto maior produtor de tilápias do mundo (FAO, 2020). O aumento de 70% na produção de tilápia nos últimos onze anos afetou positivamente a aquicultura global de água doce (FAO, 2022). Este sucesso na produção da espécie está atrelado a suas características de desenvolvimento, tais como crescimento rápido, rusticidade e filé sem espinhos intramusculares, o que facilita o processamento do produto para o consumidor.

A tilápia-do-nilo é uma espécie tropical, que tem como faixa ideal para crescimento a temperatura da água de 26 a 30 °C (AZAZA; DHRAÏEF; KRAÏEM, 2008). Porém, os estados brasileiros que se destacam na produção da tilápia-do-nilo como o Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Santa Catarina (PEIXE-BR, 2022), além de outros países, como China e Índia, estão localizados em latitudes subtropicais, onde ocorrem grandes variações de temperatura entre o verão e inverno. Os peixes, por serem organismos ectotérmicos, têm sua temperatura corporal influenciada pela temperatura da água e, por consequência, sua taxa metabólica, consumo de alimentos e conversão alimentar, o que pode ocasionar uma diminuição do crescimento, bem como altas taxas de mortalidade e consequentes perdas econômicas significativas (MA *et al.*, 2015; MARTINEZ-PALACIOS; CHAREZ-SANCHEZ; ROSS, 1996; PIMOLRAT *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2015).

As baixas temperaturas são uma das maiores limitações para a criação de tilápia em regiões subtropicais, como o sul do Brasil. Em temperaturas subótimas, ou seja, abaixo do ideal, foi registrada redução no consumo alimentar dos animais, quando criados a 22 °C (CORRÊA *et al.*, 2017, 2018), sendo que abaixo de 16–13 °C a alimentação cessa e, abaixo de 9 °C, o movimento voluntário cessa (MA *et al.*, 2015). No estado de Santa Catarina, quarto maior produtor da espécie no Brasil, foi registrada uma variação de temperatura entre 12 e 25 °C entre os meses de abril a novembro em viveiros de peixe (SILVA *et al.*, 2021). No estado de Minas Gerais, onde a produção de tilápia em tanque-rede é bastante difundida, foi registrado uma variação de temperatura de 31 a 22 °C no Reservatório Hidrelétrico de Furnas (ARAÚJO *et al.*,

2017). Visto estes registros de baixas temperaturas que ocorrem regularmente nas regiões subtropicais, se faz presente a necessidade de desenvolver tecnologia para melhorar a produção da tilápia durante os períodos de temperatura subótima. A pesquisa sobre o planejamento de dietas para estes períodos, bem como a seleção de linhagens de tilápia-do-nilo mais tolerantes a temperaturas frias, como exemplo o marcador genético UNH879 foi associado à maior tolerância ao frio para tilápia por Cnaani et al. (2003), e a adoção de práticas de criação sustentáveis, podem melhorar a produção nessas regiões (NOBREGA *et al.*, 2020).

Estudos demonstram que uma adequada nutrição nos períodos mais frios do ano é essencial para sobrevivência e crescimento dos peixes, principalmente por meio do fornecimento de um perfil lipídico adequado na dieta (NOBREGA *et al.*, 2020). As principais alterações fisiológicas que ocorrem nos animais ectotérmicos em temperatura subótima são ligadas ao metabolismo lipídico. Assim, o estudo das alterações fisiológicas e fornecimento de nutrientes essenciais para melhor desempenho dos animais em situações de estresse por baixa temperatura são tópicos importantes para o desenvolvimento da aquicultura em regiões subtropicais.

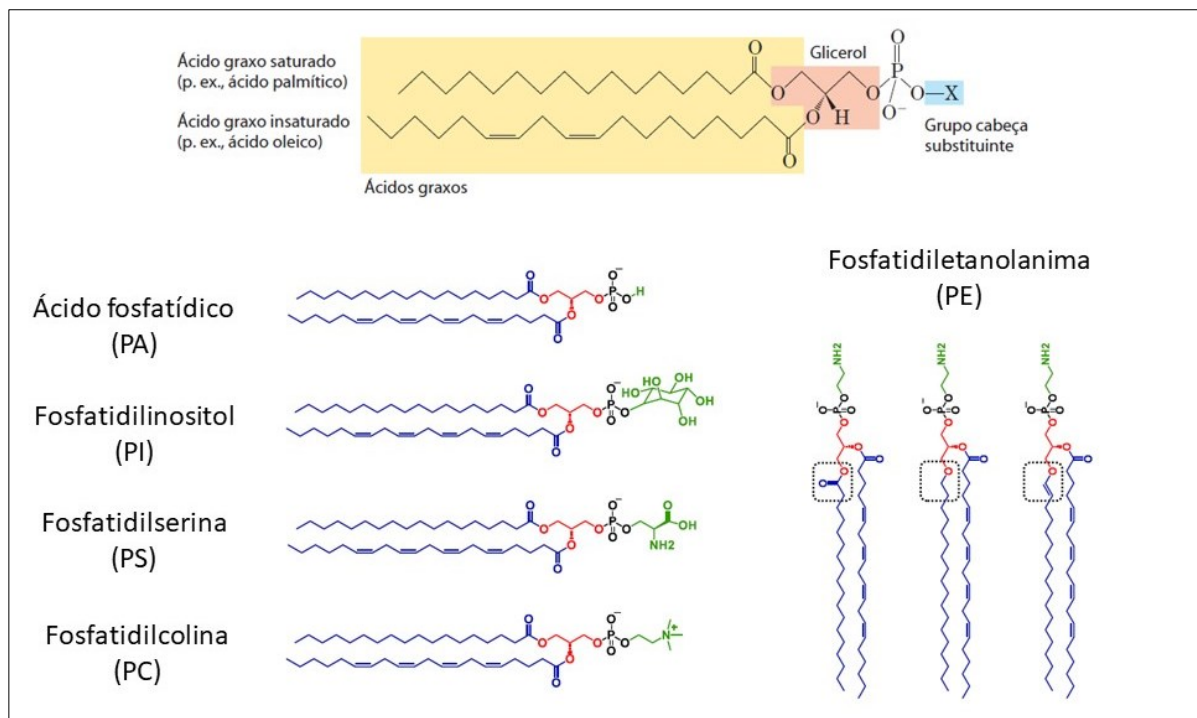
1.2 EFEITOS DA TEMPERATURA E NUTRIÇÃO NA ADAPTAÇÃO FISIOLÓGICA DOS PEIXES A BAIXAS TEMPERATURAS

Uma das principais respostas do metabolismo dos peixes à baixa temperatura está ligado à modificações na composição dos lipídios da membrana celular sob estas condições (TOCHER *et al.*, 2008). A membrana celular é composta por uma mistura complexa de moléculas lipídicas, como fosfolipídios, colesterol, além das proteínas também aí inseridas. Os fosfolipídios são os componentes mais abundantes da membrana biológica e podem ser remodelados para ajustar a fluidez das membranas frente a variações de temperatura. Em sua estrutura bioquímica, a grande maioria dos fosfolipídios são caracterizados como fosfoglicerídios, que possuem uma espinha dorsal comum, o ácido fosfatídico (PA), formado a partir de L-glicerol 3-fosfato, contendo dois ácidos graxos esterificados nas posições 1 e 2 (Figura 1). Variações na composição dos ácidos graxos que compõem os fosfolipídios são particularmente importantes durante o processo de adaptação às mudanças de temperatura em organismos ectotérmicos. Em temperaturas baixas, geralmente há um aumento nas

proporções de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) e ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e uma redução de ácidos graxos saturados (SFA) (LIU *et al.*, 2018; TOCHER, 2003) nos fosfolipídios constituintes da membrana plasmática, em peixes. O aumento dos PUFA mantém o estado líquido-cristal da matriz lipídica, visto que o ponto de fusão destes ácidos graxos é inferior, o permite que a membrana continue funcionando adequadamente (KOSTETSKY; VELANSKY; SANINA, 2013).

Os principais fosfoglicerídios nos animais, incluindo os tecidos de peixes são a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI), formados pela esterificação das "bases" colina, etanolamina, serina e inositol, respectivamente (Figura 1). Quanto aos ácidos graxos, preferencialmente um SFA ou MUFA são esterificados na posição sn-1, enquanto um PUFA é esterificado na posição sn-2 (NELSON & COX, 2014; TOCHER 2008).

Figura 1. Estrutura geral dos fosfolipídios. De acordo com o grupo de cabeça, os fosfolipídios mais presentes nos tecidos animais: em ácido fosfatídico PA, fosfatidilinositol PI, fosfatidilserina PS, fosfatidilcolina PC e fosfatidiletanolamina.



Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2014) e Chaves-Filho (2018).

A remodelação das classes de fosfolipídios também está envolvida na adaptação homeoviscosa das membranas plasmáticas à temperatura. A aclimação ao frio em peixes é associada ao aumento da proporção de PE/PC (HAZEL, 1990).

Este autor ao analisar o tecido hepático da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) aclimatada ao frio, também constataram que a proporção de ácidos graxos insaturados/saturados ligados à PE subiu de 3,50 a 20 °C, para 5,10 a 5 °C, enquanto esta proporção subiu de 1,98 para apenas 3,13 em PC, respectivamente. Portanto, estes autores sugeriram que o acúmulo de PE, com maior concentração de PUFA, pode representar uma adaptação adicional para aumentar o grau de insaturação da membrana em temperaturas reduzidas.

Além disso, a posição sn-2 dos fosfolipídios, que está mais profundamente ligada à bicamada lipídica, tem um impacto maior na fluidez da membrana do que a posição sn-1 (TEETS; DENLINGER, 2013). Ao observar as alterações ocasionadas pela temperatura baixa em insetos, também ectotérmicos, registrou-se maior proporção de PE, com o ácido linoleico (LOA, 18:2 n-6) na posição sn-2 (OVERGAARD et al., 2008). Finalmente, a fluidez da membrana pode ser aumentada por uma reestruturação dos grupos polares da cabeça dos fosfolipídios da membrana; em especial ao grupo ligado a PE (OVERGAARD et al., 2008).

Adicionalmente, além de serem componentes estruturais da membrana plasmática, os fosfolipídios constituem uma reserva de ácidos graxos essenciais, os quais são precursores importantes de vários mediadores biologicamente ativos do metabolismo e fisiologia animal, incluindo eicosanóides, diacilglicerol (DG), fosfatos de inositol e fatores ativadores de plaquetas (THOMASSEN et al., 2017; TOCHER et al., 2008).

De outra forma, o colesterol também é um lipídio importante para definir a fluidez de membrana, pois estas moléculas interagem com fosfolipídios e proteínas dentro da membrana, regulando assim a fluidez, a permeabilidade e as funções proteicas (BLOCH, 1983). A adição de esteróis a uma bicamada fosfolipídica diminui as diferenças entre as fases fluida e gel, consequentemente em temperaturas baixas, os organismos ectotérmicos podem experimentar uma redução do teor de colesterol nas membranas celulares para evitar que essas estruturas se tornem excessivamente rígidas (CROCKE, 1998).

Além da temperatura exercer influência na composição lipídica da membrana dos animais, a alimentação está intrinsecamente ligada a esta composição. Desta forma, a nutrição adequada pode auxiliar na incorporação de PUFA nos fosfolipídios da membrana, auxiliando assim na fluidez em temperaturas subótimas. Estudos mostraram que dietas contendo PUFA da série n-3 melhoraram a tolerância térmica,

o crescimento, a eficiência alimentar e a composição dos ácidos graxos da tilápia-do-nilo, quando criada em temperatura subótima para a espécie (ABDEL-GHANY et al., 2019; BATISTA et al., 2021; CORRÊA et al., 2017, 2018; NOBREGA et al., 2019).

É importante salientar que, quando óleos vegetais ou gorduras animais são adicionados a dietas para aumentar os níveis de PUFA n-3, seus ácidos graxos estão na forma de triacilgliceróis, TG (lipídios neutros). Entretanto, os fosfolipídios (lipídios polares) podem ser fontes de ácidos graxos mais digestíveis que os lipídios neutros para peixes (SARGENT; MCEVOY; BELL, 1997; SARGENT *et al.*, 1999). Quando presentes na dieta, os fosfolipídios promovem a emulsificação lipídica, através da formação de micelas, o que facilita a digestão no intestino do peixe após o consumo. Estas micelas são então absorvidas pelas células do tecido digestivo a partir do lúmen, consistente com a absorção de lipídios na maioria das células animais (SMITH et al., 1983). Porém, apesar do importante papel dos fosfolipídios nas alterações ocorridas na membrana dos peixes a baixas temperaturas, ainda não há estudos que tenham investigado a inclusão de fosfolipídios em dietas para peixes criados em condições de temperatura abaixo do ideal.

1.3 FOSFOLIPÍDIOS EM DIETAS

1.3.1 Suplementação de fosfolipídios em dietas para peixes

Diversos estudos relataram os benefícios da suplementação de fosfolipídios em dietas para peixes criados nas suas respectivas temperaturas ideais, quanto ao crescimento, sobrevivência, absorção e distribuição de lipídios, especialmente para estágios larvais e para carnívoros marinhos, uma vez que estes possuem capacidade limitada de síntese *de novo* de fosfolipídios (CAHU; INFANTE; BARBOSA, 2003; DAPRÀ *et al.*, 2011; GEURDEN; COUTTEAU; SORGELOOS, 1997; KANAZAWA, 1997; ZHAO *et al.*, 2013). A exigência em fosfolipídios entre as diferentes espécies de peixes é muito variada, especialmente entre espécies com diferentes hábitos alimentares e estágios de desenvolvimento (TOCHER *et al.*, 2008).

Para peixes juvenis e adultos, em especial de hábito alimentar onívoro, devido sua maior capacidade de síntese dos fosfolipídios (GEURDEN; COUTTEAU; SORGELOOS, 1997) não é relatada uma exigência rigorosa de fosfolipídios, mas sua inclusão nas dietas pode melhorar o crescimento dos animais. A inclusão de 30 g kg⁻¹

¹ de lecitina de soja, resultou em melhor crescimento, função e saúde intestinal de juvenis de carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*) (9,34 g média do peso inicial) (CHEN *et al.*, 2015), quando criada em temperatura ideal para a espécie de 26 °C. Para tilápia-do-nylo, estudos foram realizados com isoformas de fosfolipídios, como os liso-fosfolipídios, isto é, fosfolipídios com apenas um ácido graxo ligado ao glicerol. Cerca de 0,45 g kg⁻¹ de liso-fosfolipídios dietéticos seriam suficientes para melhorar o desempenho da tilápia-do-nylo (peso inicial médio de 70,30 g), quando criada a temperatura de 26 °C, melhorando a resposta imune inata, digestão e absorção de nutrientes (EL-SAYED; TAMMAM; MAKLED, 2021).

Resultados positivos de crescimento também foram relatados para juvenis de tilápia-do-nylo em temperatura ótima de crescimento com a inclusão dietética de PC purificada (KASPER; BROWN, 2003). PC é uma das classes de fosfolipídios mais abundantes em tecidos de peixes e ingredientes vegetais. A suplementação dietética com 15 g kg⁻¹ de PC aumentou o ganho em peso e a eficiência alimentar de juvenis de tilápia-do-nylo mantidos a 28 °C (KASPER; BROWN, 2003). No entanto, em peixes adultos mantidos entre 28 e 34 °C, a suplementação dietética com PC não afetou o ganho em peso, apesar de aumentar a eficiência alimentar e o conteúdo de PC no hepatopâncreas, enquanto diminuiu o teor de gordura no hepatopâncreas, vísceras e corpo inteiro (TIAN *et al.*, 2018).

Uma tendência para diminuir o acúmulo de lipídios em peixes alimentados com fosfolipídios foi relatada para diferentes espécies de peixes, tais como a corvina amarela (*Larmichthys crocea*) (FENG *et al.*, 2017) e a cabeça-de-cobra híbrida (*Channa argus* × *Channa maculata*) (LIN *et al.*, 2018). Essa diminuição no acúmulo lipídico pode ser explicada devido ao aumento da emulsificação e digestão de lipídios, promovida pelos fosfolipídios ingeridos (KASPER; BROWN, 2003). Neste estudo, foi também registrado um aumento da digestibilidade dos ácidos graxos dietéticos e transporte de lipídios do intestino para outros órgãos do corpo, principalmente por meio da síntese aumentada de lipoproteínas. As lipoproteínas incluem quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL), sendo importantes meios de transporte dos lipídios. Fosfolipídios dietéticos aumentaram a produção de lipoproteínas, conforme relatado em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (OLSEN *et al.*, 2003).

Apesar dos resultados positivos da suplementação dietética com fosfolipídios em dietas para peixes em termos de crescimento, digestibilidade e composição

corporal, como dito anteriormente, nenhum estudo foi realizado avaliando a suplementação de fosfolipídios em dietas para tilápia-do-nilo quando criada em temperatura subótima. Adicionalmente, não foram investigados quais seriam as modificações que a suplementação com tal fonte de lipídios poderiam causar no metabolismo dos animais.

Atualmente, para avaliação da suplementação de um ingrediente ou nutriente, somente os resultados em crescimento não são suficientes. A avaliação de nutrientes e a alimentação de curto prazo (algumas semanas) com rápido ganho em peso, pode se dar devido ao excesso de deposição de lipídios nos órgãos, o que não é um estado fisiológico normal, nem saudável (DU; TURCHINI, 2021). Portanto, é importante aprofundar os estudos em nutrição de peixes, avaliando além dos aspectos de desempenho dos animais, como crescimento e eficiência alimentar, outros parâmetros de bem-estar, tais como a composição de órgãos importantes para o funcionamento do metabolismo, como é o hepatopâncreas.

1.3.2 Ingredientes fonte de fosfolipídios

Atualmente, a lecitina de soja é a principal fonte de fosfolipídios em alimentos para peixes e crustáceos. Devido aos grandes volumes de soja produzidos globalmente, esta é uma forma prontamente disponível de fosfolipídios para dietas de peixes (VAN NIEUWENHUYZEN; TOMÁS, 2008). De acordo com a maioria das definições legislativas, as lecitinas são misturas de fosfolipídios derivados tanto de origem vegetal como animal. A lecitina de produtos animais pode ser derivada do leite ou ovos. Já as lecitinas vegetais, contendo principalmente PC, PE e PI, são derivadas comercialmente de sementes de oleaginosas, como grãos de soja, girassol e canola. Ainda, com base no tipo, as lecitinas podem ser classificadas como: fluido (óleo), sem óleo (lecitina em pó, ou de-oiled) ou modificado (classes de fosfolipídio purificados, como a PC) (VAN NIEUWENHUYZEN; TOMÁS, 2008).

Atualmente, a fonte de fosfolipídio mais utilizada em rações para peixes e crustáceos é a lecitina de soja fluída, extraída do óleo de soja bruto. Seu conteúdo em fosfolipídio e composição em termos de classes de fosfolipídios são variáveis, mas geralmente contém cerca de 50 a 60% de fosfolipídios totais e cerca de 13 a 18% de PC, 10 a 15% de PE, 10 a 15% de PI, e 5 a 12% de PA (VAN NIEUWENHUYZEN; TOMÁS, 2008). A farinha de peixe também é uma importante fonte de fosfolipídios.

Contudo, o uso de derivados da pesca industrial tem se tornado insustentável para a produção aquícola, buscando-se substituir esses ingredientes de origem animal por farinhas e óleos de origem vegetal (TOCHER *et al.*, 2008)

1.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS BASEADA EM LIPIDÔMICA

A lipidômica é um campo de pesquisa que aplica ferramentas e princípios da química analítica para estudar lipidomas, ou seja, uma ampla gama de espécies lipídicas quimicamente distintas em uma célula, um órgão ou um sistema biológico (HAN; YE, 2021). A lipidômica está focada em identificar alterações no metabolismo lipídico e processos de sinalização, mediados por lipídios, que regulam a homeostase celular durante a saúde e a doença de um organismo. O conjunto dessa técnica é especialmente adequado para avaliar as respostas lipídicas às deficiências ou excessos nutricionais e pode fornecer *insights* sobre as alterações fisiológicas para auxiliar no desenvolvimento de regimes de alimentação otimizados (ALFARO; YOUNG, 2018). Atualmente, a pesquisa em lipidômica e nutrição na aquicultura é um campo emergente, e ainda poucos estudos uniram essa técnica para avaliar a inclusão dietética de ingredientes/nutrientes em organismos aquáticos.

As abordagens de lipidômica são geralmente classificadas em dois tipos: lipidômica baseada em injeção de fluxo direto acoplada à espectrometria de massas (*flow injection analysis-mass spectrometry*, FIA-MS), e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (*liquid chromatography mass spectrometry*, LC-MS), dependendo se um dispositivo de separação baseado em cromatografia é acoplado a um espectrômetro de massa ou não.

1.4.1 Lipidômica por injeção de fluxo direto FIA-MS

Na lipidômica por FIA-MS, os extratos ou frações lipídicas brutas são infundidos diretamente no espectrômetro de massas sem qualquer separação cromatográfica prévia. É empregada para a caracterização de uma ampla gama de espécies lipídicas, sejam classes, subclasses ou espécies lipídicas individuais, diretamente das amostras biológicas (WU *et al.*, 2021). A lipidômica FIA-MS foi desenvolvida logo após a espectrometria de massa com ionização por *eletrospray* (ESI-MS) ser aplicada para análise de lipídios. ESI é uma técnica de ionização suave

que gera fragmentação mínima e seletiva da fonte de íons sob condições de análises ideais (HAN; GROSS, 2005). As plataformas desenvolvidas com base em FIA-MS-ESI também foram nomeadas como “*shotgun* lipidômica” por Han e Gross, principais desenvolvedores da técnica (HAN; GROSS, 2003).

Uma grande vantagem da lipidômica *shotgun* é que o espectro de massa é adquirido em uma concentração constante da solução durante a infusão direta, permitindo uma grande possibilidade de interpretação dos dados. Embora os métodos por FIA-MS não sejam tão sensíveis e específicos como métodos com separação por coluna, geralmente são mais baratos, mais rápidos e/ou demandam menos preparação de amostra (DUNN; ELLIS, 2005; SILVA *et al.*, 2014; YEO; PARRISH, 2021).

Esta técnica pode ser utilizada para avaliar alterações gerais no lipoma, assim como para identificação e quantificação (relativa) de classes lipídicas, através de várias estratégias de fragmentação, como modos de varredura de íon precursor, íon de produção e perda neutra e monitoramento de reação selecionada (YEO; PARRISH, 2021). Contudo, para identificação de espécies individuais de lipídios, a *shotgun* lipidômica possui limitações, pois pode gerar a interrupção na análise quantitativa de certas moléculas devido à sobreposição de isótopos (YEO; PARRISH, 2021). Para obter melhorias nessa particularidade, padrões de fragmentos discrepantes dos isótopos são alcançados por meio de estratégias especiais, como derivatização química e uso de instrumentações mais robustas (HU; DUAN; HAN, 2020).

A lipidômica por FIA-MS foi utilizada como uma análise rápida para 1) identificar fosfolipídios em resíduos pesqueiros com potencial na diferenciação de espécies (SHEN *et al.*, 2012); 2) para identificação dos lipidomas em resíduos de peixes de água doce e crustáceos para possíveis fins alimentícios (LV *et al.*, 2022) e 3) para identificação e quantificação de fosfolipídios e eicosanóides no tecido muscular do salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) (YEO; PARRISH, 2021).

1.4.2 Lipidômica por LC-MS

A análise de lipidômica baseada em LC-MS tipicamente começa com a extração dos lipídios da amostra biológica, geralmente por metodologias de extração conhecidas, tais como Folch (1957) e Bligh e Dyer (1959), seguida pela separação por cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*). Uma vez separadas

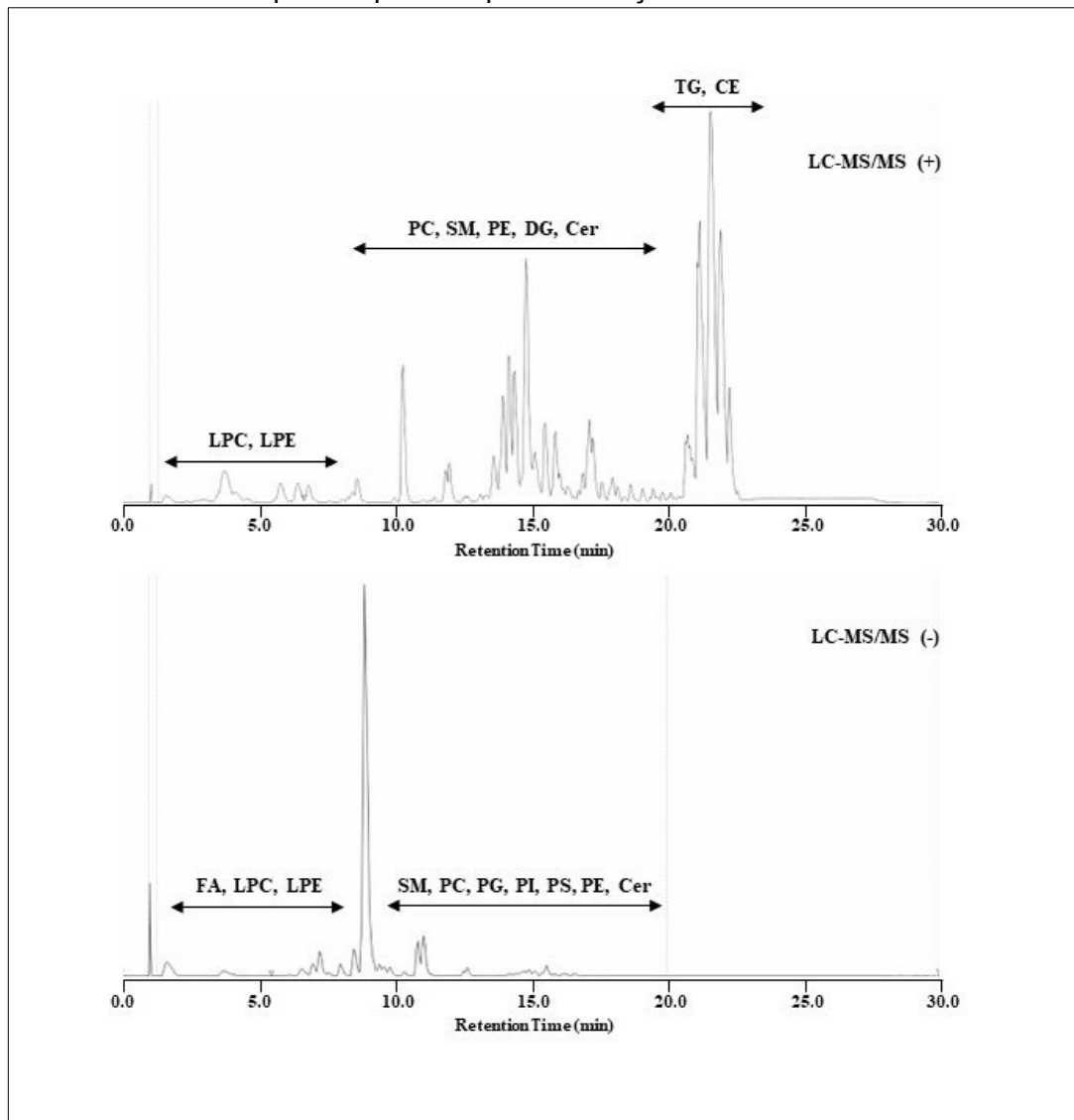
cromatograficamente, as moléculas entram na fonte de íons (geralmente ESI), onde sofrem ionização seguida da detecção de íons particulares, com o auxílio de um analisador de massa (MS). Isso pode ser conduzido de forma não direcionada (aquisição completa de espectros), específica de classe (varredura de íons de produto, varredura de íons precursores ou varredura de perda neutra) ou direcionada (monitoramento de reações múltiplas, MS/MS) (CAJKA; FIEHN, 2014).

Em comparação com a técnica por FIA-MS, a lipidômica por LC-MS é capaz de separar lipídios isótopos à medida que são eluídos e infundidos no espectrômetro de massa, em tempos diferentes. Além disso, o uso de LC oferece a possibilidade de separar ou concentrar diferentes classes de compostos de acordo com suas propriedades físico-químicas (Figura 2) (HU *et al.*, 2009).

Adicionalmente, os efeitos de supressão de íons também são reduzidos devido à diminuição de íons concorrentes na câmara da fonte de íons, aumentando a sensibilidade de detecção de espécies lipídicas em níveis de traço (WU *et al.*, 2021). No entanto, todos esses benefícios são alcançados à custa de um tempo de análise mais longo. Por fim, o tratamento dos dados da LC-MS representa uma fase pós-aquisição, que é focada na identificação e (semi) quantificação dos lipídios detectados, seguida de análise estatística, se o foco principal do estudo for distinguir grupos de amostras (FENAILLE *et al.*, 2017).

O conjunto das análises de lipidômica abordadas, tanto por LC-MS como por FIA-MS são de extrema utilidade para as pesquisas em nutrição. Fornecem informações importantes e completas sobre as alterações fisiológicas mediadas por lipídios no metabolismo dos animais, quando criados em condições ambientais estressantes, como a baixa temperatura, sob diferentes fontes dietéticas.

Figura 2. Cromatogramas LC-MS/MS-ESI (+/-) do extrato lipídico do hepatopâncreas de tilápia-do-nilo alimentada com lecitina de soja. Demonstração da separação das classes lipídicas pelo tempo de retenção da análise.



Fonte: Elaborado pela autora.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Aprimorar a tecnologia de produção da tilápia-do-nilo em regiões de clima subtropical por meio do desenvolvimento de dietas contendo lecitina de soja, uma fonte de fosfolípidios.

1.5.2 Objetivos específicos

Avaliar se a suplementação de lecitina de soja em dietas para tilápia-do-nilo criadas em temperatura subótima de 22 °C melhorará seu desempenho zootécnico.

Avaliar a digestibilidade dos nutrientes das dietas contendo lecitina de soja em juvenis de tilápia-do-nilo criados em temperatura subótima de 22 °C.

Verificar a influência da adição de diferentes níveis de lecitina de soja em dietas de inverno sobre a composição corporal e nos índices corporais (viscerossomático e hepatossômico) de tilápias-do-nilo criadas em temperatura subótima de 22 °C.

Analisar os impactos dos diferentes níveis de suplementação de lecitina de soja para tilápia-do-nilo criada em temperatura subótima de 22 °C no lipidoma do hepatopâncreas, e identificar possíveis marcadores biológicos associados as respostas fisiológicas de desempenho.

2 ARTIGO 1: SOY LECITHIN SUPPLEMENTATION PROMOTES GROWTH AND INCREASES LIPID DIGESTIBILITY IN GIFT NILE TILAPIA RAISED AT SUBOPTIMAL TEMPERATURE

Este capítulo refere-se ao artigo científico original publicado no periódico Fishes, em agosto de 2023 (<https://doi.org/10.3390/fishes8080404>).

Rosana Oliveira Batista¹, Bianca Leticia Richter¹, Jorge Filipe Banze¹, Delano Dias Schleder², Maria Salhi³, Renata Oselame Nobrega¹, Maria Fernanda Oliveira da Silva¹, Bruna Mattioni⁴, James Eugene Pettigrew⁵, Débora Machado Fracalossi^{1*}

¹ Department of Aquaculture, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88034-001, SC, Brazil;

rosana.engpesca@gmail.com (R.O.B.); biancalerichter@gmail.com (B.L.R.);
renata.oselamenobrega@gmail.com (R.O.N.); maria.fos@ufsc.br (M.F.O.d.S.)

² Department of Veterinary Medicine, Instituto Federal Catarinense, Campus Araquari, Araquari 89245-000, SC, Brazil; delano.schleder@ifc.edu.br

³ Natural Resources Laboratory, Institute of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Sciences,
University of the Republic, Montevideo 11400, Uruguay; msalhi@fcien.edu.uy

⁴ Carl and Melinda Helwig Department of Biological and Agricultural Engineering, Kansas State University,
Manhattan, KS 66502, USA; bruna.mattioni@gmail.com

⁵ Pettigrew Research Services, Tubac, AZ 85646, USA; jim@pettigrewconsulting.com

* Correspondence: debora.fracalossi@ufsc.br.

Abstract: Soy lecithin (SL) is a source of phospholipids, which play a crucial role in determining cell membrane structure, fluidity, and functionality. This study investigated the effects of dietary SL on the performance, nutrient digestibility, and body composition of Nile tilapia juveniles (average initial weight 12.2 g) raised at 22 °C. The experimental diets contained increasing levels of SL (0.0, 21.0, 43.0, and 64.0 g kg⁻¹). The best weight gain and feed efficiency occurred with 42.2 and 49.8 g kg⁻¹ of SL inclusion, respectively, estimated through quadratic regression after 90 days of feeding. The body composition of the fish was also affected by feeding with SL, with a decrease in total body lipids and viscerosomatic and hepatosomatic indices but an increase in polyunsaturated fatty acids. A digestibility trial using only two diets (0SLD and 43SLD) revealed increased lipid and fatty acids digestibility in fish fed with 43SLD. In addition, the consumption of digestible nutrients was the highest in fish fed the diet

43SL. Therefore, SL supplementation is beneficial in fall/spring diets for Nile tilapia juveniles as it can improve growth, lipid digestibility, and body composition when supplemented within the range of 42 to 50 g kg⁻¹ diet.

Keywords: *Oreochromis niloticus*; nutrition; suboptimal temperature; phospholipids; soy lecithin

Key Contribution: Soy-derived phospholipids are paramount in improving Nile tilapia growth at suboptimal temperatures besides offering a potentially practical approach for new ingredients in aquafeeds. Dietary supplementation of soy lecithin improves nutrient digestibility, resulting in the highest performance in terms of growth and body composition. Therefore, we recommend including 42 to 50 g kg⁻¹ soy lecithin to improve growth and to decrease body lipid accumulation.

2.1 INTRODUCTION

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is the third most farmed fish species worldwide [1]. It is a tropical species with optimal growth temperatures ranging from 26 to 30 °C [2]; however, tilapia farming activity has substantially grown in subtropical areas worldwide. These areas exhibit wide temperature variations between summer and winter [3]. In Brazil, the fourth largest tilapia producer worldwide [1], Nile tilapia farming largely occurs in the subtropical regions, where the water temperature varies from 12 to 25 °C in the fall, winter, and spring [3,4]. Because of the severe drop in water temperature during the winter months, mass mortalities of fish have been recorded, leading to significant economic losses [5–7].

Fish are ectothermic organisms, meaning they do not maintain a constant body temperature, and therefore undergo several metabolic changes when subject to suboptimal low temperatures. Cold stress can cause a decline in the immune response of fish, and decrease metabolic rate and growth [8], which can lead to mortality or a variety of sub-lethal consequences that will affect growth performance [9].

In fish, lipid metabolism is particularly affected by suboptimal temperatures [10]. Variations in the fatty acid content of phospholipids in the cell membrane are particularly important during adaptation to temperature changes. Generally, there is an increase in the proportion of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and monounsaturated fatty acids (MUFA) in addition to a reduction in saturated fatty acids (SFA) in membrane phospholipids with decreasing environmental temperatures [11,12]. The increase in

PUFA maintains the liquid crystal state of the lipid matrix by counteracting cold-induced solidification of the lipid bilayers [13,14].

Nutrient digestibility can also be affected in fish raised at suboptimal temperatures. Previous studies have shown that the digestibility of proteins, lipids, and SFAs was 20% lower when Nile tilapia were raised at 22 °C [15] compared to 28 °C [16]. In both studies, diets had similar compositions and were supplemented with increasing levels of *Aurantiochytrium* sp. meal, a docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3)-producing heterotrophic microorganism. Likewise, for carnivorous marine fish, such as Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*), low water temperatures decreased SFA digestibility, whereas MUFA and PUFA digestibility were less affected [17,18].

One strategy to help fish cope with low suboptimal temperatures in aquaculture systems is to provide an optimal diet to meet their metabolic needs under such conditions. Due to the main changes in the lipid metabolism in suboptimal temperatures, dietary lipid modulation is of paramount importance when designing such diets [3,19]. Previous studies [15,20] have shown that diets containing PUFA, mostly from the n-3 series, improved the growth and feed efficiency of Nile tilapia reared at suboptimal temperatures. Other studies have reported that thermal tolerance and survival were improved in Nile tilapia fed diets supplemented with n-3 PUFA [13,21].

Dietary lipid modulation in Nile tilapia raised at suboptimal temperatures was previously investigated by adding different lipid sources [20], a mixture of vegetable oils [22], or feed additives [15,23], where fatty acids were present in the form of triacylglycerols (neutral lipids). Phospholipids are polar lipids and may be superior to neutral lipids as a source of fatty acids because of their superior digestibility [24]. Dietary inclusion of phospholipids has been shown to improve lipid emulsification and facilitate digestion by improving intestinal absorption of long-chain fatty acids, because as amphipathic molecules they are capable of forming micelles more easily than triacylglycerols [24]. Phospholipids are interesting candidates for inclusion in winter diets for fish because of their important biological functions and role in adaptation to low temperatures.

Currently, soy lecithin is the primary phospholipid source in fish and crustacean feeds. Owing to the large volumes of soybeans produced globally, soy lecithin is a readily available form of phospholipids for fish diets [25]. Phospholipid

content and composition in soy lecithin are variable but usually fall in the range of 50 to 60% of total phospholipids containing 13 to 18% phosphatidylcholine, 10 to 15% phosphatidylethanolamine, 10 to 15% phosphatidylinositol, and 5 to 12% phosphatidic acid [25]. The most abundant fatty acid in soy lecithin is linoleic acid (18:2 n-6, LOA), representing approximately 52 to 60% of the total fatty acid content [26].

Despite the important role of phospholipids in fish adaptation to low temperatures, no studies have yet investigated the inclusion of phospholipid sources, such as soy lecithin, under suboptimal temperature conditions. Thus, considering the worldwide distribution of tilapia farming, which includes subtropical climate regions, our study aimed to evaluate the dietary inclusion of soy lecithin as a source of phospholipids on growth performance, digestibility, and body composition of Nile tilapia raised at 22 °C.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 Experimental design and diets

We ran a growth trial and a digestibility trial. In the growth trial, four experimental diets were formulated with practical ingredients to meet the nutritional requirements of Nile tilapia [27,28]. All diets were isonitrogenous and contained increasing levels of soy lecithin (0.0, 21.0, 43.0, and 64.0 g kg⁻¹; named 0SL, 21SL, 43SL, and 64SL, respectively). Experimental diets for the growth and digestibility trials are presented in Tables 1 and 2, respectively.

When formulating the experimental diets, only the phospholipid composition of soy lecithin, the primary source of phospholipids, was considered. However, the diet without soy lecithin also contained phospholipids (see total polar lipid content in Table 1) due to the contributions from poultry by-product meal and soybean meal, which were included at identical levels in all diets.

Soy lecithin included in the diets was de-oiled. This type of lecithin was obtained by degumming with water, drying, and treating with hydrogen peroxide, which transforms it into a powder. As advantages, the manufacturer highlights the low amount of neutral lipids (approximately 2% triacylglycerol), making it easy to mix with other powdered products, as well as the absence of flavor [25]. Corn oil was used as a source of lipids in the experimental diets, mainly in the control diet (without lecithin), and replaced as soy lecithin was included. In the 64SL diet, corn oil was not used

because only the inclusion of soy lecithin already met the requirement for lipids and fatty acids of the species. The inclusion of soy lecithin influenced the total lipid and polar lipid contents of the diets: the higher the soy lecithin inclusion, the higher the lipid and polar lipid contents (Table 1).

Table 1. Formulation and composition of the experimental diets of the growth trial.

Ingredients¹, g kg⁻¹	Diets			
	0SL	21SL	43SL	64SL
Dry Diet				
Soybean meal	450.0	450.0	450.0	450.0
Broken rice	387.0	380.0	371.0	357.0
Poultry by-product meal	100.0	100.0	100.0	100.0
Corn oil	34.0	20.0	7.0	0.0
Soy lecithin	0.0	21.0	43.0	64.0
Others ²	29.0	29.0	29.0	29.0
Analyzed Composition, g 100 g⁻¹ Dry Weight				
Dry matter	91.14	91.30	91.21	90.36
Crude energy, kcal kg ⁻¹	4632	4674	4744	4812
Crude protein	33.04	33.10	33.63	32.97
Ether extract	6.61	7.53	7.83	8.74
Polar lipids	2.59	3.87	4.87	5.97
Mineral matter	6.61	6.81	6.98	7.55
C16:0 ³	0.89	1.00	1.06	1.11
C18:1 n-9	1.56	1.29	1.17	1.01
C18:2 n-6	1.96	2.10	2.23	2.35
C18:3 n-3	nd ⁶	0.02	0.03	0.03
SFA ⁴	1.12	1.22	1.35	1.43
MUFA	1.74	1.66	1.55	1.41
PUFA	1.96	2.10	2.26	2.39
PUFA n-6	1.96	2.10	2.23	2.36
PUFA n-3	0.00	0.02	0.03	0.03

¹ Broken rice and soybean meal were obtained from Cravil Ltd. (Palhoça, Brazil). Poultry by-product meal was produced by Kabsa S.A. (Porto Alegre, Brazil). Corn oil "Suavit" was produced by Cocamar Ltda (Maringá, Brazil). Soy lecithin was produced by BergaPur (Berg & Schmidt, Hamburg, Germany), and contained 70% total phospholipid (average value from analyses performed between 2014 to 2020, as informed by the manufacturer). ² Dicalcium phosphate (16.0 g kg⁻¹), vitamin-micromineral premix (10.0 g kg⁻¹), choline bitartrate (1.0 g kg⁻¹), butylated hydroxytoluene (BHT, 1.0 g kg⁻¹), threonine (1.2 g kg⁻¹), and methionine (1.0 g kg⁻¹). A vitamin-micromineral premix (produced by Cargill, Campinas, São Paulo). Composition per kg of product: folic acid 420 mg, pantothenic acid 8.333 mg, BHT 25.000 mg, biotin 134 mg, cobalt sulfate 27 mg, copper sulfate 1.833 mg, iron sulfate 8,000 mg, calcium iodate 92 mg, sulfate manganese 3.500 mg, niacin 8.333 mg, selenite 100 mg, vitamin (vit.) A 1666.670 IU, vit. B1 2083 mg, vit. B12 5.000 µg, vit. B2 4.166 mg, vit. B6 3.166 mg, ascorbic acid equivalent 66.670 mg, vit. D3 666.670 IU, vit. A 16.666 IU, vit. K3 833 mg, zinc sulfate 23.330 mg, inositol 50.000 mg, calcium propionate 250.000 mg. ³ Fatty acids: C16:0, palmitic acid, PAL; C18:1 n-9, oleic acid, OLA; C18:2 n-6, linoleic acid, LOA; C18:3 n-3, linolenic acid, α-LNA. ⁴ Fatty acid groups: SFA = saturated, MUFA = monounsaturated, PUFA = polyunsaturated. ⁵ Soy lecithin. The experimental diets contained increasing levels of soy lecithin (0.0, 21.0, 43.0, 64.0 g kg⁻¹; namely 0SL, 21SL, 43SL, and 64SL, respectively). ⁶ Not detected (< 0.01 g 100 g⁻¹ dry weight).

Table 2. Formulation and composition of the experimental diets for the digestibility trial.

Ingredients¹, g kg⁻¹ Dry Diet	0SLD⁵	43SLD
Soybean meal	450.0	450.0
Broken rice	386.0	370.0
Poultry by-product meal	100.0	100.0
Corn oil	34.0	7.0
Soy lecithin	0.0	43.0
Others ²	29.0	29.0
Yttrium oxide	1.0	1.0
Analyzed Composition, g 100 g⁻¹ Dry Weight		
Dry matter	90.79	91.12
Crude energy. kcal kg ⁻¹	4670	4676
Crude protein	31.39	30.41
Ether extract	6.21	7.84
Polar lipids	2.27	4.91
Mineral matter	6.48	6.82
C16:0 ³	0.85	1.15
C18:1 n-9	1.48	1.18
C18:2 n-6	1.89	2.12
C18:3 n-3	nd ⁶	0.03
SFA ⁴	1.09	1.43
MUFA	1.75	1.58
PUFA	1.89	2.16
PUFA n-6	1.89	2.13
PUFA n-3	0.00	0.03

¹ Broken rice and soybean meal were obtained from Cravil Ltd. (Palhoça, Brazil). Poultry by-product meal was produced by Kabsa S.A. (Porto Alegre, Brazil). Corn oil "Suavit" was produced by Cocamar Ltda (Maringá, Brazil). Soy lecithin was produced by BergaPur (Berg & Schmidt, Hamburg, Germany), and contained 70% total phospholipid (average value from analyses performed between 2014 to 2020, as informed by the manufacturer). ² Dicalcium phosphate (16.0 g kg⁻¹), vitamin-micromineral premix (10.0 g kg⁻¹), choline bitartrate (1.0 g kg⁻¹), butylated hydroxytoluene (BHT, 1.0 g kg⁻¹), threonine (1.2 g kg⁻¹), and methionine (1.0 g kg⁻¹). A vitamin-micromineral premix (produced by Cargill, Campinas, São Paulo). Composition per kg of product: folic acid 420 mg, pantothenic acid 8.333 mg, BHT 25.000 mg, biotin 134 mg, cobalt sulfate 27 mg, copper sulfate 1.833 mg, iron sulfate 8.000 mg, calcium iodate 92 mg, sulfate manganese 3.500 mg, niacin 8.333 mg, selenite 100 mg, vitamin (vit.) A 1666.670 IU, vit. B1 2083 mg, vit. B12 5.000 µg, vit. B2 4.166 mg, vit. B6 3.166 mg, ascorbic acid equivalent 66.670 mg, vit. D3 666.670 IU, vit. A 16.666 IU, vit. K3 833 mg, zinc sulfate 23.330 mg, inositol 50.000 mg, calcium propionate 250.000 mg. ³ Fatty acids: C16:0, palmitic acid, PAL; C18:1 n-9, oleic acid, OLA; C18:2 n-6, linoleic acid, LOA; C18:3 n-3, linolenic acid, α-LNA. ⁴ Fatty acid groups: SFA = saturated, MUFA = monounsaturated, PUFA = polyunsaturated. ⁵ The digestibility experimental diets contained two levels of soy lecithin (0.0 and 43.0 g kg⁻¹; namely 0SLD and 43SLD). ⁶ Not detected (< 0.01 g 100 g⁻¹ dry weight).

Before diet preparation, all ingredients were analyzed to determine their proximate composition, fatty acid profile, and energy content. Fatty acid profiles of the experimental diets were determined at the beginning and end of the feeding trial to ensure that there were no losses due to oxidation during the experimental period. These procedures are de-tailed in Section 2.5.

The preparation of the ingredients for manufacturing the diets and the extrusion conditions were previously described by Nobrega and coworkers [15], except

for minor modifications in the extrusion temperature. Temperature was reduced to 75 °C when processing diets with low inclusion levels of soy lecithin (0.0, 21.0, and 43.0 g kg⁻¹) and further reduced to 60 °C when processing the diet with a higher level of inclusion of soy lecithin (64.0 g kg⁻¹) to allow the diet granules to float. After extruding the diets, the obtained pellets were 1.5 to 2.0 mm in length. These were dried in an oven with forced air circulation at 50 °C for 4 h and stored in sealed containers, protected from light, and kept in a dry environment at 4 °C to avoid oxidation of the fatty acids until use.

2.2.2 Experimental procedures

Nile tilapia juveniles of the genetically improved farmed tilapia (GIFT) — Epagri SC03 strain, sexually inverted to be male, were obtained from the Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri, Itajaí, Brazil). Fish management followed a protocol (# 3641231120) approved by the Ethics Committee of Animal Use of the Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC).

Fish were initially acclimatized to laboratory conditions in 1000 L tanks connected to a freshwater recirculation system (RAS), with a water temperature of 28 °C, for two weeks. Subsequently, groups of 25 fish were distributed in 24 tanks of 100 L (each tank was considered as an experimental unit). The fish were acclimated to the experimental units at 28 °C for one week. In the second week, the water temperature was gradually reduced from 28 to 22 °C (1 °C per day) and, from the third week of acclimatization, the water temperature was maintained at 22 °C, i.e., the object of study. During acclimation in the 1000 L tanks, the fish were fed a commercial diet for fingerlings containing 40% protein and 8% lipid, three times a day to apparent satiation. During acclimatization to the 100 L tanks, the fish were fed the experiment's control diet, without the inclusion of soy lecithin (OSL), twice a day until apparent satiation.

The initial weight of the fish at the end of the acclimatization period was 12.22 ± 0.09 g, mean weight ± standard error. During the experimental period (90 days, January to April 2021), fish were fed their respective experimental diets twice a day (10:00 and 18:00 h) to apparent satiation. The diets were randomly distributed to the experimental units, resulting in four dietary treatments with six replicates per treatment.

Feed intake, mortality rates, water temperature, and dissolved oxygen were recorded daily while all other water quality parameters were measured weekly. The

average water quality values ($\pm$ standard deviation) were as follows: temperature, 22.03 ± 0.48 °C; dissolved oxygen, 7.40 ± 0.53 mg L⁻¹; pH, 7.54 ± 0.10 ; salinity, 0.92 ± 0.08 g L⁻¹; alkalinity, 40.98 ± 7.15 CaCO₃ mg L⁻¹; total ammonia, 0.13 ± 0.10 mg L⁻¹; nitrate, 0.01 ± 0.01 mg L⁻¹. The inlet water flow rate in each tank was 25 mL s⁻¹. All water quality parameters, apart from water temperature, were in accordance with the recommended levels for Nile tilapia farming [29].

2.2.3 Fish biometrics and sample collection

At the beginning and end of the feeding trial, the fish were individually weighed (0.01 g precision). Before these measurements, all fish were fasted for 24 h and anesthetized with 100 mg Eugenol® L⁻¹ (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltd., Ibiporã, Brazil). The following variables were calculated from fish biometrics and feed intake data: weight gain (WG, g = final weight – initial weight), daily WG (DWG, g day⁻¹ = weight gain $\times$ day⁻¹), specific growth rate (SGR, % day⁻¹ = $\{\ln \text{ final weight} - \ln \text{ initial weight}\} \times \text{days}^{-1} \times 100$), feed efficiency (FE = (weight gain) $\times$ (total feed intake)⁻¹), daily feed intake (DFI, % live weight day⁻¹ = $100 \times (\text{feed intake} \times \text{days}^{-1}) \times \{\text{final weight} + \text{initial weight}\} \times 2^{-1}$), and apparent net protein retention (ANPR, % = $100 \times (\text{final body protein} - \text{initial body protein}) \times (\text{protein intake})^{-1}$).

Thirty fish were collected, grouped, and analyzed in triplicate for determination of the initial whole-body proximal and fatty acid compositions, whereas the same measurements were made in three fish per experimental unit at the end of the trial. More fish were needed to reach the sample size for fillet proximal and fatty acid compositions. Thus, fillets of a group of 40 fish as well as five fish per experimental unit were collected for the initial and final compositions, respectively.

Prior to sampling, fish were fasted for 24 h and euthanized via an overdose (200 mg L⁻¹) of the anesthetic Eugenol®, followed by sectioning of the spine. The collected samples were lyophilized, homogenized, and stored at -20 °C until analysis.

2.2.4 Digestibility trial

A digestibility trial was carried out with Nile tilapia at 22 °C to evaluate the apparent digestibility coefficients (ADC) of selected nutrients in similar diets to the 0SL and 43SL diets used in the previously described dose–response feeding trial. The 43SL diet was selected because it promoted the greatest weight gain. Digestibility diets

were then named 0SLD and 43SLD because they also included yttrium oxide as an inert marker replacing broken rice (Table 2). The digestibility of dry matter, crude protein, crude fat, polar lipids, and fatty acids was evaluated.

The same fish used in the dose-response trial were subsequently grouped in 1,000 L tanks and fed a practical diet without lecithin inclusion for five weeks at 22 °C. Fish were then transferred into six 200 L cylinder-conical tanks (two diets × three replicates), connected to the same RAS at 22 °C. Each tank was stocked with 12 fish (mean weight 159.33 ± 1.02 g) that were fed the experimental diets for two weeks. After this period, feces were collected for 32 days. The 200 L tanks were equipped with a 50 mL tube at the bottom for the collection of settled feces. These tubes were immersed in isothermal containers with ice to prevent the microbial degradation of feces. The tubes and ice were changed every 3 h. Removed tubes were centrifuged for 5 min at $1,077 \times g$ and fecal (precipitate) samples were stored at -20 °C prior to lyophilization. These procedures have been previously described by Rodrigues et al. [30].

Fish were fed twice daily (10:00 and 17:00 h) until apparent satiation. One hour after each feeding, the tank walls were carefully cleaned and approximately 70% of the water in each tank was renewed. This procedure was performed to avoid the contamination of feces with feed, remove any regurgitated feed, and remove any bacterial biofilm from the tank walls. The fecal collection periods occurred after cleaning the tanks. Fecal samples were collected daily between 18:00 h to 21:00 h and from 21:00 h to 00:00 h, with two collections per period. The time of collection was chosen because more feces were evacuated at night. At the end of each collection period, fecal samples were lyophilized, homogenized, and stored at -20 °C until further analyses.

The apparent digestibility coefficient (ADC) was calculated using the following equation (NRC 2011):

$$ADC, \% = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\text{Marker Diet}}{\text{Marker Feces}} \times \frac{\text{Nutrient Feces}}{\text{Nutrient Diet}} \right) \right] \quad (1)$$

The average values of water quality indicators (average $\pm$ standard deviation) were as follows: temperature, 22.04 ± 0.91 °C; dissolved oxygen, 7.58 ± 0.36 mg L⁻¹; pH, 7.22 ± 0.40 ; salinity, 1.47 ± 0.33 g L⁻¹; alkalinity, 55.55 ± 8.81 CaCO₃ mg L⁻¹; total

ammonia, $0.06 \pm 0.05 \text{ mg L}^{-1}$; nitrite, $0.09 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$; nitrate, $0.00 \pm 0.00 \text{ mg L}^{-1}$. The inlet water flow in each tank was 50 mL s^{-1} . As reported for the dose-response feeding trial, water quality parameters, except for the water temperature, were in accordance with the recommended levels for Nile tilapia farming.

Using the ADC, we calculated the digestible intake of nutrients and energy (DIN) in fish fed the 0SL and 43SL diets using the consumption data from the growth trial. The digestible nutrient intake was calculated using the following equation:

$$DIN,g = \left(\frac{\text{Nutrient composition in feed} \times \text{ADC}}{100} \right) \times \left(\frac{\text{Total fish intake}^{-1}}{100} \right) \quad (2)$$

2.2.5 Chemical analyses

The analysis of proximal composition followed procedures standardized by the Association of Official Analytical Chemists [31]. Moisture content was measured by drying at 105°C to a constant weight (method 950.01), crude protein was determined with Leco FP-528 LC equipment using the Dumas method (method 990.03), and mineral matter was determined following incineration at 550°C (method 942.05). Crude energy was determined using a calorimeter (PARR, model ASSY 6200) according to the manufacturer's instructions. Lipid analyses of the ingredient, body, and fillet samples were performed using the Soxhlet method (method 920.39C). To quantify the polar lipids of the ingredients, diets, and feces, total lipids in the samples were measured by the method described by Folch et al. [32], and the polar and neutral lipids were separated by solid-phase extraction (SPE) using an SPE column (Sep-Pak Silica) according to the methods described by Juaneda and Rocquelin [33].

Fatty acid measurements in the ingredients, diets, bodies, and feces were performed using gas chromatography. Sample lipids were cold extracted and quantified using the methods described by Bligh and Dyer [34]. Fatty acids were then esterified using the method described by O'Fallon et al. [35] and separated using a gas chromatograph (7890 B; Agilent, Santa Clara, USA) with an FID detector and a CP-Sil 88 capillary column (60 m, 0.25 mm, 0.20 μm , 7-inch in cage; Agilent, Santa Clara, USA). The chromatographic conditions were the same as used by Nobrega and coworkers [15].

For yttrium quantification, samples were digested with nitric acid at 180°C for 48 h and then analyzed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry.

2.2.6 Statistical Analysis

The experiment was conducted using a completely randomized design. Data were compared using the Levene test to verify homoscedasticity and the Shapiro-Wilk test to evaluate normality. Quadratic regression analyses were used to evaluate the effect of increasing levels of dietary soy lecithin on growth performance, body proximal composition, body indices, and fatty acid composition variables. The ADC and digestible intake of energy, dry matter, protein, lipids, polar lipids, and fatty acids data, resulting from the digestibility trial, were subjected to the Student's t-test. For all statistical analyses, Statistica 13.0 software (Statsoft Inc. Tulsa, USA) was used and a significance level of 5% was adopted. Statistical graphs were made using software GraphPad Prism version 8.0.1.

2.3 RESULTS

2.3.1 Growth performance, protein retention, and somatic indices

Nile tilapia growth performance variables, including weight gain, daily weight gain, specific growth rate, feed efficiency, daily feed intake, and viscerosomatic and hepatosomatic indices, were fit to a quadratic regression model (Table 3). Survival rates were similar among fish receiving the different diets, ranging from 97.33 to 99.33%.

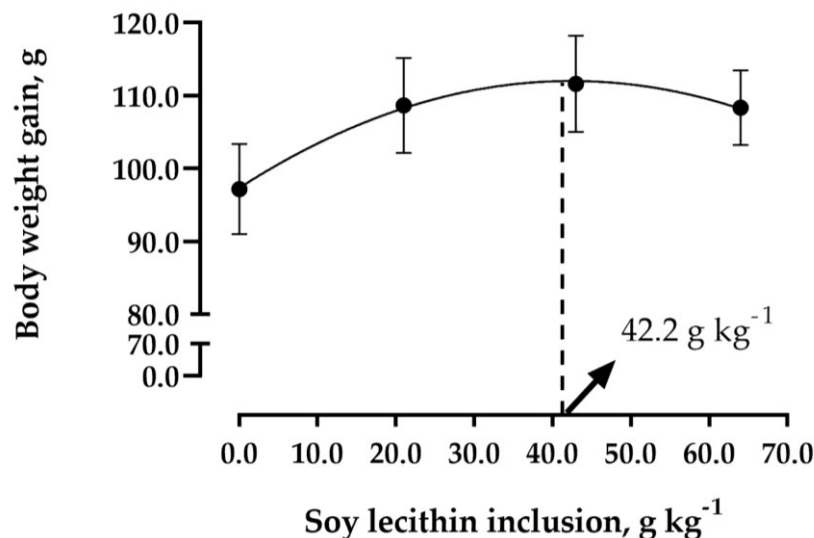
The growth and feed efficiency of Nile tilapia juveniles reared at 22 °C was positively affected by increasing dietary inclusion of soy lecithin ($p < 0.05$). Through quadratic regression, the best soy lecithin inclusion rates were determined to be 42.2 g kg⁻¹ for weight gain and 49.8 g kg⁻¹ for feed efficiency (Fig. 1 and 2). Using the regression equation, supplementation with 42.2 g kg⁻¹ of soy lecithin represents a 15.2% increase in weight gain, and supplementation with 49.8 g kg⁻¹ a increase in feed efficiency of 6.5%, both compared to fish fed the OSL diet.

Table 3. Growth performance, feed intake, feed efficiency, protein retention, and body indices of juvenile Nile tilapia fed with an increasing dietary inclusion of soy lecithin (SL) for 90 days at 22 °C¹.

Ingredients ¹ , g kg ⁻¹ Dry Diet	Diets				Pooled SEM ³	p Value ⁴
	0SL	21SL	43SL	64SL		
Initial weight, g	12.22	12.23	12.26	12.22	0.08	0.580
Weight gain, g	97.19	108.67	111.62	108.34	7.37	0.005
Daily weight gain, g day ⁻¹	1.08	1.21	1.24	1.20	0.08	0.005
Specific growth rate, % day ⁻¹	2.43	2.54	2.57	2.54	0.07	0.004
Daily feed intake, % live weight day ⁻¹	2.91	2.77	2.73	2.73	0.06	<0.0001
Feed efficiency	0.76	0.80	0.81	0.81	0.02	<0.0001
Apparent net protein retention, %	36.66	37.63	38.75	38.12	2.06	0.133
Viscerosomatic index, %	14.90	13.78	13.66	13.12	1.32	0.025
Hepatosomatic index, %	3.82	3.84	3.63	3.25	0.41	0.029
Survival, %	99.33	98.00	98.67	98.67	2.98	0.632

¹ Results are expressed as the average of six replicates. ² Soy lecithin. The experimental diets contained increasing levels of soy lecithin (0.0, 21.0, 43.0, 64.0 g kg⁻¹; namely 0SL, 21SL, 43SL, and 64SL, respectively). ³ Standard error of means. ⁴ Where polynomial regression was significant, the following equations were obtained: Weight gain, $y = -0.0082x^2 + 0.6932x + 97.324$, $R^2 = 0.50$; Daily weight gain, $y = -0.0000908x^2 + 0.00770x + 1.081$, $R^2 = 0.48$; Specific growth rate, $y = -0.0000753x^2 + 0.00646x + 2.436$, $R^2 = 0.50$; Daily feed intake, $y = 0.0000767x^2 - 0.00761x + 2.906$, $R^2 = 0.75$; Feed efficiency, $y = -0.0000212x^2 + 0.00211x + 0.765$, $R^2 = 0.75$; Viscerosomatic index $y = 0.000323x^2 - 0.462x + 14.827$, $R^2 = 0.42$; Hepatosomatic index $y = -0.000223x^2 + 0.00541x + 3.819$, $R^2 = 0.401$.

Figure 1. Effect of soy lecithin inclusion level on the body weight gain of Nile tilapia juveniles fed for 90 days at 22 °C. The best growth-related lecithin dose (indicated by the vertical dashed line and arrow) was estimated using the following equation of the quadratic regression model: $y = -0.0082x^2 + 0.6932x + 97.324$, $R^2 = 0.50$.

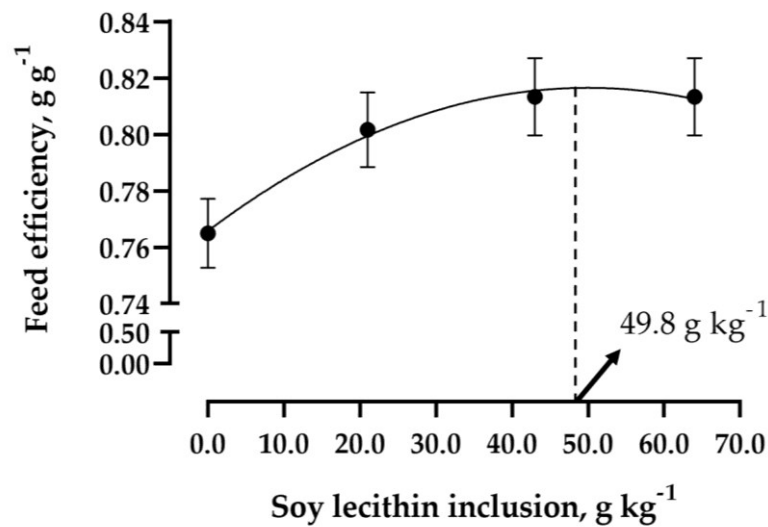


The growth and feed efficiency of Nile tilapia juveniles reared at 22 °C was positively affected by increasing dietary inclusion of soy lecithin ($p < 0.05$). Through

quadratic regression, the best soy lecithin inclusion rates were determined to be 42.2 g kg⁻¹ for weight gain and 49.8 g kg⁻¹ for feed efficiency (Fig. 1 and 2). Using the regression equation, supplementation with 42.2 g kg⁻¹ of soy lecithin represents a 15.2% increase in weight gain, and supplementation with 49.8 g kg⁻¹ a increase in feed efficiency of 6.5%, both compared to fish fed the 0SL diet.

The polynomial quadratic regression was significant for daily weight gain ($p < 0.05$), which ranged from 1.08 to 1.20 g day⁻¹ with increased soy lecithin inclusion (0SL to 64SL; Table 3). The viscerosomatic and hepatosomatic indices decreased as soy lecithin dietary inclusion increased (Table 3). Protein retention rate was not significantly affected by the inclusion of soy lecithin ($p > 0.005$).

Figure 2. Effect of soy lecithin inclusion level on feed efficiency of Nile tilapia juveniles fed for 90 days at 22 °C. Best feed efficiency-related lecithin dose (indicated by the vertical dashed line and arrow) was estimated using the following equation of the quadratic regression model: $y = -0.0000212x^2 + 0.00211x + 0.765$, $R^2 = 0.75$.



The polynomial quadratic regression was significant for daily weight gain ($p < 0.05$), which ranged from 1.08 to 1.20 g day⁻¹ with increased soy lecithin inclusion (0SL to 64SL; Table 3). The viscerosomatic and hepatosomatic indices decreased as soy lecithin dietary inclusion increased (Table 3). Protein retention rate was not significantly affected by the inclusion of soy lecithin ($p > 0.005$).

2.3.2 Body and fillet composition

Whole-body lipid composition was significantly affected in fish fed increasing levels of soy lecithin. The body lipid content decreased in response to increasing soy

lecithin supplementation, indicating a quadratic response. Soy lecithin dietary supplementation of 50.2 g kg⁻¹ would promote the lowest accumulation of body lipids, as estimated by the quadratic regression model. Fillet protein content was affected by the inclusion of soy lecithin, presenting a quadratic response, with a decrease in protein content with increasing inclusion of soy lecithin (Table 4).

Table 4. Body and fillet composition of juvenile Nile tilapia fed an increasing dietary inclusion of soy lecithin (SL) for 90 days at 22 °C¹.

Variables	Initial	Diets				Pooled SEM ³	<i>p</i> Value ⁴
		0SL	21SL	43SL	64SL		
Body composition, g 100 g ⁻¹ wet weight							
Dry matter	26.57	34.42	34.21	34.23	34.41	1.13	0.578
Protein	14.63	15.58	15.33	15.73	15.31	0.82	0.755
Lipid	8.23	15.29	14.44	14.50	14.31	0.81	0.019
Ash	3.46	3.59	3.46	3.68	3.65	1.36	0.557
Fillet composition, g 100 g ⁻¹ wet weight							
Dry matter	20.66	23.47	23.28	23.67	22.83	0.46	0.066
Protein	18.61	20.26	20.11	20.12	19.53	0.42	0.012
Lipid	0.99	2.01	1.95	1.96	1.83	0.27	0.325

¹ Results are expressed as the average of six replicates. ² Soy lecithin. The experimental diets contained increasing levels of soy lecithin (0.0, 21.0, 43.0, 64.0 g kg⁻¹; namely 0SL, 21SL, 43SL, and 64SL, respectively). ³ Standard error of means. ⁴ Where polynomial regression was significant, the following equations were obtained: body composition - lipids, $y = 0.000357x^2 - 0.0301x + 15.187$, $R^2 = 0.384$; fillet composition - protein: $Y = 0.000265x^2 - 0.00699x + 20.100$, $R^2 = 0.418$

2.3.3 Whole-body fatty acid profiles

Increasing dietary levels of soy lecithin significantly affected the profiles of several body fatty acids and fatty acid groups ($p < 0.05$), presenting a quadratic response (Table 5). The following fatty acids or fatty acid groups increased significantly as dietary soy lecithin increased: linoleic acid (LOA, 18:2 n-6), arachidonic acid (ARA, 20:4 n-6), docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3), total PUFA, PUFA n-6, PUFA n-3, and long-chain PUFA from the n-3 and n-6 series (n-3 LC-PUFA and n-6 LC-PUFA). In contrast, the body content of oleic acid (OLA, 18:1 n-9) and total MUFA content decreased with increasing soy lecithin inclusion.

Table 5. Whole-body fatty acid profiles of juvenile Nile tilapia fed increasing dietary inclusion levels of soy lecithin (SL) for 90 days at 22 °C.¹

Fatty Acids, g 100 g ⁻¹ Dry Diet	Initial	Diets				Pooled SEM ⁴	p Value
		0SL	21SL	43SL	64SL		
C16:0	7.53	7.26	7.13	7.42	7.27	0.32	0.71
C18:1 n-9	9.87	11.67	10.88	10.51	10.14	0.34	<0.001
C18:2 n-6	2.99	3.20	3.22	3.32	3.58	0.10	0.030
C20:4 n-6	0.12	0.25	0.30	0.29	0.30	0.02	0.022
C18:3 n-3	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.01	0.29
C20:5 n-3	0.08	0.02	0.03	0.03	0.02	0.02	0.56
C22:6 n-3	0.03	0.05	0.07	0.07	0.08	0.01	<0.001
SFA ²	10.58	10.62	10.40	10.93	10.69	0.38	0.572
MUFA	12.74	14.34	13.55	13.19	12.82	0.37	<0.001
PUFA	4.05	4.95	5.03	4.98	5.36	0.15	0.043
PUFA n-6	3.37	3.99	4.07	4.10	4.45	0.09	0.011
LC-PUFA n-6	0.38	0.76	0.87	0.84	0.87	0.06	0.030
PUFA n-3	0.15	0.12	0.16	0.15	0.19	0.03	0.042
LC-PUFA n-3	0.11	0.07	0.11	0.11	0.13	0.03	0.017

¹ Results are expressed as the average of six replicates (n=3 fish per replicate). ² Fatty acid groups: SFA = saturated, MUFA = monounsaturated, PUFA = polyunsaturated, LC-PUFA = long-chain polyunsaturated. ³ Soy lecithin. The experimental diets contained increasing levels of soy lecithin (0.0, 21.0, 43.0, 64.0 g kg⁻¹; namely 0SL, 21SL, 43SL, and 64SL, respectively). ⁴ Standard error of means. ⁵ Where polynomial regression was significant, the following equations were obtained: OLA $y = 0.000242x^2 - 0.0386x + 11.649$, $R^2 = 0.694$; LOA $y = 0.000153x^2 - 0.00393x + 3.199$, $R^2 = 0.354$; ARA $y = 0.00005x^2 + 0.0023x + 0.2518$, $R^2 = 0.395$; DHA $y = -0.000005x^2 + 0.000752x + 0.0502$, $R^2 = 0.730$; MUFA $y = 0.000233x^2 - 0.0378x + 14.315$, $R^2 = 0.606$; PUFA $y = 0.000157x^2 - 0.00459x + 4.976$, $R^2 = 0.318$; n-6 PUFA $y = 0.000147x^2 - 0.00289x + 4.010$, $R^2 = 0.442$; LC-PUFA n-6: $-0.0000475x^2 + 0.00448x + 0.767$, $R^2 = 0.382$; n-3 PUFA $y = -0.000101x^2 + 0.00117x + 0.128$, $R^2 = 0.365$; n-3 LC-PUFA $y = -0.000143x^2 - 0.00151x + 0.0779$, $R^2 = 0.675$.

Whole-body LOA content increased quadratically with increasing dietary soy lecithin, varying from 3.20 to 3.58 g 100 g⁻¹ dry weight in fish fed the 0SL and 64SL diets, respectively; this represents a 12% increase at the top inclusion level compared to control.

Although n-3 LC-PUFA were not present in the diets, we found a significant increase in their levels in fish as the dietary inclusion of soy lecithin increased. More specifically, there was an increase of 85%, 58%, and 60% in LC-PUFA n-3, PUFA n-3, and DHA contents, respectively, in fish fed the 64SL diet compared to those fed the 0SL diet.

2.3.4 Selected nutrient digestibility and digestible intake

The digestibility of selected nutrients was relatively high for both 0SLD and 43SLD diets fed to Nile tilapia raised at 22 °C, with a minimum ADC of 79% (Table 6).

Table 6. Apparent digestibility coefficients of selected nutrients in diets with and without soy lecithin (SL) in Nile tilapia maintained at 22 °C ¹.

Nutrient, %	Diets		p Value
	0SLD ³	43SLD	
Dry matter	79.44 ± 0.30	80.01 ± 1.09	0.437
Protein	87.61 ± 0.14	87.99 ± 0.94	0.532
Energy	84.34 ± 0.39	85.20 ± 0.50	0.200
Lipid	92.84 ± 0.54	95.07 ± 0.74	0.014
Polar lipid	79.14 ± 1.42	89.61 ± 0.81	<0.001
C10:0	95.13 ± 0.77	98.14 ± 0.17	0.003
C16:0	92.50 ± 0.58	96.05 ± 0.31	0.006
C18:0	90.93 ± 0.57	94.91 ± 0.29	<0.001
C16:1 n-7	95.68 ± 0.15	96.46 ± 0.16	0.006
C18:1 n-9	96.16 ± 0.6	97.32 ± 0.48	0.075
C22:1 n-11	89.34 ± 0.93	92.26 ± 0.51	0.015
C18:2 n-6	97.28 ± 0.207	98.74 ± 0.22	<0.001
C20:2 n-6	92.97 ± 1.00	95.16 ± 0.57	0.004
C18:3 n-3	nd ⁴	100.00 ± 0.00	-
SFA ²	92.11 ± 0.58	95.79 ± 0.32	0.008
MUFA	96.06 ± 0.62	97.21 ± 0.40	0.061
PUFA	97.26 ± 0.21	98.74 ± 0.22	<0.001
PUFA n-6	97.26 ± 0.21	98.72 ± 0.22	<0.001
PUFA n-3	nd	100.00 ± 0.0	-

¹ Values are expressed as the average of three replicates followed by the standard error. ² Groups of fatty acids: SFA = saturated, MUFA = monounsaturated, PUFA = polyunsaturated. ³ Soy lecithin. The digestibility experimental diets contained two levels of soy lecithin (0.0 and 43.0; namely 0SLD and 43SLD, respectively). ⁴ Not detected.

No differences were observed in the ADC values for total energy, dry matter, and protein. Total lipid and polar lipid ADC were influenced by the inclusion of soy lecithin, with a higher digestibility for fish fed 43SLD compared to those fed 0SLD.

In general, the digestibility of fatty acids and groups of SFA, MUFA, and PUFA n-6, were higher in diets containing soy lecithin. The ADC of n-3 PUFA was calculated only for the 43SLD diet because these fatty acids were not found in the 0SLD diet. The n-3 PUFA showed high digestibility in the 43SLD diet with an ADC of 100%.

Using both digestibility data and feed consumption data from the dose-response trial, we calculated the consumption of digestible and energy nutrients (Table 7). Digestible feed intake was higher in fish fed 43SL compared to those fed 0SL when we evaluated the digestible intake of energy, protein, lipids, and fatty acids. However, consumption of monounsaturated fatty acids, such as C18:1 n-9 and total MUFA was higher in fish fed 0SL (Table 7).

Table 7. Digestible intake of energy and selected nutrients in Nile tilapia fed diets with and without soy lecithin (SL) and maintained at 22 °C ¹.

Nutrient intake, g fish ⁻¹	Diets		p Value
	0SL ³	43SL	
Energy	495.88 ± 28.07	543.33 ± 35.46	0.036
Protein	36.44 ± 2.08	40.20 ± 2.68	0.022
Lipid	7.73 ± 0.44	10.11 ± 0.65	<0.001
Polar lipid	2.58 ± 0.14	5.93 ± 0.39	<0.001
C16:0	1.04 ± 0.05	1.38 ± 0.09	<0.001
C18:1 n-9	1.89 ± 0.10	1.55 ± 0.10	<0.001
C18:2 n-6	2.40 ± 0.13	2.99 ± 0.20	<0.001
C18:3 n-3	nd ⁴	0.04 ± 0.00	-
SFA ²	1.30 ± 0.07	1.76 ± 0.11	<0.001
MUFA	2.10 ± 0.12	2.05 ± 0.13	<0.001
PUFA	2.40 ± 0.13	3.03 ± 0.21	<0.001
PUFA n-6	2.40 ± 0.13	2.99 ± 0.08	<0.001
PUFA-3	nd	0.04 ± 0.00	-

¹ Values are expressed as the average of three replicates followed by the standard error. ² Groups of fatty acids: SFA = saturated, MUFA = monounsaturated, PUFA = polyunsaturated. ³ Soy lecithin. The experimental diets contained two levels of soy lecithin (0.0 and 43.0 g kg⁻¹; namely 0SL and 43SL, respectively). ⁴ Not detected.

2.4 DISCUSSION

The importance of dietary phospholipids for optimal growth and feed efficiency in fall/spring diets of tilapia was clearly demonstrated in the present study. The inclusion of phospholipids in the form of soy lecithin improved the weight gain, feed efficiency, and digestibility of lipids for Nile tilapia when raised at suboptimal temperatures (22 °C). The optimal soy lecithin inclusion level was estimated to be 42.2 g kg⁻¹ for weight gain and 49.8 g kg⁻¹ for feed efficiency.

Several studies have reported the benefits of phospholipid inclusion in fish diets for improved growth, survival, resistance to high temperature stress, absorption, and distribution of lipids, especially for fish in larval stages and marine carnivores [36–41]; however, studies addressing phospholipid inclusion in the diets of juvenile and adult freshwater omnivorous fishes in particular are scarce because they show a high capacity to synthesize phospholipids de novo compared to marine carnivores [42].

Despite this, some studies have demonstrated that the inclusion of 30.0 g kg⁻¹ soy lecithin, a source of phospho-lipids, could improve growth, function, and intestinal health of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reared under optimal temperatures of 25–26 °C [43, 44].

Positive growth results have also been reported for juvenile Nile tilapia at optimal growth temperatures with the dietary inclusion of purified phosphatidylcholine (PC) [45]. PC is one of the most abundant phospholipid classes in fish tissues and plant ingredients, including soy lecithin. Dietary supplementation with 15.0 g kg⁻¹ PC increased the weight gain and feed efficiency of juvenile Nile tilapia maintained at 28 °C [45]; however, in adult fish kept at 28 to 34 °C, dietary supplementation with PC did not affect weight gain despite increasing feed efficiency and PC content in the liver, but with decreasing fat content in the liver, viscera, and whole body [46].

At the ideal rearing temperature, omnivorous freshwater fish may not require dietary phospholipid inclusion, because their ability to synthesize phospholipids de novo is sufficient for adequate physiological function [24]; however, at low temperatures, the nutritional requirements of freshwater fish, especially lipid requirements, may change given their ectothermic conditions and inherent metabolic changes [3]. For instance, biological membranes undergo homeoviscous adaptation, which involves the remodeling of the phospholipid membrane portion. Remodeling primarily comprises changes in the fatty acid composition and proportion of phospholipid headgroups [14,24]. Therefore, our findings showed that phospholipid inclusion in Nile tilapia diets can significantly contribute to improved growth performance at suboptimal temperatures.

The improvement in feed utilization observed in our study may be related to the higher digestibility of nutrients conferred by soy lecithin due to its emulsifying properties that improve feed digestion [24]. The mode of action of emulsifiers is related to increasing the active surface of lipids and promoting the formation of micelles by fatty acids, a step that is crucial for the digestion and absorption of lipids [47]. Thus, evaluating products to improve intestinal digestion and lipid absorption, thereby improving nutrient utilization, is an important strategy for increasing the sustainability of Nile tilapia farming at lower than optimal temperatures [48].

In addition to better feed efficiency, the decrease in body lipid and viscerosomatic and hepatosomatic indices, indicate that dietary lipid efficiency improved when it was offered in the form of phospholipids. Many studies have already

reported that the increase in lipid levels in the diet can lead to a deposition of fat in the body, fillet, and liver [48–50]. However, in these studies, lipid increase in the diet is related to the use of fish oil and vegetable oils, which are formed by triacylglycerols (neutral lipids). Therefore, incorporation of phospholipids, such as soy lecithin, into the diet may be a useful strategy to improve lipid utilization and potentially reduce the risk of diet-induced lipid accumulation or other metabolic disorders. A trend for decreasing lipid accumulation in fish fed phospholipids has been reported for other species such as the large yellow croaker (*Larmichthys crocea*) [51] and hybrid snakehead (*Channa argus* × *Channa maculata*) [52], which might be attributed to the important role of phospholipids in the transport of triacylglycerides from the intestine to the liver due to the formation of micelles, and from the liver to extra hepatic tissues due to the formation of very low-density lipoproteins [38]. By calculating the quadratic polynomial regression, we were able to estimate the soy lecithin concentration that would promote the lowest accumulation of body fat, which was determined to be 50.2 g kg⁻¹.

It is well known that the fatty acid composition of fish reflects the fatty acid composition of their diet, and that water temperature influences this profile. LOA is one of the most abundant fatty acids in soy lecithin, representing approximately 52 to 60% of the total fatty acid profile [26], which may have influenced the increase in the body accumulation of such fatty acid observed here as the inclusion of soy lecithin increased. In addition, there was an increase in the body content of ARA, which is an LC-PUFA bioconverted from LOA via desaturase and elongase enzymes [12], as well as an increase in the body content of the total PUFA and LC-PUFA n-6 groups with the inclusion of lecithin. Such results are probably linked to the higher availability of substrates for the transformation of PUFA into LC-PUFA, associated with higher digestibility attributed to phospholipids supplied in the diet. As observed by Corrêa [19], who evaluated the balance of fatty acids in vivo in Nile tilapia reared at optimal and suboptimal temperature (22 °C), there was also the body appearance of n-6 LC-PUFA, mainly 20:2, 20:4, and 22:4 in fish at 22 °C, when fed diets with sunflower oil, a good source of 18:2 n-6, a precursor to the n-6 LC-PUFA. The author highlights the importance of n-6 PUFAs for Nile tilapia as potential essential fatty acids, particularly under lower temperatures, because they registered a notable accumulation of n-6 PUFA in the body, along with the activation of elongases and desaturases responsible for converting PUFA to LC-PUFA. LC-PUFAs are crucial for maintaining plasma mem-

brane fluidity and ensuring the proper functioning of metabolic processes at suboptimal temperatures [19].

In this study, there was a slight increase in body DHA content, and in total n-3 PUFA and n-3 LC-PUFA, although the diets did not contain n-3 LC-PUFA, but α -LNA, indicating that the increase in the proportion of accumulated DHA was likely to be due to endogenous n-3 LC-PUFA biosynthesis with the conversion of dietary α -LNA to eicosapentaenoic (EPA, 20:5 n-3) and DHA. It has been reported that Nile tilapia expresses the genes for Δ -4 and Δ -6 desaturases, thus allowing the conversion of LOA to ARA and α -LNA to DHA through two different pathways, which are mediated by both desaturases [10,53]. DHA is a fatty acid of high biological value and its accumulation in the body suggests its probable presence in structural phospholipids in cells, especially at suboptimal temperatures, as previously reported by Glencross [10].

One important aspect that is typically decreased when raising fish at suboptimal low temperatures is the digestibility of selected dietary nutrients such as proteins, lipids, and SFA [15, 17,18]. According to Turchini et al. [54], diets with a high SFA content may have lower digestibility due to the solidification of SFA caused by low temperatures, which may prevent lipid digestion and absorption by fish. Soy lecithin is rich in SFA fatty acids; however, the emulsifying characteristics of phospholipids can overcome this and improve the lipid–water interaction, resulting in better nutrient digestibility, including SFA digestibility. Indeed, our findings show that, despite the low temperature, the inclusion of soy lecithin improved the digestibility of total lipids, polar lipids, and fatty acid groups, such as SFA, MUFA, and PUFA. An improvement in nutrient digestibility and thus a higher in-take of digestible nutrients in the diet with 43.0 g kg⁻¹ of lecithin corroborate the greater growth of fish fed soy lecithin. There was also an increase in the digestible consumption of such nutrients, resulting in the highest consumption of digestible energy, which support-ed the highest performance found in fish fed soy lecithin supplemented within the 42 to 50 g kg⁻¹ range.

The positive biological responses of Nile tilapia to the dietary inclusion of soy lecithin make it an excellent choice for winter diets, especially considering its wide availability in the market. While fishmeal is also a good source of phospholipids, its use is often not economically feasible in Nile tilapia commercial diets, which increases the relevance of using a plant phospholipid source such as soy lecithin. More studies should be conducted to evaluate how phospholipid sources, particularly soy lecithin, affect fish immune responses to the various challenges imposed by farming.

2.5 CONCLUSIONS

This is the first report of growth performance improvements in Nile tilapia when fed diets containing soy lecithin and raised at a suboptimal temperature. An improvement in growth and feed efficiency and a beneficial reduction in viscerosomatic and hepatosomatic indices were also observed because of the dietary inclusion of soy lecithin. Through quadratic modelling, soy lecithin inclusion at 42.2 g kg⁻¹ was found to be best for weight gain and 49.8 g kg⁻¹ was best for feed efficiency; inclusion at 50.2 g kg⁻¹ resulted in the lowest accumulation of body fat and 43.0 g kg⁻¹ improved digestible energy and digestible nutrient intake. Overall, our findings show that the best inclusion level of soy lecithin in fall/spring diets for Nile tilapia juveniles housed at low temperatures is within the range of 42 to 50 g kg⁻¹.

Author Contributions: R.O.B.: Investigation, Methodology, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Visualization, Writing—Original Draft. B.L.R.: Investigation, Methodology. J.F.B.: Investigation, Methodology. D.D.S.: Supervision, Methodology, Conceptualization, Data Curation, Writing—Review and Editing. M.S.: Methodology, Formal analysis, Writing—Review and Editing. R.O.N.: Methodology, Formal analysis, Writing—Review and Editing. M.F.O.d.S.: Formal analysis and Data Curation. B.M.: Methodology, Formal analysis, Writing—Review and Editing. J.E.P.: Conceptualization, Data curation, Writing—Review and Editing. D.M.F.: Supervision, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Writing—Review and Editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: We thank Alltech Inc. (Lexington, KY, USA) for funding our study. The authors also thank the Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES-Brazil, Finance Code 001) for granting a Ph.D.'s scholarship (88887.461556/2019-0) to Rosana O. Batista and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq- Brazil) for fellowships granted to Jorge F. Banze, Renata O. Nobrega, and Débora M. Fracalossi.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA)

and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC), the protocol code 3641231120.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: We would like to thank BergaPur (Berg + Schmidt, Hamburg, Germany) for donating the soy lecithin. We thank Camila Fernandes Corrêa for the review and comments to the original manuscript.

Conflicts of Interest: This study was funded by Alltech, Inc. (USA) through a joint research alliance between Alltech (USA) and the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC-Brazil). One of the authors is a consultant for Alltech through a committee containing both Alltech staff and UFSC staff, where the research project was developed and approved.

REFERENCES

1. FAO. *World Fisheries and Aquaculture*; FAO: Rome, Italy, 2022; ISBN 9789251072257.
2. Azaza, M.S.; Dhraïef, M.N.; Kraïem, M.M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. *J. Therm. Biol.* **2008**, *33*, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.05.007>.
3. Nobrega, R.O.; Banze, J.F.; Batista, R.O.; Fracalossi, D.M. Improving winter production of Nile tilapia: What can be done? *Aquac. Rep.* **2020**, *18*, 100453. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100453>.
4. Silva, B.C.; Pereira, A.; Marchiori, N.d.C.; Mariguele, K.H.; Massago, H.; Klabunde, G.H.F. Cold tolerance and performance of selected Nile tilapia for suboptimal temperatures. *Aquac. Res.* **2021**, *52*, 1071–1077. <https://doi.org/10.1111/are.14962>.
5. Ibarz, A.; Padrós, F.; Gallardo, M.Á.; Fernández-Borràs, J.; Blasco, J.; Tort, L. Low-temperature challenges to gilthead sea bream culture: Review of cold-

- induced alterations and “Winter Syndrome.” *Rev. Fish Biol. Fish.* **2010**, 20, 539–556. <https://doi.org/10.1007/s11160-010-9159-5>.
6. Lima De Almeida, A.; Charlle Kally, C.; De Almeida, L.; Fátima, E. De; Martins, F.; Maria, Â.; Pimentel, A.; Tatiane, R.; Fortes-silva, R. Effect of the dietary linoleic/ α -linolenic ratio (n6/n3) on histopathological alterations caused by suboptimal temperature in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Therm. Biol.* **2019**, 85, 102386. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.07.028>.
 7. Shi, G.C.; Dong, X.H.; Chen, G.; Tan, B.P.; Yang, Q.H.; Chi, S.Y.; Liu, H.Y. Physiological responses and HSP70 mRNA expression of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under cold stress. *Aquac. Res.* **2015**, 46, 658–668. <https://doi.org/10.1111/are.12212>.
 8. Wang, H.; Wang, Y.; Niu, M.; Hu, L.; Chen, L. Cold Acclimation for Enhancing the Cold Tolerance of Zebrafish Cells. *Front. Physiol.* **2022**, 12, 813451. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.813451>.
 9. Zhou, T.; Gui, L.; Liu, M.; Li, W.; Hu, P.; Duarte, D.F.C.; Niu, H.; Chen, L. Transcriptomic responses to low temperature stress in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* **2019**, 84, 1145–1156. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2018.10.023>.
 10. Glencross, B.D. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Rev. Aquac.* **2009**, 1, 71–124. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2009.01006.x>.
 11. Liu, C.; Ge, J.; Zhou, Y.; Thirumurugan, R.; Gao, Q.; Dong, S. Effects of decreasing temperature on phospholipid fatty acid composition of different tissues and hematology in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **2020**, 515, 734587. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734587>.
 12. Tocher, D.R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* **2003**, 11, 107–184.
 13. Abdel-Ghany, H.M.; El-Sayed, A.F.M.; Ezzat, A.A.; Essa, M.A.; Helal, A.M. Dietary lipid sources affect cold tolerance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Therm. Biol.* **2019**, 79, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.11.009>.
 14. Kostetsky, E.Y.; Velansky, P.V.; Sanina, N.M. Phase transitions of phospholipids as a criterion for assessing the capacity for thermal adaptation in fish. *Russ. J. Mar. Biol.* **2013**, 39, 214–222. <https://doi.org/10.1134/S1063074013030073>.
 15. Nobrega, R.O.; Batista, R.O.; Corrêa, C.F.; Mattioni, B.; Filer, K.; Pettigrew, J.E.; Fracalossi, D.M. Dietary supplementation of *Aurantiochytrium* sp. meal, a docosahexaenoic-acid source, promotes growth of Nile tilapia at a suboptimal low temperature. *Aquaculture* **2019**, 507, 500–509. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.030>.

16. Fernandes, V.A.G.; Brignol, F.D.; Filler, K.; Pettigrew, J.; Fracalossi, D.M. *Aurantiochytrium* sp. meal as DHA source in Nile tilapia diet, part I: Growth performance and body composition. *Aquac. Res.* **2019**, *50*, 390–399. <https://doi.org/10.1111/are.13887>.
17. Ng, W.K.; Sigholt, T.; Bell, J.G. The influence of environmental temperature on the apparent nutrient and fatty acid digestibility in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed finishing diets containing different blends of fish oil, rapeseed oil and palm oil. *Aquac. Res.* **2004**, *35*, 1228–1237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01131.x>.
18. Olsen, R.E. The influence of temperature on the apparent nutrient and fatty acid digestibility of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. *Aquac. Res.* **1998**, *29*, 147–158.
19. Corrêa, C.F.; Nobrega, R.O.; Mattioni, B.; Turchini, G.M.; Fracalossi, D.M. LC-PUFA endogenous biosynthesis is improved in Nile tilapia fed plant-oil sources at cold suboptimal temperature. *Aquaculture* **2023**, *562*, 738832. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738832>.
20. Corrêa, C.F.; Nobrega, R.O.; Mattioni, B.; Block, J.M.; Fracalossi, D.M. Dietary lipid sources affect the performance of Nile tilapia at optimal and cold, suboptimal temperatures. *Aquac. Nutr.* **2017**, *23*, 1016–1026. <https://doi.org/10.1111/anu.12469>.
21. Refaey, M.M.; Mehrim, A.I.; Zenhom, O.A.; Mansour, A.T. Effect of fatty acids manipulation on survival and physiological response of hybrid red tilapia under chronic cold stress. *Aquaculture* **2022**, *561*, 738663. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2022.738663>.
22. Corrêa, C.F.; Nobrega, R.O.; Block, J.M.; Fracalossi, D.M. Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. *Aquaculture* **2018**, *497*, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.034>.
23. Batista, R.O.; Nobrega, R.O.; Schleder, D.D.; Pettigrew, J.E.; Fracalossi, D.M. *Aurantiochytrium* sp. Meal improved body fatty acid profile and morphophysiology in Nile tilapia reared at low temperature. *Fishes* **2021**, *6*, 45. <https://doi.org/10.3390/FISHES6040045>.
24. Tocher, D.R.; Bendiksen, E.Å.; Campbell, P.J.; Bell, J.G. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture* **2008**, *280*, 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.04.034>.
25. Van Nieuwenhuyzen, W.; Tomás, M.C. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *110*, 472–486. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800041>.
26. Aquilina, G.; Azimonti, G.; Bampidis, V.; De, M.; Bastos, L.; Bories, G.; Chesson, A.; Cocconcelli, P.S.; Flachowsky, G.; Urgen Gropp, J.€; et al. SCIENTIFIC OPINION Safety and efficacy of lecithins for all animal species EFSA Panel on

- Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) Panel members. *EFSA J.* **2016**, 14, 4561. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4561>.
27. Jobling, M. National Research Council (NRC): *Nutrient requirements of fish and shrimp*. *Aquac. Int.* **2012**, 20, 601–602. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9480-6>.
 28. Furuya, W.M.; Furuya, V.R.B.; Nagae, M.Y.; Graciano, T.S.; Michelato, M.; Xavier, T.O.; Vidal, L.V. Nutrição de Tilápias no Brasil. *Sci. Agrar. Parana.* **2012**, 11, 19–34. <https://doi.org/10.18188/1983-1471/SAP.V11N1P19-34>.
 29. Popma, T.J.; Lovshin, L.L. *Worldwide Prospects of Commercial Production of Tilapia*; Auburn University: Auburn, AL, USA, 1995.
 30. Rodrigues, A.P.O.; Gominho-Rosa, M.D.C.; Cargnin-Ferreira, E.; de Francisco, A.; Fracalossi, D.M. Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá catfish (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Nutr.* **2012**, 18, 65–72. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2095.2011.00877.X>.
 31. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of AOAC International. Volume I, Agricultural Chemicals, Contaminants, Drugs*, 17th ed.; Horwitz, W., Ed.; AOAC International: Arlington, VA, USA, 2000; pp. 44–46.
 32. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tis-sues. *J. Biol. Chem.* **1957**, 226, 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5).
 33. Juaneda, P.; Rocquelin, G. Rapid and convenient separation of pentachlorophenol from human fat using silica Sep-Pak™ cartridges. *J. Chromatogr. A* **1985**, 346, 435–439. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)90537-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)90537-5).
 34. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, 37, 911–917. <https://doi.org/10.1139/O59-099>.
 35. O'Fallon, J.V.; Busboom, J.R.; Nelson, M.L.; Gaskins, C.T. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *J. Anim. Sci.* **2007**, 85, 1511–1521. <https://doi.org/10.2527/JAS.2006-491>.
 36. Cahu, C.L.; Infante, J.L.Z.; Barbosa, V. Effect of dietary phospholipid level and phospholipid:neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. *Br. J. Nutr.* **2003**, 90, 21–28. <https://doi.org/10.1079/BJN2003880>.
 37. Daprà, F.; Geurden, I.; Corraze, G.; Bazin, D.; Zambonino-Infante, J.L.; Fontagné-Dicharry, S. Physiological and molecular responses to dietary phospholipids vary between fry and early juvenile stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **2011**, 319, 377–384. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2011.07.016>.

38. Sivaramakrishnan, T.; Ambasankar, K.; Kumaraguru Vasagam, K.P.; Syama Dayal, J.; Sandeep, K.P.; Bera, A.; Makesh, M.; Kailasam, M.; Vijayan, K.K. Effect of dietary soy lecithin inclusion levels on growth, feed utilization, fatty acid profile, deformity and survival of milkfish (*Chanos chanos*) larvae. *Aquac. Res.* **2021**, *52*, 5366–5374. <https://doi.org/10.1111/ARE.15406>.
39. Zhao, J.; Ai, Q.; Mai, K.; Zuo, R.; Luo, Y. Effects of dietary phospholipids on survival, growth, digestive enzymes and stress resistance of large yellow croaker, *Larimichthys crocea* larvae. *Aquaculture* **2013**, 410–411, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.018>.
40. Pagheh, E.; Agh, N.; Marammazi, J.G.; Nouri, F.; Sepahdari, A.; Gisbert, E.; Torfi Mozanadeh, M. Dietary soybean lecithin affects growth performance, fillet biochemical composition and digestive enzyme activity in *Sparidentex hasta* juvenile. *J. Appl. Anim. Res.* **2019**, *47*, 24–33. <https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1557663>.
41. Taylor, J.F.; Martinez-Rubio, L.; Del Pozo, J.; Walton, J.M.; Tinch, A.E.; Migaud, H.; Tocher, D.R. Influence of dietary phospholipid on early development and performance of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **2015**, *448*, 262–272. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2015.06.012>.
42. Geurden, I.; Coutteau, P.; Sorgeloos, P. Increased docosahexaenoic acid levels in total and polar lipid of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) postlarvae fed vegetable or animal phospholipids. *Mar. Biol.* **1997**, *129*, 689–698. <https://doi.org/10.1007/s002270050212>.
43. Chen, Y.P.; Jiang, W.D.; Liu, Y.; Jiang, J.; Wu, P.; Zhao, J.; Kuang, S.Y.; Tang, L.; Tang, W.N.; Zhang, Y.A.; et al. Exogenous phospholipids supplementation improves growth and modulates immune response and physical barrier referring to NF- κ B, TOR, MLCK and Nrf2 signaling factors in the intestine of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, *47*, 46–62. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.08.024>.
44. Adel, M.; Gholaghaie, M.; Khanjany, P.; Citarasu, T. Effect of dietary soybean lecithin on growth parameters, digestive enzyme activity, antioxidative status and mucosal immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquac. Nutr.* **2017**, *23*, 1145–1152. <https://doi.org/10.1111/anu.12483>.
45. Kasper, C.S.; Brown, P.B. Growth Improved in Juvenile Nile Tilapia Fed Phosphatidylcholine; Growth Improved in Juvenile Nile Tilapia Fed Phosphatidylcholine. *N. Am. J. Aquac.* **2003**, *65*, 39–43. <https://doi.org/10.1577/1548-8454>.
46. Tian, J.; Wen, H.; Lu, X.; Liu, W.; Wu, F.; Yang, C.G.; Jiang, M.; Yu, L.J. Dietary phosphatidylcholine impacts on growth performance and lipid metabolism in adult Genetically Improved Farmed Tilapia (GIFT) strain of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Br. J. Nutr.* **2018**, *119*, 12–21. <https://doi.org/10.1017/S0007114517003063>.

47. Kim, M.J.; Hosseindoust, A.R.; Choi, Y.H.; Kumar, A.; Jeon, S.M.; Lee, S.H.; Jung, B.Y.; Kill, D.Y.; Chae, B.J. An evaluation of metabolizable energy content of main feed ingredients for growing pigs when adding dietary lysophospholipids. *Livest. Sci.* **2018**, 210, 99–103. <https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2018.01.014>.
48. Wangkahart, E.; Bruneel, B.; Wisetsri, T.; Nontasan, S.; Martin, S.A.M.; Chantiratikul, A. Interactive effects of dietary lipid and nutritional emulsifier supplementation on growth, chemical composition, immune response and lipid metabolism of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* **2022**, 546, 737341. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.737341>.
49. Lu, K.L.; Xu, W.N.; Li, X.F.; Liu, W. Bin; Wang, L.N.; Zhang, C.N. Hepatic triacylglycerol secretion, lipid transport and tissue lipid uptake in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fed high-fat diet. *Aquaculture* **2013**, 408–409, 160–168. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2013.06.003>.
50. Xie, S.; Yin, P.; Tian, L.; Liu, Y.; Niu, J. Lipid metabolism and plasma metabolomics of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides* were affected by dietary oxidized fish oil. *Aquaculture* **2020**, 522, 735158. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735158>.
51. Feng, S.; Cai, Z.; Zuo, R.; Mai, K.; Ai, Q. Effects of dietary phospholipids on growth performance and expression of key genes involved in phosphatidylcholine metabolism in larval and juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *Aquaculture* **2017**, 469, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.002>.
52. Lin, S.-M.; Li, F.-J.; Yuangsoi, B.; Doolgindachbaporn, S. Effect of dietary phospholipid levels on growth, lipid metabolism, and antioxidative status of juvenile hybrid snakehead (*Channa argus*×*Channa maculata*). *Fish Physiol. Biochem.* **2018**, 44, 401–410. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0443-3>.
53. Oboh, A.; Kabeya, N.; Carmona-Antoñanzas, G.; Castro, L.F.C.; Dick, J.R.; Tocher, D.R.; Monroig, O. Two alternative pathways for docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) biosynthesis are widespread among teleost fish. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 3889. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04288-2>.
54. Turchini, G.M.; Torstensen, B.E.; Ng, W.K. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquac.* **2009**, 1, 10–57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>.

3 ARTIGO 2: ANÁLISE DE LIPIDÔMICA REVELA INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM LECITINA DE SOJA NO PERFIL LIPÍDICO DO HEPATOPÂNCREAS DE TILÁPIA-DO-NILO, QUANDO CRIADA EM TEMPERATURA SUBÓTIMA

Rosana Oliveira Batista^a, Martina Blank^b, Débora Machado Fracalossi^a, James Eugene Pettigrew^c, Delano Dias Schleder^{d*}

^a Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis 88034-001, SC, Brazil.

^b Laboratório de Biologia Molecular, (LABIME), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC 88040-900, Brazil.

^c Pettigrew Research Services, Tubac, AZ 85646, USA.

^d Departamento de Medicina Veterinária, Instituto Federal Catarinense, Campus Araquari, Araquari 89245-000, SC, Brazil.

* Autor correspondente: D.D. Schleder, delano.schleder@ifc.edu.br

RESUMO

A lipidômica é especialmente adequada para avaliar os efeitos da nutrição sobre o perfil lipídico do organismo, pois permite a identificação de uma ampla gama de moléculas presentes nas células. Porém, poucos estudos relatam tais efeitos em peixes e, menos ainda, sob temperatura subótima para crescimento. Assim, o presente estudo investigou os efeitos da suplementação de lecitina de soja (do inglês *soy lecithin* SL; 0, 21, 43 e 64 g kg⁻¹) - fonte de fosfolipídios - na dieta de juvenis de tilápia-do-nilo criados a 22°C, focando nas alterações lipídicas que ocorrem no hepatopâncreas. As alterações lipídicas foram avaliadas por três técnicas de detecção: cromatografia gasosa (CG), injeção de fluxo direto acoplada à espectrometria de massas (FIA-MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). A suplementação com lecitina de soja resultou em um acúmulo crescente de ácido docosaenoico e, consequentemente, do total de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, avaliados por CG. Inversamente, houve diminuição dos ácidos graxos α -linolênico e eicosapentaenoico. Os resultados da lipidômica FIA-MS, submetidos à análise estatística multivariada, mostraram uma segregação clara do perfil lipídico nos peixes alimentados com a dieta suplementada com 64 g kg⁻¹ de SL, em comparação aos demais. Através da técnica LC-MS/MS foi possível identificar as classes de lipídios que demonstraram padrões distintos em resposta à suplementação no hepatopâncreas dos peixes. Foram observados seis lipídios em maior intensidade nos peixes alimentados com 64 g kg⁻¹ de SL em relação aos peixes alimentados com as dietas 0 e 43 g kg⁻¹ de SL, sendo estes das classes diacilglicerol (DG), esterol éster (SE) e triacilglicerol (TG). Ainda, considerando peixes alimentados com o nível de suplementação de 43 g kg⁻¹ de SL

foram identificados sete lipídios das classes DG, TG, PA, fosfatidilcolina (PC) e esfingomielina (SM) em maior intensidade, e um TG em menor intensidade quando comparado com nível 0 g kg⁻¹ de SL. Com base nos dados do estudo anterior, acerca dos efeitos destes níveis de suplementação de lecitina de soja sobre o ganho de peso, tais classes têm potencial de serem novos biomarcadores lipídicos do estado fisiológico de tilápias-do-nilo em condições subótimas de temperatura, comuns na criação desta espécie, em particular em regiões tropicais.

Palavras-chave: tilápia-do-nilo, nutrição, fosfolipídios, lipidômica, espectrometria de massas.

3.1 INTRODUÇÃO

Os lipídios representam um dos grupos de biomoléculas com maior diversidade estrutural e funcional (NELSON; COX, 2004). Constituem-se em importante fonte de energia para o metabolismo, atuam como componentes estruturais das membranas celulares e precursores de hormônios, além de serem fonte de ácidos graxos essenciais para síntese de eicosanoides, compostos bioativos com múltiplas funções reguladoras no organismo (TOCHER, 2003).

Entre as moléculas lipídicas, os principais componentes dos tecidos dos peixes são: diacilglicerol (DG), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) e triacilglicerol (TG) (RUIZ-LOPEZ et al., 2015). TG é a principal classe de lipídios neutros utilizada pelo organismo como forma de armazenamento de energia, enquanto PC e PE são as principais classes de lipídios polares que atuam principalmente como componentes das membranas celulares, desempenhando papéis cruciais na regulação da estrutura, fluidez e transdução de sinais (TOCHER, 2003). Porém, fatores naturais, incluindo mudanças na temperatura, nutrição, reprodução e exposição a poluentes podem alterar o metabolismo lipídico e, consequentemente, a composição lipídica das membranas celulares (MARQUEÑO et al., 2019).

Organismos ectotérmicos, como os peixes, são mais suscetíveis aos efeitos do estresse térmico, já que sua temperatura interna e metabolismo são influenciados pela temperatura da água. Portanto, desenvolveram mecanismos adaptativos para manter a funcionalidade das membranas com a redução na temperatura ambiente, tais como aumento da proporção dos ácidos graxos insaturados nos fosfolipídios das membranas e reestruturação de grupos na porção polar das moléculas dos fosfolipídios (CORRÊA et al., 2023; LIU et al., 2020; TEETS; DENLINGER, 2013). No

entanto, são raros os estudos em espécies de peixes de águas continentais que focam na identificação de lipídios corporais ou na interferência da composição lipídica de dietas no metabolismo, em resposta a estressores ambientais (MARQUEÑO et al., 2019).

Embora existam alguns estudos que avaliem as alterações dos lipídios frente a mudanças ambientais e/ou nutricionais em tecidos de peixes, estes focam principalmente na determinação de lipídios por cromatografia gasosa (CG), normalmente limitando-se à análise do perfil de ácidos graxos (DE SOUZA et al., 2020; FERNANDES et al., 2014). A lipidômica, por outro lado, permite a identificação de uma ampla gama de moléculas lipídicas presentes nas células, a partir de técnicas analíticas como a espectrometria de massa de alta resolução com separação cromatográfica (DUNN; ELLIS, 2005; GOODACRE et al., 2004). Uma segunda abordagem utilizada para avaliação do lipidoma são os métodos de injeção de fluxo acoplada a espectrometria de massa (do inglês *flow injection analysis-mass spectrometry*, FIA-MS), onde as amostras não são separadas previamente por coluna cromatográfica. Embora não sejam tão sensíveis e específicos como os métodos de separação por coluna, geralmente são mais baratos, mais rápidos e/ou demandam menos preparação de amostra (DUNN; ELLIS, 2005; SILVA et al., 2014; YEO; PARRISH, 2021). O FIA-MS foi aplicado para identificar e quantificar fosfolipídios no tecido muscular de salmão (*Salmo salar*), com foco na distribuição dos ácidos graxos da série n-3 nos fosfolipídios, bem como para identificar e quantificar eicosanoides (YEO; PARRISH, 2021).

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) é a terceira espécie de peixe mais produzida no mundo (FAO, 2022). É uma espécie tropical, com temperatura de conforto entre 26 e 30°C (AZAZA; DHRAÏEF; KRAÏEM, 2008; MA et al., 2015). Entretanto, as maiores regiões produtoras de tilápia no Brasil, além de em outros grandes países produtores, como China, Egito e Índia, estão localizadas em latitudes subtropicais. Assim, a tilápia fica sujeita a grandes variações de temperatura entre o verão e inverno, que resultam em diminuição do crescimento e podem provocar mortalidade e consequente perda econômica (MA et al., 2015; PIMOLRAT et al., 2013; SHI et al., 2015). Estudos recentes demonstram que a adequação da nutrição nos períodos mais frios do ano é essencial para sobrevivência e crescimento dos animais, principalmente por meio do fornecimento de um perfil lipídico adequado na dieta (NOBREGA et al., 2020).

Diante do exposto, supõe-se que a suplementação de fosfolipídios na dieta de juvenis de tilápia-do-nilo, quando criados em temperatura subótima, possa auxiliar nas respostas fisiológicas, promovendo maior crescimento e saúde. Com efeito, no estudo de BATISTA *et al.*, (2023) foi demonstrado que tal suplementação, na faixa de 42 a 50 g kg⁻¹ de lecitina de soja em dietas práticas, realmente melhora o ganho em peso, eficiência alimentar, digestibilidade dos nutrientes da dieta, além de reduzir a deposição de gordura corporal e dos índices viscerossomático e hepatossomático. Já no presente estudo, com auxílio da lipidômica, pretende-se aprofundar o conhecimento sobre as alterações ocorridas em uma ampla gama de moléculas lipídicas, após a suplementação dietética com lecitina de soja – fonte de fosfolipídios – em temperatura subótima, a qual resultou em aumento do desempenho. O objetivo é avaliar as alterações lipídicas que ocorrem no hepatopâncreas – importante órgão regulador do metabolismo lipídico em peixes – por meio de três técnicas de detecção: cromatografia gasosa para análise do perfil de ácidos graxos, injeção de fluxo direto acoplada à espectrometria de massas (FIA-MS) para analisar o perfil geral dos lipídios dos peixes alimentados com cada tratamento dietético e através da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) identificar as espécies lipídicas que possam estar relacionadas as respostas de crescimento ou excesso de lipídios dietéticos.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Planejamento experimental, peixes e dietas

As condições experimentais, peixes e dietas utilizadas no presente estudo são as mesmas já descritas no primeiro artigo (BATISTA *et al.*, 2023). Brevemente, juvenis de tilápia-do-nilo da linhagem GIFT (Epagri SC03, geneticamente melhorada para tolerância ao frio), sexualmente invertida para macho, foram obtidos da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI, Itajaí, SC, Brasil). O manejo dos peixes seguiu o protocolo # 3641231120, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC).

Os peixes foram inicialmente aclimatados às condições de laboratório em tanques de 1.000 L a 28 °C, por duas semanas. Posteriormente, grupos de 25 peixes foram distribuídos em 24 tanques de 100 L (cada tanque foi considerado uma unidade

experimental). Os peixes foram aclimatados às unidades experimentais a 28°C por uma semana, após esse período, a temperatura da água foi gradualmente reduzida de 28 para 22 °C (1 °C por dia) e mantida em 22 °C, com auxílio de um trocador de calor conectado ao sistema de recirculação de água. A temperatura de 22 °C é o objeto de estudo pois remete a temperatura média da água nos meses de outono e inverno em regiões subtropicais.

O peso inicial dos peixes ao final do período de aclimação foi de $12,22 \pm 0,09$ g (peso médio $\pm$ erro padrão). Durante o período experimental (90 dias), os peixes foram alimentados com as dietas experimentais detalhadas abaixo, duas vezes ao dia (10:00 e 18:00 h) até a saciedade aparente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, incluindo seis repetições para cada dieta experimental testada, totalizando 24 tanques.

As dietas experimentais (tratamentos) continham níveis crescentes de lecitina de soja (do inglês, *soy lecithin*, SL), como fonte de fosfolipídios (0,0; 21,0; 43,0 e 64,0 g kg⁻¹; denominadas 0SL, 21SL, 43SL e 64SL, respectivamente). Consequente a inclusão de lecitina, as dietas também continham níveis crescentes de lipídios totais, variando de 6,71 a 8,74% na matéria seca. Maiores detalhes dos parâmetros de fabricação e composição das dietas estão descritos em BATISTA *et al.*, (2023).

3.2.2 Coleta de amostras

Ao final do período de alimentação, os peixes foram submetidos a jejum de 24 h, sedados com anestésico a 50 mg L⁻¹ (Eugenol®, Biodinâmica, Ibiporã, Brazil), pesados e eutanasiados por overdose (200 mg L⁻¹) de anestésico, seguido de secção da coluna vertebral.

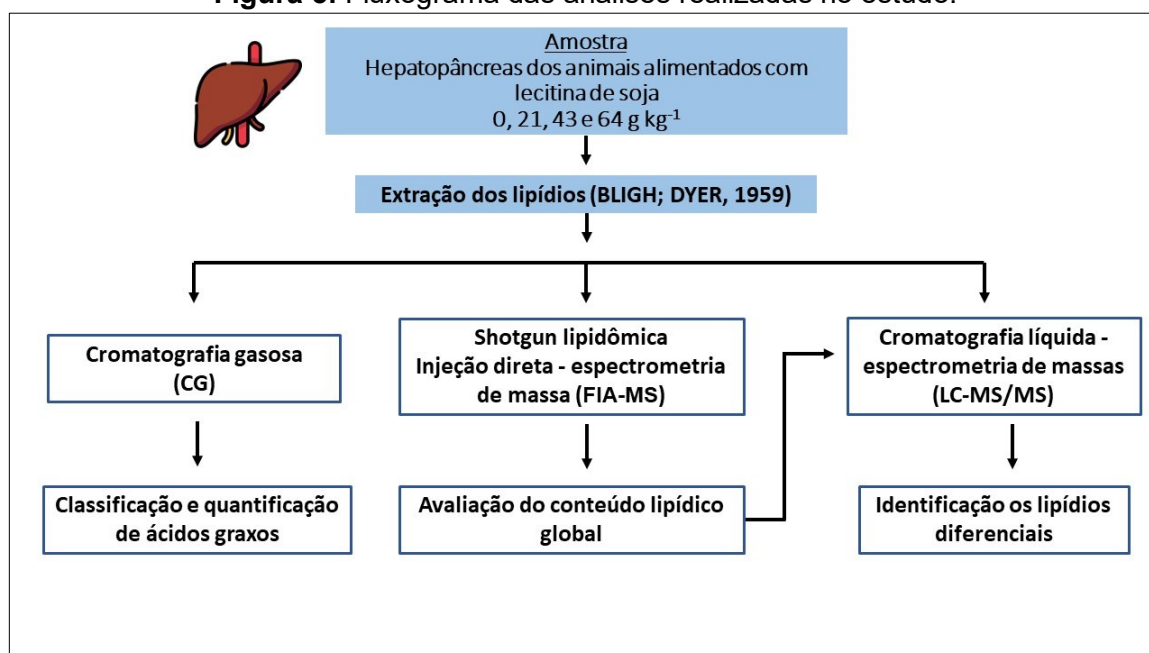
O hepatopâncreas de cinco peixes por unidade experimental foi amostrado e agrupados, formando uma única amostra, tanto para a análise de ácidos graxos como para a lipidômica. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente liofilizadas e armazenadas a -20 °C até análise.

3.2.3 Análises químicas

3.2.3.1 Análises lipídicas

Para identificar o perfil dos lipídios no hepatopâncreas da tilápia-do-nilo alimentada com níveis crescentes de lecitina de soja e criada em temperatura subótima, utilizou-se três técnicas analíticas (Figura 3). A primeira técnica foi a cromatografia gasosa (CG) com o objetivo de identificar o perfil de ácidos graxos. Para análise da lipidômica global no hepatopâncreas usamos a injeção direta acoplada à espectrometria de massas (FIA-MS), por ser uma técnica útil para avaliar o conteúdo lipídico global e alterações metabólicas em células. Além disso, a FIA-MS é uma análise de curta duração, com menor custo e possibilita a determinação do perfil lipídico das amostras, auxiliando na seleção dos estudos para posterior análise em LC-MS/MS. Por fim, os extratos lipofílicos do hepatopâncreas foram avaliados através da cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) – uma técnica mais robusta e com separação por coluna – que permite avaliações do perfil lipídico de tratamentos selecionados por meio do perfil geral FIA-MS, possibilitando melhor identificação dos lipídios diferenciais.

Figura 3. Fluxograma das análises realizadas no estudo.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.2.3.2 *Reagentes químicos*

Os reagentes e solventes clorofórmio e metanol utilizados possuíam nível de pureza HPLC, já os reagentes acetonitrila, ácido fórmico e 2-propanol eram nível LC-MS. A água Milli-Q utilizada foi produzida utilizando ddH₂O, marca Millipore. O padrão interno de lipídios utilizado foi o SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard (Cat. No. 330707), da marca Avanti Polar Lipids (Alabaster, EUA). A mixagem de ajuste ESI-L LC/MS (Cat. No. G1969-85.000) foi da Agilent (Santa Clara, EUA).

3.2.3.3 *Ácidos graxos por cromatografia gasosa*

As medições de ácidos graxos no hepatopâncreas foi realizada por cromatografia gasosa. O hepatopâncreas (1 g, em duplicata por unidade experimental, material liofilizado) foram extraídos a frio e quantificados pelo método descrito por Bligh and Dyer (1959). Os ácidos graxos foram esterificados usando o método descrito por O'Fallon et al. (2007) e separados por cromatógrafo de gás (7890 B; Agilent, Santa Clara, EUA) com um detector FID e uma coluna capilar CP-Sil 88 (60 m, 0,25 mm, 0,20 µm, gaiola de 7 polegadas; Agilent, Santa Clara, EUA). As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura do detector, 300 °C; temperatura do injetor, 240 °C; temperatura inicial da coluna, 120 °C por 10 min, programada para aumentar a uma taxa de 3 °C min⁻¹ até 186 °C, mantida por 5 min e depois aumentada novamente a 3 °C min⁻¹ até o final temperatura de 231 °C. Hélio foi usado como gás de arraste e hidrogênio, como gás de complementação com uma vazão de coluna de 2,5 mL min⁻¹. A injeção foi realizada no modo Split (1:40). Os ácidos graxos foram identificados com base no tempo de retenção de dois padrões: MIX 37 (SUPELCO, Bellefont, EUA) e óleo de menhaden (SUPELCO, Bellefont, EUA). As concentrações de ácidos graxos nas amostras foram calculadas de acordo com os métodos descritos por (JOSEPH; ACKMAN, 1992), usando como padrão interno o ácido graxo 23:0 (Sigma, Saint Louis, EUA).

3.2.3.4 *Extração dos lipídios para FIA-MS e LC-MS/MS*

Para as análises FIA-MS e LC-MS/MS foram utilizadas três repetições de cada tratamento (a amostra de cada repetição era composta por um pool de cinco peixes). A extração de compostos lipofílicos do fígado de tilápia-do-nilo para uso em análises FIA-MS e LC-MS/MS foi realizada pelo método de Bligh e Dyer (1959), com

as modificações descritas a seguir. O tecido hepático liofilizado (150 mg) foi misturado com 2 mL de clorofórmio, 1 mL de metanol e 1 mL de água em um frasco de vidro de 15 mL. A mistura foi homogeneizada em mesa agitadora por 30 min. Posteriormente, 1,5 mL de clorofórmio:metanol (2:1) foi adicionado. As amostras foram submetidas a ultrassom por 30 min, seguido por centrifugação a 3500 x g por 2 min. A camada orgânica (inferior), contendo os compostos lipofílicos, foi transferida para um frasco de vidro limpo. O solvente orgânico nos frascos foi removido por evaporação com nitrogênio e os frascos armazenados a -80°C para análises posteriores.

3.2.3.5 *Análise de espectrometria de massas*

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular (LABIME, UFSC), em um instrumento microTOF-QII-MS (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha).

Após extração, as amostras foram primeiro dissolvidas em 1500 µL de solvente, que consistia em 2-propanol/acetonitrila/água (ISO/CAN/H₂O, 85:10:5 v/v/v). Após adicionado o solvente, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 30 segundos. Em seguida, 50 µL de amostra dissolvida foram misturados com 60 µL de uma solução contendo 10% Splash Lipidomix (330707, Avanti Polar Lipids, Alabaster, EUA) como padrão interno e 90 µL de solvente de amostra para obter um volume final de amostra de 200 µL com 3% Splash Lipomix. As amostras foram mantidas a 4 °C.

Uma solução de controle de qualidade (CQ) também foi preparada misturando-se 10 µL de cada uma das amostras. O objetivo deste CQ (amostra composta) foi avaliar a reprodutibilidade das metodologias propostas, bem como a robustez dos resultados quimiométricos obtidos.

3.2.3.6 *Instrumentação FIA-MS*

Os experimentos FIA-MS foram realizados usando o amostrador automático de uma unidade de separação por cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) Shimadzu LC20AD (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) (sem a coluna) injetando 5 µL de amostra diretamente na corrente de fluxo de um 85:10:5 (v/v/v) mistura de 2-propanol:acetonitrila:água contendo 5 mM de acetato de amônio e 0,1% de ácido fórmico como transportador acoplado ao

espectrômetro de massa. A taxa de fluxo do gradiente começou com $75 \mu\text{L}^{-1}$ por 2 min para análise da amostra, seguida por uma lavagem com $500 \mu\text{L}^{-1}$ por 1,0 min e um reequilíbrio para a condição inicial, resultando em um tempo total de execução de 5 min por amostra.

Os espectros de massa de eletrospray de alta resolução (ESI-MS, do inglês *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*) foram adquiridos no modo de íon positivo (ESI+) e negativo (ESI-) em tensão capilar de 4'000 V (-4'000 V), deslocamento da placa final de -500 V (500 V), com uma pressão de nebulizador N_2 de 0,8 bar e vazão de gás seco de 4L min^{-1} a 200°C . Os espectros de massa foram adquiridos na faixa de massa de m/z 100 a 1550 e taxa de 1,0 Hz. Para experimentos de dissociação induzida por colisão, as medições foram realizadas no modo MS/MS automático não direcionado.

Trezentos e sete varreduras de MS foram obtidas para cada amostra durante a execução de 5 min. Amostras e brancos foram injetados três vezes para obter réplicas técnicas e amostras CQ foram injetadas no início da execução, após cada 15 injeções e no final de toda a execução para verificar a estabilidade do equipamento.

3.2.3.7 Instrumentação LC-MS/MS

Os experimentos de LC-MS/MS foram realizados usando um sistema de cromatografia líquida HPLC Shimadzu LC20AD (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) acoplado ao espectrômetro de massa. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Poroshell 120 HPH-C18 $2,1 \times 100 \text{ mm } 2,7\mu\text{M}$ (Agilent, Santa Clara, EUA) usando um gradiente com solvente A (40% acetonitrila, 0,1% ácido fórmico, 10 mM acetato de amônio) e solvente B (álcool isopropílico a 90%, acetonitrilo a 10%, ácido fórmico a 0,1%, acetato de amônio 10 mM). Um gradiente de 30 min foi criado começando com 40% B por 1 min, atingindo 99% B aos 21 min, mantido por 4 min e depois revertido para 40% B por mais 1 min e mantido 40% B até 30 min. A temperatura da coluna foi fixada em 40°C e o volume de injeção foi de $5 \mu\text{L}$.

Os espectros ESI-MS foram adquiridos no mesmo modo que para FIA-MS. Alternativamente, para aquisição adicional de espectros de MS/MS direcionados, as amostras foram introduzidas no espectrômetro de massa usando uma seringa hermética a gás Hamilton de $250 \mu\text{L}$ (Reno, NV) e uma bomba Harvard Apparatus a uma taxa de fluxo de $3 \mu\text{L min}^{-1}$. Para investigações MS/MS, a dissociação induzida por colisão foi empregada e a energia de colisão foi ajustada em 10–45 eV, sendo que

ambos os analisadores quadrupolo e (Q)TOF foram empregados. O analisador de massa foi calibrado usando-se uma solução de mistura de ajuste de baixa concentração Agilent ESI-L (Agilent, EUA).

3.2.3.8 *Matriz dos dados*

Para os estudos de classificação dos lipídios, os dados brutos obtidos pelo FIA-MS e LC-MS/MS foram inicialmente processados com o software livre MZmine para fazer a transição para um formato de saída mzML 3 (ProteoWizard, Palo Alto, CA, EUA). Os arquivos mzML foram transformados nas matrizes de dados de trabalho, contendo as impressões digitais ESI-MS, usando-se o software mzMine3 de acordo com a metodologia proposta por (VILÀ *et al.*, 2022). Aplicou-se 32 bits de precisão de codificação binária e Threshold Peak Filter para simplificação de dados.

As impressões digitais FIA-MS foram transformadas em matrizes de dados de trabalho (intensidades de sinal de íons arranjadas em função das amostras em colunas e variáveis m/z em linhas) usando o software mzMine 3 (PLUSKAL *et al.*, 2010). A primeira etapa foi a detecção de massa por transformada wavelet, que gera listas de massa para cada uma das varreduras adquiridas em uma amostra. Assim, a lista transformada foi selecionada como detector de massa, pois é a mais útil para espectrometria de massa de baixa resolução. Um intervalo de tempo de pico de 0,00 a 1,48 min foi definido, bem como a polaridade correspondente. Um nível de ruído de $4,0 \times 10^4$, um nível de escala de 3 e um tamanho de janela de wavelet de 30% também foram considerados. A próxima etapa foi remover sinais falsos com o filtro de pico de ombro FTMS, definindo uma função de modelo de pico gaussiano e uma resolução de massa de 70.000. Então, para extrair cromatogramas de íons para massas que foram detectadas continuamente por um determinado tempo, o construtor de cromatograma ADAP foi usado, definindo um tamanho mínimo de grupo de varredura de cinco, um limite de intensidade de grupo de $4,0 \times 10^4$, uma intensidade mínima mais alta de $1,0 \times 10^4$, e uma tolerância m/z de 5000 ppm, que é equivalente a 1 m/z. Por fim, o Join Aligner foi realizado para permitir a correspondência das massas detectadas nas amostras analisadas; portanto, uma tolerância m/z de 5000 ppm, um peso para m/z de 80, uma tolerância de tempo de retenção de dois min, e um peso de mobilidade de um foram definidos, obtendo assim a lista de recursos alinhada que foi finalmente exportado como formato CSV e pronto para posterior análise multivariada.

As dimensões das matrizes de dados obtidas (amostras + QCs × variáveis) foram (138 × 320) e (138 × 339) para o modo de ionização negativa e positiva, respectivamente.

3.2.3.9 Identificação dos lipídios

As identificações lipídicas foram determinadas com base na precisão (erro <10 ppm) da massa, usando-se os bancos de dados SWISS LIPIDS [swisslipids.org] e LIPIDMAPS [lipidmaps.org], além da confirmação nos padrões de fragmentação observados nos espectros de MS/MS, quando disponíveis, e/ou no tempo de retenção.

3.2.4 Análise estatística dos dados

Para avaliar a composição em ácidos graxos do hepatopâncreas em resposta à inclusão de lecitina de soja na dieta, os quais foram mensurados por cromatografia gasosa, os dados foram submetidos ao teste de regressão, utilizando-se o software Statistica 13.0 (Statsoft Inc. Tulsa, EUA) e adotando-se o nível de significância de 5%.

As matrizes de dados obtidas das análises de FIA-MS e LC-MS/MS foram aplicadas utilizando-se o software online Metaboanalyst 5.0 (metaboanalyst.ca). Os dados foram normalizados a partir da seleção dos seguintes métodos: normalização por soma constante, transformação de dados em Log10 e escala de dados de Pareto. Para avaliar a segregação máxima entre perfis lipídicos dos peixes, obtidos através da análise de FIA-MS, realizou-se a análise de discriminante parcial de mínimos quadrados (PLS-DA). Já a análise de cluster de mapa de calor (*heatmap*) foi usada para organizar os lipídios de acordo com a similaridade e reter as variáveis mais contrastantes.

Após avaliar a separação dos grupos através da análise de FIA-MS, a análise de LC-MS/MS foi realizada para comparação do perfil lipídico entre três grupos. Primeiramente foi realizada a comparação entre o perfil lipídico dos peixes alimentados com as dietas 0SL, 43SL e 64SL, onde foi realizada a análise de PLS-DA para identificar as diferenças entre os grupos, a análise de ANOVA (FDR, False Discovery Rate, nível de significância 5%) seguida do teste de Tukey para confirmar as diferenças significativas derivadas de PLS-DA, e a análise de *heatmap*.

A análise discriminante ortogonal de mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) – um modelo de reconhecimento de padrão supervisionado - foi utilizado para

construir os modelos preditivos para avaliar a diferença entre os grupos tratados (0SL versus 43SL). A lista VIP (*variable influence on projection*) ($VIP > 1,0$ e $p < 0,01$), obtida do OPLS-DA, foi usada para determinar metabólitos significativamente alterados. Um teste t foi usado para confirmar as diferenças significativas derivadas de OPLS-DA, e o nível de significância foi estabelecido em 1%. Todos os gráficos das análises de FIA-MS e LC-MS/MS foram gerados usando o MetaboAnalyst 5.0, um sistema de análise de dados disponível online.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Composição de ácidos graxos no hepatopâncreas

A composição dos ácidos graxos da série n-3 no hepatopâncreas da tilápia-do-nilo, criada em temperatura subótima, foi influenciado pela inclusão de diferentes concentrações de lecitina de soja na dieta, apresentando uma resposta linear (Tabela 8). Os peixes alimentados com as maiores concentrações de lecitina de soja na dieta apresentaram uma redução na concentração dos ácidos 18:3 n-3 (α -LNA, ácido linolênico); 20:5 n-3 (EPA, ácido eicosapentaenoico) e do total PUFA n-3 no hepatopâncreas. Por outro lado, o conteúdo hepático dos ácidos graxos 22:6 n-3 (DHA, ácido docosaexaenoico) e do LC-PUFA n-3 total apresentaram um leve aumento nos maiores nível de inclusão de lecitina. Os demais ácidos graxos e grupos de ácidos graxos não apresentaram diferenças significativas no seu conteúdo entre os peixes alimentados com níveis crescentes de lecitina de soja.

Tabela 8 – Perfis de ácidos graxos do hepatopâncreas de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com níveis crescentes de lecitina de soja.¹

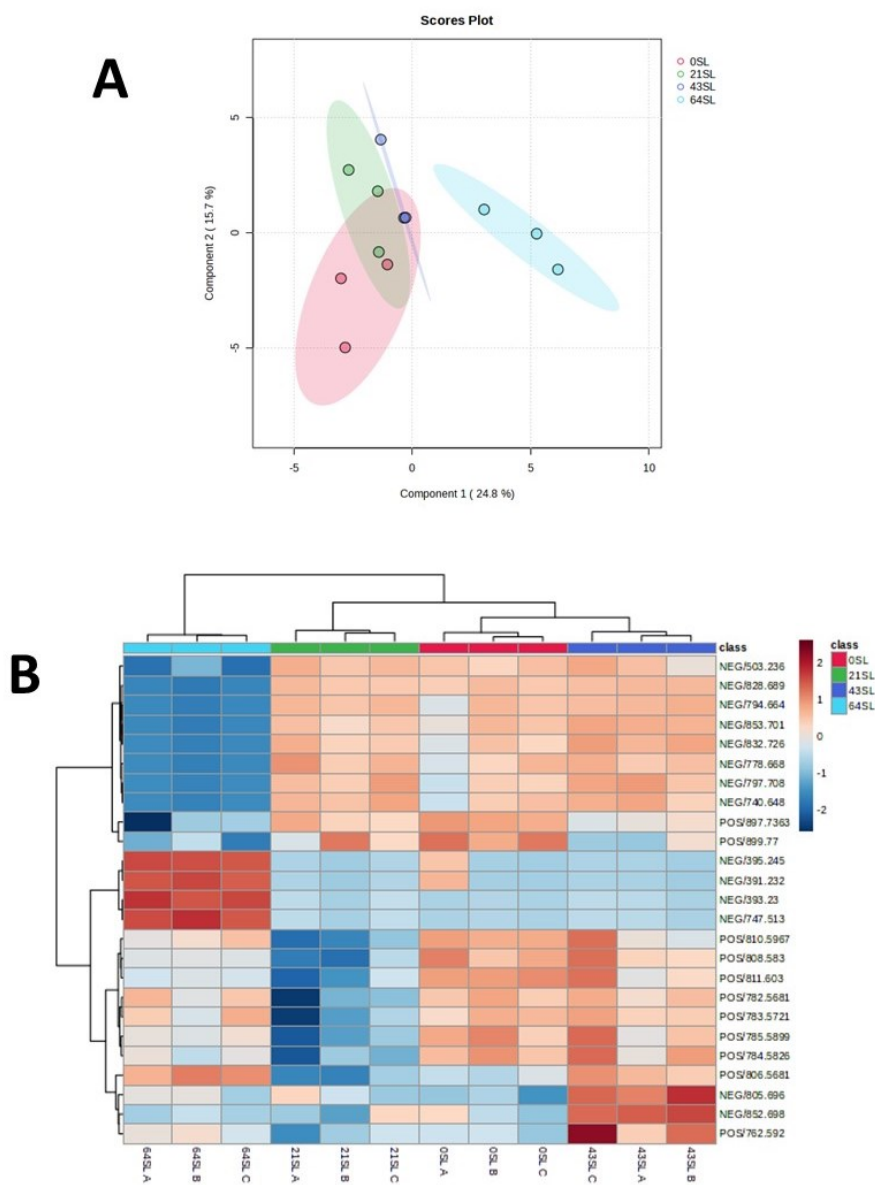
Ácidos graxos, mg 100 g tecido ⁻¹	Dietas ⁴				Pooled SEM	Valor de p regressão ⁵
	0SL	21SL	43SL	64SL		
C14:0 ²	0,49	0,51	0,49	0,50	0,04	0,790
C16:0	3,60	3,81	3,73	3,82	0,10	0,071
C18:0	1,47	1,68	1,59	1,69	0,11	0,109
C16:1 n-7	0,69	0,73	0,71	0,72	0,08	0,733
C18:1 n-7	0,41	0,39	0,42	0,40	0,02	0,714
C18:1 n-9	6,72	6,71	6,13	6,33	0,38	0,050
C18:2 n-6	0,50	0,45	0,42	0,53	0,07	0,811
C20:4 n-6	0,17	0,16	0,16	0,17	0,02	0,973
C22:4 n-6	0,30	0,26	0,27	0,27	0,04	0,334
C18:3 n-3	0,56	0,58	0,52	0,45	0,04	0,002
C20:5 n-3	0,05	0,03	0,03	0,02	0,01	0,006
C22:6 n-3	0,03	0,04	0,05	0,06	0,01	<0,001
SFA ³	5,72	6,15	5,95	6,16	0,13	0,052
MUFA	8,03	8,05	7,48	7,78	0,39	0,136
PUFA	2,17	2,01	1,90	2,01	0,22	0,210
PUFA n-6	1,14	1,02	0,96	1,13	0,15	0,814
LC-PUFA n-6	0,52	0,48	0,46	0,49	0,08	0,428
PUFA n-3	0,65	0,65	0,60	0,53	0,05	0,005
LC-PUFA n-3	0,07	0,08	0,09	0,09	0,01	0,016

¹ Os resultados são expressos como a média de três réplicas. ² Ácidos graxos detectados, mas com baixo teor (< 0,01 mg 100 g⁻¹): C12:0; C14:1n-5; C15:0; C17:0; C17:1n7; C16:3n4; C18:2n4; C20:0; C18:3n6; C20:1n9; C20:1n11; C20:2n6; C22:0; C20:3n6; C24:0; C24:1n9. ³ Grupos de ácidos graxos: SFA = saturado, MUFA = monoinsaturado, PUFA = poliinsaturado, LC-PUFA = poliinsaturado de cadeia longa (>20 carbonos). ⁴ SL= do inglês, *soy lecithin*, lecitina de soja. As dietas experimentais continham níveis crescentes de SL (0, 21, 43 e 64 g kg⁻¹). ⁵ Onde a regressão linear foi significativa, foram obtidas as seguintes equações: C18:3 n-3, $y = -0,0019x + 0,588$, $R^2 = 0,5471$; C20:5 n-3, $y = -0,0003x + 0,0435$, $R^2 = 0,4765$; C22:6 n-3, $y = 0,0004x + 0,0304$, $R^2 = 0,7175$; PUFA n-3, $y = -0,0018x + 0,6686$, $R^2 = 0,5006$; LC-PUFA n-3, $y = 0,0003x + 0,0724$, $R^2 = 0,3976$.

3.3.2 Perfil lipídico por FIA-MS

Para identificar as diferenças lipídicas no hepatopâncreas da tilápia-do-nilo criada em temperatura subótima e alimentada com níveis crescentes de lecitina de soja, foi realizada análise de lipidômica por infusão direta em espectrometria de massas. Um total de 403 picos foram detectados a partir das análises de ESI nos modos positivo e negativo, submetidos a análise de PSL-DA (Figura 4).

Figura 4. A análise multivariada realizada no perfil lipídico do hepatopâncreas de tilápia-do-nilo, quando alimentada com níveis crescentes 0,0; 21,0; 43,0 e 64,0 g kg⁻¹ de lecitina de soja - fonte de fosfolipídios - e criada em temperatura subótima de 22 °C. A) Gráfico de pontuações PLS-DA (análise de discriminante parcial dos quadrados mínimos) dos dados obtidos na análise de FIA-MS. B) Análise de mapa de calor (*heatmap*) das 25 espécies moleculares de lipídios diferenciais nos grupos. A cor de cada seção é proporcional ao significado da alteração lipídica (vermelho: níveis aumentados e azuis: níveis diminuídos).



A análise de PLS-DA do perfil lipídico explicou 40,5% da covariância (R^2 : 0,88, Q^2 : 0,45). O score plot do PLS-DA mostrou uma segregação clara do perfil lipídico dos peixes alimentados com 64SL, em comparação aos demais (Figura 4a). O gráfico de mapa de calor (*heatmap*) mostra os 25 espécimes moleculares de lipídios que mais representam esta segregação entre os tratamentos (Figura 4b).

Através da análise dos clusters, foi possível observar que o perfil lipídico do tratamento 43SL primeiramente é agrupado ao grupo 0SL e, posteriormente, ao grupo 21SL. O perfil lipídico do grupo alimentado com a dieta 64SL apresenta intensidade oposta das espécies moleculares, quando comparado ao dos peixes alimentados com as demais concentrações de lecitina de soja (0SL, 21SL e 43SL).

3.3.3 Perfil lipídico por LC-MS/MS

Foram detectados um total de 2517 espécimes moleculares através da análise de LC-MS/MS nos modos ESI positivo e negativo. Foram identificados nove espécimes moleculares significativamente diferentes ($p < 0,05$, ajustado por FDR) quando comparado os tratamentos 0SL, 43SL e 64SL. Por meio da análise de LC-MS/MS, os lipídios diferenciais foram identificados com base nas suas massas, tempo de retenção e nos seus padrões de fragmentação (Tabela 9).

Para avaliar as diferenças no perfil lipídico do hepatopâncreas dos peixes alimentados com as dietas 0SL, 43SL e 64SL os dados foram submetidos a análise de PLS-DA que representou 37,6% da covariância (R^2 : 0,99, Q^2 : 0,48), por meio da qual pôde ser observado uma diferenciação clara entre os perfis lipídios hepáticos dos peixes alimentados com cada dieta (Figura 5a). Dentre os lipídios significativamente modulados pelas dietas, foram identificadas diferentes espécies de triacilgliceróis (TG), diacilgliceróis (DG), ácido fosfatídico (phosphatidic acid, PA) e esterol éster (sterol ester, SE). O TG (51:1) foi de maior intensidade nos tratamentos 0SL e 43SL. O PA (30:0) e TG (O-63:5) foi observado com maior intensidade nos tratamentos 43SL e 64SL (Figura 5b). Estas espécies de lipídios podem estar relacionadas à suplementação com lecitina de soja, visto que não apareceram ou estavam em menor intensidade no tratamento sem suplementação. Os demais lipídios significativamente modulados foram detectados em maior intensidade somente no tratamento 64SL, em comparação com os tratamentos 0SL e 43SL (Figura 5b e c).

Tabela 9. Lipídios diferenciais no hepatopâncreas de tilápia-do-nilo alimentada com lecitina de soja (0,0; 43,0 e 64,0 g kg⁻¹) e criada em temperatura subótima, identificados usando impressão digital celular baseada em LC-MS/MS. Siglas representam: DG, Diacilglicerol; PA, Ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; SE, Esterol éster; SM, Esfingomielina; TG, Triacilglicerol.

m/z Observado pelo LC-MS	Tempo de retenção (min)	m/z teórico	Erro da massa (em ppm)	Nível de experimento MS para ID	Atribuição dos lipídios*
429,3716	21,37	429,3727	-2,5	MS1	SE (29:1) [M+H] ⁺
549,4886	20,65	549,4877	1,6	MS1	DG (32:1) [M+H-H ₂ O]
591,4971	16,96	591,49591	2,01	MS2	DG (32:0) [M+Na] ⁺
603,4424	15,33	603,4408	2,6	MS2	PA (30:0) M+H-H ₂ O
673,5239	11,17	673,52789	-5,9	MS1	SM (d32:2) [M+H] ⁺
818,6033	15,08	818,6058	-2,94	MS2	PC (40:5) [M+H-H ₂ O] ⁺
					TG (48:1)
822,7574	22,57	822,7545	3,5	MS2	14:0/16:0/18:1[M+NH ₄] ⁺
837,7739	21,37	837,7694	5,3	MS1	DG (53:4)[M+H] ⁺
856,7411	21,55	856,7389	2,56	MS1	TG (51:5) [M+NH ₄] ⁺
861,7716	20,98	861,7694	2,5	MS2	TG (O-55:6) [M+H-H ₂ O] ⁺
882,7572	20,98	882,75452	3,03	MS2	TG (53:6) [M+NH ₄] ⁺
					TG (52:1) (16:0/18:0/18:1) [M+Na] ⁺
883,7692	21,33	883,7725	-2,1	MS2	
909,8589	22,55	909,8633	-4,83	MS2	TG (O-58:3) [M+H-H ₂ O] ⁺
917,8296	21,56	917,8280	1,7	MS2	DG (O-57:5) [M+Na] ⁺
975,9073	22,63	975,9103	-3,07	MS1	[M+H-H ₂ O] ⁺
984,8078	19,72	984,80145	6,44	MS1	TG (61:11) [M+NH ₄] ⁺

Ainda, comparando-se o perfil dos lipídios dos peixes alimentados com os tratamentos sem suplementação de lecitina de soja (0SL) e os peixes alimentados com 43SL, o perfil lipídico no hepatopâncreas destes animais foram claramente separados pelos dois primeiros componentes que, por sua vez, compreenderam 43,6% da covariância (R^2 : 0,99, Q^2 : 0,30) (Figura 6a).

Usando os critérios de valor VIP (*fold change* >2,0) e nível de significância de 1%, oito espécies de lipídios apresentaram diferenças significativa entre o perfil dos lipídios dos peixes alimentados com as duas dietas, 0SL e 43SL, incluindo espécies dos grupos DG, TG, PC, PA e SM (Figura 6 e 7). Como mostrado no *volcano plot* e *heatmap*, TG (48:1) (Figura 8) foi detectado em alta intensidade nos peixes alimentados com a dieta 0SL, e os demais lipídios apresentaram maior intensidade em 43SL.

Figura 5. Análise multivariada realizada no perfil lipídico do hepatopâncreas da tilápia-do-nilo, quando alimentada com lecitina de soja (soy lecithin, SL), nos níveis de inclusão de 0,0; 43,0 e 64,0 g kg⁻¹ - e criada em temperatura subótima de 22 °C. A) Gráfico de pontuações PLS-DA (análise de discriminante parcial dos quadrados mínimos) dos dados obtidos da análise de LC-MS. B) Análise de mapa de calor (*heatmap*) das nove espécies moleculares de lipídios diferenciais nos grupos. A cor de cada seção é proporcional ao significado da alteração lipídica (vermelho: níveis aumentados e azuis: níveis diminuídos). C) Lipídios significativamente diferentes resultantes da análise de ANOVA, seguida do teste de Tukey ($p > 0,05$, ajustado por FDR). DG, diacilglicerol; PA, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; SM, esfingomieline; SE, esterol éster; TG, triacilglicerol.

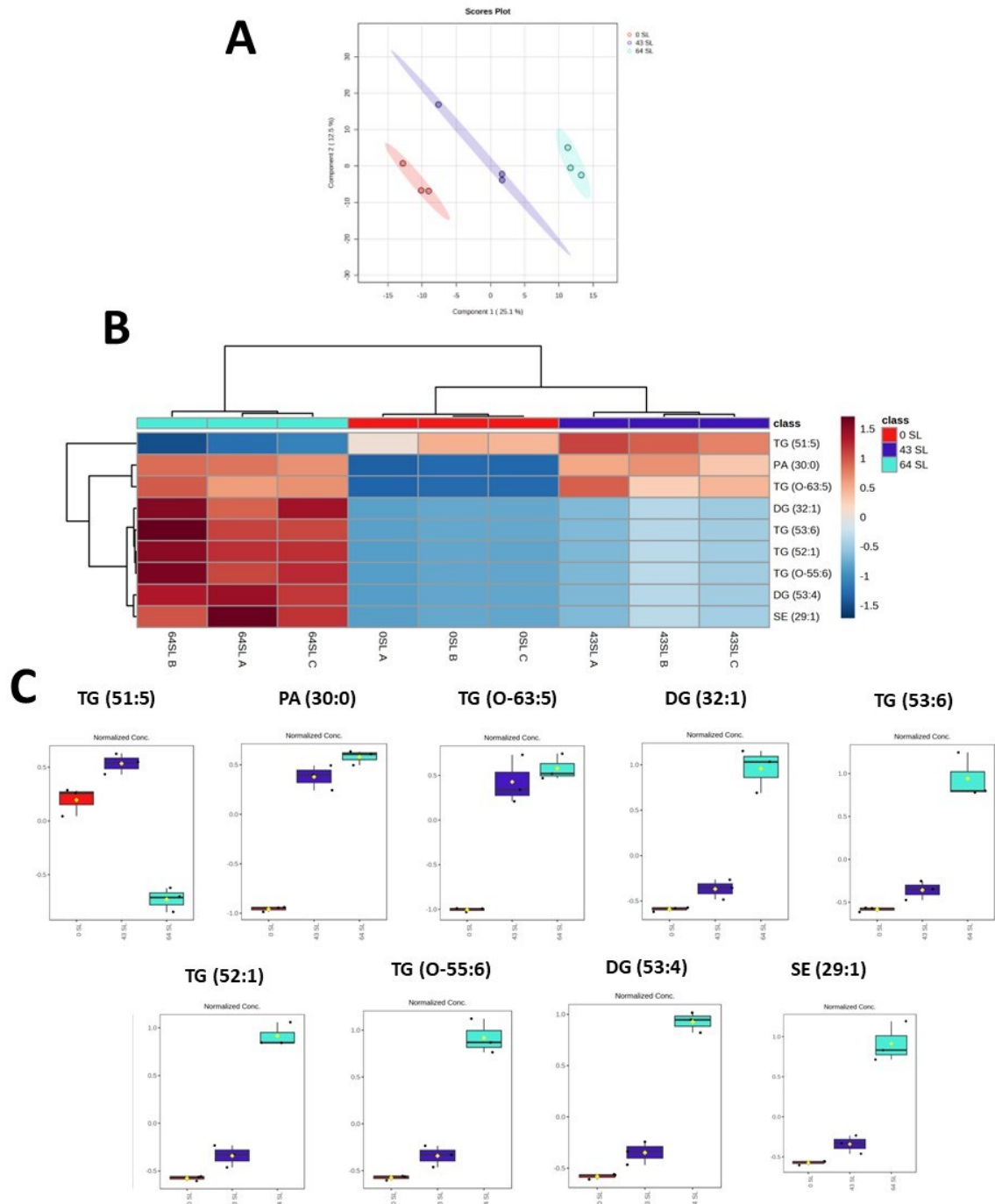


Figura 6. Análise multivariada realizada no perfil lipídico do hepatopâncreas da tilápia-do-nilo, alimentada com lecitina de soja, nos níveis de inclusão de 0,0 e 43,0 g kg⁻¹ - e criada em temperatura subótima de 22 °C. A) Gráfico de pontuações OPLS-DA dos dados obtidos da análise de LC-MS/MS. B) Top oito espécies lipídicas, de acordo com os valores de *loadings* 2 do OPLS-DA. C) O gráfico do vulcão dos grupos 0SL e 43SL. A significância estatística foi avaliada pelo teste t ($p < 0,01$) e a mudança de dobra foi definida como > 2.0 . DG, diacilglicerol; PA, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; SM, esfingomiélin; TG, triacilglicerol.

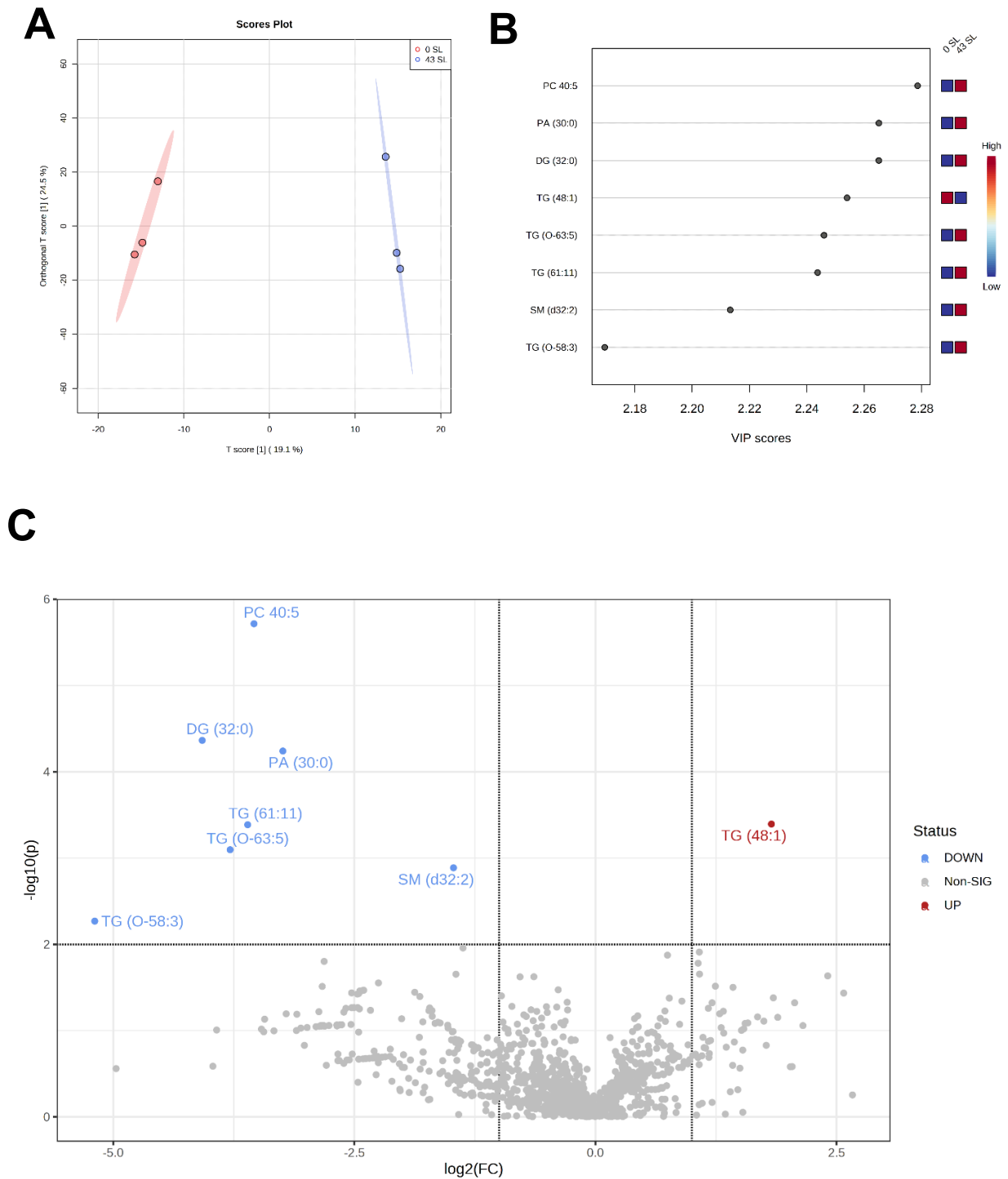


Figura 7. A e B) Mapa de calor (*heatmap*) de espécies lipídicas significativamente diferenciais ($p < 0,01$) no hepatopâncreas da tilápia-do-nilo quando alimentada com lecitina de soja (soy lecithin, SL), nos níveis de inclusão de 0,0 e 43,0 g kg⁻¹ - e criada em temperatura subótima de 22 °C. O vermelho indica um alto nível de lipídios, enquanto o azul indica um baixo nível. DG, diacilglicerol; PA, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; SM, esfingomiéline; TG, triacilglicerol.

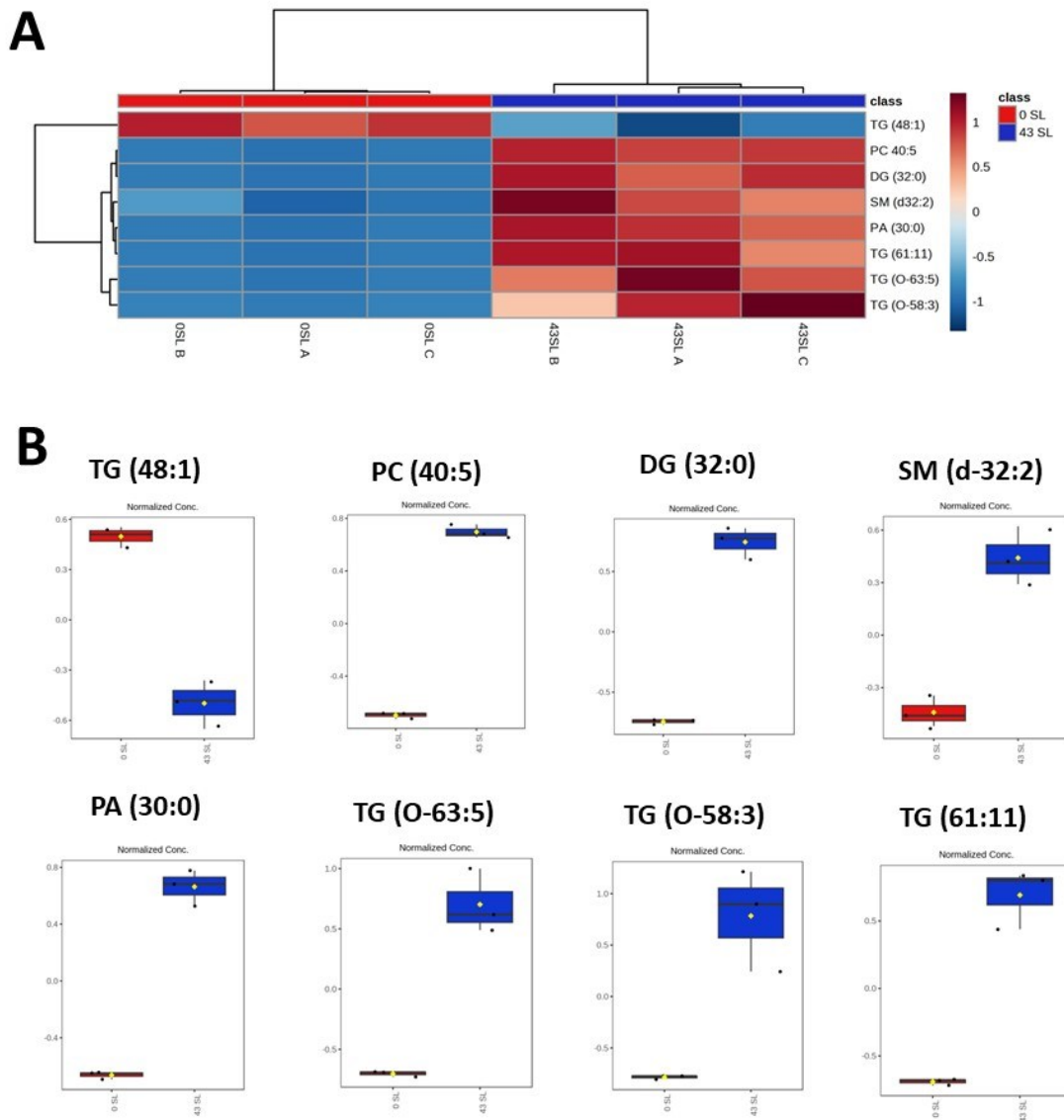
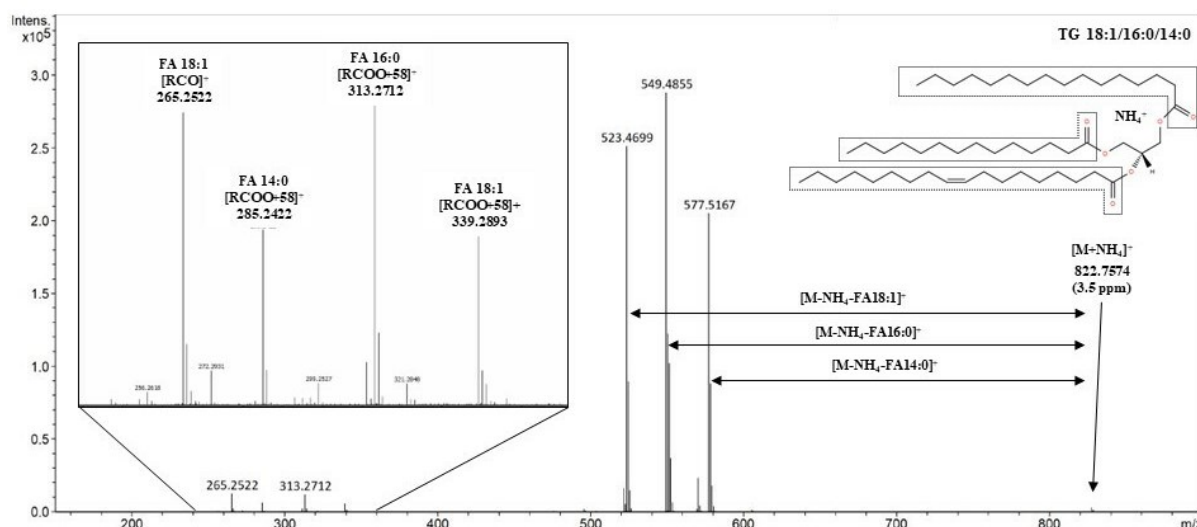


Figura 8. Espectro do LC-MS/MS da m/z 822,7574, demonstrando fragmentos típicos utilizados para identificação de uma triacilglicerol 48:1 (18:1/16:0/14:0).



Fonte: Elaborado pela autora.

3.4 DISCUSSÃO

Os resultados da análise de lipidômica via FIA-MS e LC-MS/MS, juntamente com a composição de ácidos graxos por CG, demonstraram que a suplementação dietética com lecitina de soja influenciou na composição lipídica do hepatopâncreas da tilápia-do-nilo criada em temperatura subótima.

É conhecido que a composição dos ácidos graxos do corpo dos peixes é influenciada pela composição lipídica das dietas ofertadas (CHEN *et al.*, 2018). Embora a composição de ácidos graxos teciduais reflita a fonte lipídica da dieta, pouca informação está disponível sobre como estas fontes lipídicas dietéticas modificam outras classes de lipídios e os perfis de espécies moleculares no hepatopâncreas (YUAN *et al.*, 2021). Mais restritas ainda são as informações sobre como as fontes lipídicas na forma de fosfolipídios podem influenciar a composição lipídica dos tecidos, já que as principais fontes de lipídios utilizadas em dietas para tilápia-do-nilo são óleos vegetais ou óleo de peixe, que são fonte de lipídios neutros, como o TG.

Neste estudo, a suplementação com lecitina de soja – fonte de fosfolipídios – para a tilápia-do-nilo em temperatura subótima, resultou em um acúmulo crescente de DHA e LC-PUFA n-3 no hepatopâncreas da tilápia-do-nilo. Este acúmulo provavelmente foi resultante de biossíntese, já que tais ácidos graxos não estavam

presentes nas dietas experimentais. A lecitina de soja é fonte de ácidos graxos da série n-6, principalmente do ácido linoleico (LOA, 18:2 n-6). Porém, as dietas suplementadas com lecitina também continham α -LNA – precursor para biossíntese de DHA – mas em menor quantidade que LOA. De fato, foi relatado que a tilápia-do-nilo expressa os genes Δ -4 / Δ -5 e Δ -6 desaturases, permitindo assim a conversão de α -LNA em EPA e EPA em DHA por duas vias diferentes, que são mediadas por estas desaturases (CORRÊA *et al.*, 2023; GLENCROSS, 2009; OBOH *et al.*, 2017). O DHA é considerado um ácido graxo de alto valor biológico, havendo uma estreita ligação entre o aumento de DHA na composição dos fosfolipídios estruturais nas células em resposta a mudanças na temperatura, como forma de manutenção da fluidez da membrana em organismos ectotérmicos (LIU *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2019).

No presente estudo, a análise de lipidômica por FIA-MS mostrou uma separação clara entre o perfil lipídico do hepatopâncreas em tilápias-do-nilo alimentadas com a maior dose de suplementação de lecitina de soja (64SL), o que representa maior diferenciação do perfil dos lipídios nos peixes alimentados com essa dose em relação aos outros níveis de suplementação. Este alto nível de inclusão de fosfolipídios na dieta para tilápia resultou em uma queda no ganho em peso, como foi relatado no primeiro artigo, BATISTA *et al.*, (2023).

Através das análises de LC-MS/MS foi possível observar uma maior intensidade no perfil de lipídios em peixes alimentados com a dieta 64SL, os quais não estavam presentes ou encontravam-se em baixa intensidade nos peixes alimentados com as dietas 0SL e 43SL, especialmente as classes de DG, TG, PA e SE. O DG é uma classe de lipídios importante, composta por lipídios que servem de intermediários nas vias biossintéticas dos TG e fosfolipídios, além de atuarem como moléculas sinalizadoras. O DG também é regulador da atividade de enzimas ligadas a vias de sinalização celular, como a proteína kinase C (PKC) e, dependendo da isoforma envolvida, pode desencadear sinais proliferativos (crescimento celular) ou apoptóticos (morte celular) (HENNEBERRY; WRIGHT; MCMASTER, 2002). Assim como o DG, o PA é um intermediário nas vias de biossíntese de lipídios e pode ativar várias proteínas de sinalização. Devido a sua importância, é crucial que os níveis intracelulares de DG e PA sejam rigorosamente regulados. Como visto em nosso estudo, o PA (30:0) e as espécies de DG (32:1) e (53:4) estavam presentes em maior intensidade no hepatopâncreas dos peixes alimentados com suplementação de

lecitina de soja nos níveis de 43 e 64 g kg⁻¹. A identificação destes metabólitos pode estar ligada à influência da lecitina de soja na síntese de novos lipídios ou sinalização celular.

Outras espécies diferenciais encontradas no hepatopâncreas da tilápia-do-nylo alimentada com o maior nível de suplementação de lecitina de soja, foram os TG (52:1, 16:0/18:0/18:1), TG (53:6) e TG(O-55:6). Os TGs são considerados lipídios de armazenamento de energia que podem ser liberado rapidamente sob demanda, sendo que o aumento da deposição de TG no hepatopâncreas dos animais pode estar associada à maior deposição de gordura (CABALLERO *et al.*, 2004). Contudo, devido às propriedades emulsificantes da lecitina de soja, já comprovado em nossos estudos com a diminuição dos índices viscerossomáticos e hepatossomáticos (BATISTA *et al.*, 2023), a maior intensidade destas espécies de TG no hepatopâncreas dos peixes alimentados com o maior nível de suplementação de lecitina não devem estar relacionadas à deposição excessiva de gordura no hepatopâncreas, mas sim à própria reserva energética dos animais.

Os esteróis são lipídios com papel essencial na estrutura, função e fisiologia celular. Como componentes importantes das membranas biológicas, os esteróis interagem com fosfolipídios e proteínas dentro da membrana, regulando assim a fluidez da membrana, a permeabilidade e as funções proteicas (BLOCH, 1983). A adição de esteróis a uma bicamada fosfolipídica diminui as diferenças entre as fases fluida e gel, o que pode tornar as membranas mais rígidas principalmente em temperaturas mais baixas (BLOCH, 1984). Adicionalmente, ésteres de esteróis (SE) são armazenados juntamente com TG na vesícula de gotículas lipídicas (KORBER; KLEIN; DAUM, 2017). Para humanos, quando a homeostase do colesterol e seus ésteres é perturbada, pode haver o aparecimento de diversas doenças como obesidade, diabetes, aterosclerose, doença de Wolman, doença de depósito de colesterol éster e até neurodegeneração (KORBER; KLEIN; DAUM, 2017). Deste modo, a maior quantidade do éster de esterol (29:1) observado no tratamento 64SL pode estar associada à regulação da fluidez da membrana da tilápia-do-nylo, já que o estudo foi desenvolvido em temperatura subótima. Apesar de SE também ter sido encontrado em peixes alimentados com a dieta 43SL, estava em quantidade significativamente menor que em peixes alimentados com a dieta 64SL. Portanto, a

maior intensidade de SE realmente deve ter sido estimulada pela maior concentração de fosfolípido na dieta.

Considerando o nível de 43 g kg⁻¹ de SL, este resultou no maior ganho de peso das tilápias-do-nilo em relação aos demais níveis de suplementação, conforme relatado por BATISTA *et al.*, (2023). A análise de lipidômica por LC/MS/MS no presente estudo revelou alterações significativas na intensidade de lipídios das classes DG, TG, PA, fosfatidilcolina (PC) e esfingomielina (SM) quando comparado ao perfil lipídico do hepatopâncreas dos animais suplementados com 0 e 64 g kg⁻¹ de SL. Deste modo, é possível sugerir que as variações das referidas classes lipídicas no hepatopâncreas dos animais alimentados com 43 e 64 SL, podem estar correlacionadas com os diferentes efeitos destes níveis de suplementação sobre o desempenho zootécnico dos animais, conforme relatado em estudo prévio.

A PC (40:5), com cadeias de ácidos graxos longas e insaturadas, apresentou maior intensidade no hepatopâncreas dos peixes alimentados com a dieta 43SL. O incremento desta PC pode estar relacionado à resposta frente à baixa temperatura da água, em particular à adaptação homeoviscosa que ocorre na membrana das células de animais ectotérmicos, sob estas condições. Adicionalmente, os PCs são os principais componentes das membranas celulares e podem atuar como precursores de diferentes moléculas de sinalização (SCHLEDER *et al.*, 2020). Em dourada (*Sparus aurata*), foi observado o aumento de PC no músculo, quando exposta a baixas temperaturas (MELIS *et al.*, 2017). Adicionalmente, Schleder *et al.*, 2017 e 2020, também relataram maior intensidade de sinal de PCs de cadeia longa e insaturada nos hemócitos de camarões (*Litopenaeus vannamei*) em resposta à exposição aguda ao frio.

Os esfingolipídios, assim como os fosfolipídios, são componentes essenciais de todas as membranas celulares eucarióticas, com papéis importantes em uma variedade de processos biológicos, incluindo divisão celular e interações célula a célula (HANNUN; OBEID, 2018). No presente estudo, a esfingomielina (d32:2) foi detectada em maior intensidade nos peixes alimentados com a dieta 43SL, o que sugere que as fontes e concentrações lipídicas nas dietas têm efeitos sobre o metabolismo dos esfingolipídios. Mudanças no metabolismo dos esfingolipídios em resposta à fonte dietética de lipídio foi descrita por Gil-Solsona e colaboradores (2019), que relataram uma redução da esfingosina (9-metil-d19:3) no plasma da

dourada, quando alimentada com ingredientes vegetais em substituição à farinha e óleo de peixe. Por outro lado, a esfingosina (d14:2) aumentou acentuadamente em peixes alimentados com maior inclusão de ingredientes vegetais (GIL-SOLSONA *et al.*, 2019). Contudo, mais estudos devem ser realizados para entender como possíveis fontes lipídicas e a temperatura subótima baixa podem influenciar o metabolismo dos esfingolipídios e seu impacto no desenvolvimento dos peixes.

Outros metabólitos diferenciais, como DG (32:0), PA (30:0), TG (O-63:5), TG (O-58:3), TG (61:11) foram identificados em resposta à suplementação com 43 g kg⁻¹ SL e podem representar possíveis lipídios diferenciais à melhor resposta de crescimentos dos peixes, em comparação àqueles alimentados com dieta sem suplementação de lecitina (0SL). Neste caso, o TG (61:11) foi o lipídio diferencial com maior número de insaturações vistas no estudo, o que pode estar relacionado a maior incorporação de ácidos graxos de cadeia longa no hepatopâncreas dos peixes alimentados com a dieta 43SL. Esta é uma resposta positiva à suplementação com 43 g kg⁻¹ de SL, pois ácidos graxos de cadeia longa e insaturados, mesmo que depositados na forma de TG, são essenciais para as funções energéticas dos animais. Porém, poucos estudos foram realizados em peixes avaliando o efeito da dieta, em especial sobre modulações lipídicas, quando peixes tropicais são criados em temperatura subótima fria. Mais estudos devem ser realizados para analisar a interação entre estes biomarcadores lipídicos, como os encontrados em nosso estudo, e suas contribuições no metabolismo lipídico.

3.5 CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho que avalia a suplementação de fosfolipídios em dietas e sua resposta no metabolismo lipídico com abordagem lipidômica para tilápia-do-nilo, uma espécie tropical, quando criada em temperatura subótima fria. As avaliações por lipidômica com o uso das técnicas de FIA-MS e LC-MS/MS, assim como as análises de ácidos graxos por CG, demonstram que diferentes níveis de suplementação de lecitina influenciaram o perfil dos lipídios do hepatopâncreas da tilápia-do-nilo, uma espécie comercial importante para aquicultura. Espécies lipídicas diferenciais foram identificados e estão relacionadas a uma série de processos

biológicos, tais como fluidez e funcionalidade da membrana, metabolismo lipídico e energético, sinalização celular e biossíntese de ácidos graxos polinsaturados.

Ao fornecer uma visão geral das alterações lipídicas, para além das classes de ácidos graxos que são comumente avaliadas, a análise de lipidômica aparece como uma abordagem moderna e útil para entender melhor as complexas respostas de uma ampla gama de moléculas lipídicas. Tais abordagens permitem uma visão mais completa dos impactos que dietas formuladas para condições de temperatura subótima baixa pode provocar nos peixes, melhorando o desempenho industrial da tilapicultura durante os meses mais frios, nas latitudes subtropicais.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHANY, Heba M. *et al.* Dietary lipid sources affect cold tolerance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], v. 79, p. 50–55, 2019.
- ALFARO, Andrea C.; YOUNG, Tim. Showcasing metabolomic applications in aquaculture: a review. **Reviews in Aquaculture**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 135–152, 2018.
- ARAÚJO, Carlos A.S. *et al.* Effects of atmospheric cold fronts on stratification and water quality of a tropical reservoir: Implications for aquaculture. **Aquaculture Environment Interactions**, [s. l.], v. 9, n. Mpa 2013, p. 385–403, 2017.
- AZAZA, M. S.; DHRAÏEF, M. N.; KRAÏEM, M. M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], 2008.
- BATISTA, Rosana Oliveira *et al.* *Aurantiochytrium* sp. Meal improved body fatty acid profile and morphophysiology in Nile tilapia reared at low temperature. **Fishes**, [s. l.], v. 6, n. 4, 2021.
- BATISTA, Rosana Oliveira *et al.* Soy Lecithin Supplementation Promotes Growth and Increases Lipid Digestibility in GIFT Nile Tilapia Raised at Suboptimal Temperature. [s. l.], p. 1–17, 2023.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- BLOCH, Konrad E. Sterol structure and membrane function. **CRC critical reviews in biochemistry**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 47–92, 1983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6340956/>. Acesso em: 13 jun. 2023.

CABALLERO, M. J. *et al.* Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. **Journal of Fish Diseases**, [s. l.], 2004.

CAHU, Chantal L.; INFANTE, José L. Zambonino; BARBOSA, Valérie. Effect of dietary phospholipid level and phospholipid:neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 21–28, 2003.

CAJKA, Tomas; FIEHN, Oliver. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 61, p. 192–206, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.04.017>.

CHEN, Yong Po *et al.* Exogenous phospholipids supplementation improves growth and modulates immune response and physical barrier referring to NF- κ B, TOR, MLCK and Nrf2 signaling factors in the intestine of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish and Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 46–62, 2015.

CHEN, Cuiying *et al.* n-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Bioconverting LNA to DHA is relatively efficient and the LC-PUFA biosynthetic pathway is substrate limited in juvenile fish. **Aquaculture**, [s. l.], v. 495, n. June, p. 513–522, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.023>.

CORRÊA, C. F. *et al.* Dietary lipid sources affect the performance of Nile tilapia at optimal and cold, suboptimal temperatures. **Aquaculture Nutrition**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 1016–1026, 2017.

CORRÊA, Camila Fernandes *et al.* LC-PUFA endogenous biosynthesis is improved in Nile tilapia fed plant-oil sources at cold suboptimal temperature. **Aquaculture**, [s. l.], v. 562, n. May 2022, 2023.

CORRÊA, Camila Fernandes *et al.* Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. **Aquaculture**, [s. l.], v. 497, n. July, p. 82–90, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.034>.

CROCKE, Elizabeth L. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: Membrane-specific roles in adaptation to temperature. **American Zoologist**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 291–304, 1998.

DAPRÀ, Franco *et al.* Physiological and molecular responses to dietary phospholipids vary between fry and early juvenile stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, [s. l.], v. 319, n. 3–4, p. 377–384, 2011.

DU, Zhen-Yu; TURCHINI, Giovanni M; ZHEN-YU DU, Correspondence. Are we actually measuring growth?-An appeal to use a more comprehensive growth index system for advancing aquaculture research. [s. l.], 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1111/raq.12604>.

DUNN, Warwick B.; ELLIS, David I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 285–294, 2005.

EL-SAYED, Abdel Fattah M.; TAMMAM, Marwa S.; MAKLED, Sarah O. Lecithin-containing bioemulsifier boosts growth performance, feed digestion and absorption and immune response of adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 757–770, 2021.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. **FAO**, [s. l.], 2020.

FAO. **World Fisheries and Aquaculture, FAO:Rome,2022**. [S. l.: s. n.], 2022. *E-book*. Disponível em: https://www.fao.org/3/ca9229en/online/ca9229en.html#chapter-1_1.

FENAILLE, François *et al.* Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: Where do we stand?. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1526, n. March, p. 1–12, 2017.

FENG, Shuoheng *et al.* Effects of dietary phospholipids on growth performance and expression of key genes involved in phosphatidylcholine metabolism in larval and juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. **Aquaculture**, [s. l.], v. 469, p. 59–66, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.002>.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.

GEURDEN, I.; COUTTEAU, P.; SORGELOOS, P. Increased docosahexaenoic acid levels in total and polar lipid of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) postlarvae fed vegetable or animal phospholipids. **Marine Biology**, [s. l.], v. 129, n. 4, p. 689–698, 1997.

GIL-SOLSONA, Rubén *et al.* Contributions of MS metabolomics to gilthead sea bream (*Sparus aurata*) nutrition. Serum fingerprinting of fish fed low fish meal and fish oil diets. **Aquaculture**, [s. l.], v. 498, p. 503–512, 2019.

GLENCROSS, Brett D. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. **Reviews in Aquaculture**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 71–124, 2009.

HAN, Xianlin; GROSS, Richard W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: A bridge to lipidomics. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 1071–1079, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.R300004-JLR200>.

HAN, Xianlin; GROSS, Richard W. Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude

extracts of biological samples. **Mass Spectrometry Reviews**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 367–412, 2005.

HAN, Xianlin; YE, Hongping. Overview of Lipidomic Analysis of Triglyceride Molecular Species in Biological Lipid Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 69, n. 32, p. 8895–8909, 2021.

HANNUN, Yusuf A.; OBEID, Lina M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 175–191, 2018.

HAZEL, J.R. Adaptation to temperature: Phospholipid synthesis in hepatocytes of rainbow trout. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [s. l.], v. 258, n. 6 27-6, 1990.

HENNEBERRY, Annette L.; WRIGHT, Marcia M.; MCMASTER, Christopher R. The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity. **Molecular Biology of the Cell**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 3148–3161, 2002.

HU, Chunxiu *et al.* Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 877, n. 26, p. 2836–2846, 2009.

HU, Changfeng; DUAN, Qiao; HAN, Xianlin. **Strategies to Improve/Eliminate the Limitations in Shotgun Lipidomics**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pmic.201900070>.

JACOBS, René L. *et al.* Targeted deletion of hepatic CTP:phosphocholine cytidyltransferase α in mice decreases plasma high density and very low density lipoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 45, p. 47402–47410, 2004.

JOSEPH, Jeanne D; ACKMAN, Robert G. Capillary Column Gas Chromatographic Method for Analysis of Encapsulated Fish Oils and Fish Oil Ethyl Esters: Collaborative Study. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 488–506, 1992. Disponível em: <https://academic.oup.com/jaoac/article/75/3/488/5686475>. Acesso em: 16 maio 2023.

KANAZAWA, Akio. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. **Aquaculture**, [s. l.], v. 155, n. 1–4, p. 129–134, 1997.

KASPER, Craig S; BROWN, Paul B. Growth Improved in Juvenile Nile Tilapia Fed Phosphatidylcholine; Growth Improved in Juvenile Nile Tilapia Fed Phosphatidylcholine. **North American Journal of Aquaculture**, [s. l.], v. 65, p. 39–43, 2003.

KORBER, Martina; KLEIN, Isabella; DAUM, Günther. Steryl ester synthesis, storage and hydrolysis: A contribution to sterol homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1862, n. 12, p. 1534–1545,

2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.09.002>.

KOSTETSKY, E. Ya; VELANSKY, P. V.; SANINA, N. M. Phase transitions of phospholipids as a criterion for assessing the capacity for thermal adaptation in fish. **Russian Journal of Marine Biology**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 214–222, 2013.

LIN, Shi-Mei *et al.* Effect of dietary phospholipid levels on growth, lipid metabolism, and antioxidative status of juvenile hybrid snakehead (*Channa argus*×*Channa maculata*). **Fish Physiol Biochem** (2018), [s. l.], v. 44, p. 401–410, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0443-3>.

LIU, Chengyue *et al.* Differences in fatty acid composition of gill and liver phospholipids between Steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) under declining temperatures. **Aquaculture**, [s. l.], v. 495, p. 815–822, 2018.

LIU, Chengyue *et al.* Effects of decreasing temperature on phospholipid fatty acid composition of different tissues and hematology in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, [s. l.], v. 515, n. May 2019, p. 734587, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734587>.

LV, Shuang *et al.* Comprehensive lipidomic analysis of the lipids extracted from freshwater fish bones and crustacean shells. **Food Science & Nutrition**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 723, 2022. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8907742/](https://pmc/articles/PMC8907742/). Acesso em: 8 maio 2023.

MA, X. Y. *et al.* Changes in the physiological parameters, fatty acid metabolism, and SCD activity and expression in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at three different temperatures. **Fish Physiology and Biochemistry**, [s. l.], 2015.

MARTINEZ-PALACIOS, C. A.; CHAREZ-SANCHEZ, Ma Cristina; ROSS, L. G. The effects of water temperature on food intake, growth and body composition of *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther) juveniles. **Aquaculture Research**, [s. l.], 1996.

MELIS, Riccardo *et al.* Molecular details on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) sensitivity to low water temperatures from 1H NMR metabolomics. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology**, [s. l.], v. 204, p. 129–136, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.11.010>.

NOBREGA, Renata Oselame *et al.* Dietary supplementation of *Aurantiochytrium* sp. meal, a docosahexaenoic-acid source, promotes growth of Nile tilapia at a suboptimal low temperature. **Aquaculture**, [s. l.], v. 507, n. February, p. 500–509, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.030>.

NOBREGA, Renata Oselame *et al.* Improving winter production of Nile tilapia: What can be done?. **Aquaculture Reports**, [s. l.], v. 18, 2020.

OBOH, Angela *et al.* Two alternative pathways for docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) biosynthesis are widespread among teleost fish. **Scientific Reports**, [s. l.],

v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

OLSEN, Rolf Erik *et al.* Effect of soybean oil and soybean lecithin on intestinal lipid composition and lipid droplet accumulation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **Fish Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 181–192, 2003.

OVERGAARD, Johannes *et al.* Effects of acclimation temperature on thermal tolerance and membrane phospholipid composition in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 619–629, 2008.

PIMOLRAT, Pornpimol *et al.* **Survey of Climate-Related Risks to Tilapia Pond Farms in Northern Thailand**. [S. l.: s. n.], 2013.

SARGENT, John *et al.* Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. **Aquaculture**, [s. l.], v. 179, n. 1–4, p. 217–229, 1999.

SARGENT, J. R.; MCEVOY, L. A.; BELL, J. G. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. **Aquaculture**, [s. l.], v. 155, n. 1–4, p. 117–127, 1997.

SCHLEDER, Delano Dias *et al.* Impact of combinations of brown seaweeds on shrimp gut microbiota and response to thermal shock and white spot disease. **Aquaculture**, [s. l.], v. 519, n. November 2019, p. 734779, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734779>.

SHEN, Qing *et al.* Shotgun Lipidomics Strategy for Fast Analysis of Phospholipids in Fisheries Waste and Its Potential in Species Differentiation. [s. l.], 2012. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

SHI, Gui Cheng *et al.* Physiological responses and HSP70 mRNA expression of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under cold stress. **Aquaculture Research**, [s. l.], 2015.

SILVA, Bruno Corrêa *et al.* Cold tolerance and performance of selected Nile tilapia for suboptimal temperatures. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 1071–1077, 2021.

SILVA, Tomé S. *et al.* Metabolic fingerprinting of gilthead seabream (*Sparus aurata*) liver to track interactions between dietary factors and seasonal temperature variations. **PeerJ**, [s. l.], v. 2014, n. 1, 2014.

TEETS, Nicholas M.; DENLINGER, David L. Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. **Physiological Entomology**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 105–116, 2013.

THOMASSEN, M. S. *et al.* Organ and phospholipid class fatty acid specificity in response to dietary depletion of essential n-3 fatty acids in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture Nutrition**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 433–443, 2017.

TIAN, Juan *et al.* Dietary phosphatidylcholine impacts on growth performance and

lipid metabolism in adult Genetically Improved Farmed Tilapia (GIFT) strain of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 12–21, 2018.

TOCHER, Douglas R. **Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish**. [S. l.: s. n.], 2003. Disponível em: <http://www.arraina.eu/>. Acesso em: 5 ago. 2022.

TOCHER, Douglas R. *et al.* The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. **Aquaculture**, [s. l.], v. 280, n. 1–4, p. 21–34, 2008.

VAN NIEUWENHUYZEN, Willem; TOMÁS, Mabel C. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [s. l.], v. 110, n. 5, p. 472–486, 2008.

WU, Bangfu *et al.* Mass spectrometry-based lipidomics as a powerful platform in foodomics research. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 107, n. January 2020, p. 358–376, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.045>.

YEO, Judong; PARRISH, Christopher C. Shotgun lipidomics for the determination of phospholipid and eicosanoid profiles in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) muscle tissue using electrospray ionization (esi)-ms/ms spectrometric analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 1–14, 2021.

YUAN, Ye *et al.* Untargeted lipidomics reveals metabolic responses to different dietary n-3 PUFA in juvenile swimming crab (*Portunus trituberculatus*). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 354, n. February, 2021.

ZHAO, Jinzhu *et al.* Effects of dietary phospholipids on survival, growth, digestive enzymes and stress resistance of large yellow croaker, *Larimichthys crocea* larvae. **Aquaculture**, [s. l.], v. 410–411, p. 122–128, 2013.

ZHOU, Tao *et al.* Transcriptomic responses to low temperature stress in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 84, p. 1145–1156, 2019.

ZHU, Si *et al.* Influence of a Dietary Vegetable Oil Blend on Serum Lipid Profiles in Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 34, p. 9097–9106, 2018.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo aqui relatado faz parte de um projeto mais abrangente onde nosso grupo de pesquisa já avaliou diversos ingredientes lipídicos na alimentação da tilápia-do-nylo criada em temperatura subótima, com o objetivo de melhorar a produção dessa espécie comercial tão importante para aquicultura mundial e com produção expressiva em regiões subtropicais. Até então, mistura de óleo vegetais mimetizando o perfil do óleo de peixe e aditivos alimentares de microrganismos produtores de ácido docosaenoico (DHA, 22:6 n-3) foram testados na alimentação da tilápia e resultaram em bom desempenho em temperatura subótima.

Porém, devido às grandes mudanças ocorridas principalmente nos fosfolípidios das membranas dos peixes em temperatura subótima fria, a suplementação com lipídios diretamente na forma de fosfolípidios poderia poupar energia da biossíntese nessas condições de criação. Assim, a importância dos fosfolípidios dietéticos para um ótimo crescimento e eficiência alimentar em dietas para tilápia criadas em temperatura subótima fria foi claramente demonstrada nesta tese. Adicionalmente, a lecitina de soja como fonte de fosfolípidios é um ingrediente excelente para dietas de outono/primavera, principalmente considerando sua ampla disponibilidade no mercado.

A inclusão de fosfolípidios na forma de lecitina de soja melhorou o ganho em peso, a eficiência alimentar e a digestibilidade dos lipídios para juvenis de tilápia-do-nylo quando criada em temperaturas frias abaixo do ideal (22 °C). O nível ótimo de inclusão de lecitina de soja foi estimado em 42,2 g kg⁻¹ para ganho de peso e 49,8 g kg⁻¹ para eficiência alimentar. Adicionalmente, a composição corporal dos animais também melhorou com a inclusão de lecitina, com diminuição dos lipídios corporais totais e dos índices viscerossomático e hepatossomático, mas aumento dos ácidos graxos polinsaturados. Uma maior digestibilidade dos lipídios e consumo de nutrientes digestíveis foi encontrada em peixes alimentados com 43 g kg⁻¹.

O estudo na lipidômica, realizado no terceiro capítulo da tese, forneceu informações ainda não investigadas para tilápia-do-nylo em temperatura subótima, sob a avaliação de diversas classes lipídicas no hepatopâncreas dos animais. Através das três técnicas de detecção realizadas foi possível compreender de uma forma ampla e aprofundada a influência da suplementação com lecitina de soja no perfil lipídico dos peixes, e assim as possíveis vias metabólicas que levaram ao melhor desempenho.

Espécies lipídicas diferenciais foram identificadas e estão relacionadas a uma série de processos biológicos, tais como fluidez e funcionalidade da membrana, metabolismo lipídico e energético, sinalização celular e biossíntese de ácidos graxos polinsaturados.

Foram identificados marcadores lipídicos diferenciais nos peixes alimentados com 43 g kg⁻¹ de lecitina de soja, possivelmente relacionados ao melhor desempenho dos animais como diaciglicerol, triacilglicerol polinsaturados, ácido fosfatídico e fosfatidilcolina; além de marcadores associados a um excesso de lipídios e suplementação de lecitina na dieta como esteróis éster, detectados em maior intensidade no hepatopâncreas dos peixes alimentados com 64 g kg⁻¹.

Esta melhora no desempenho e digestibilidade dos peixes alimentados com lecitina de soja em temperatura baixa pode fornecer *insights* para avaliação desse ingrediente em dietas sob desafios bacterianos e sua resposta imune, além de outros desafios comumente enfrentados na aquicultura. Além disso, pesquisas a campo também devem ser realizadas, visando acompanhar todo o ciclo produtivo dos peixes e as variações ambientais que ocorrem, idealizando uma rotina mais próxima à realidade das pisciculturas.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABDEL-GHANY, Heba M. *et al.* Dietary lipid sources affect cold tolerance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], v. 79, p. 50–55, 2019.
- ALFARO, Andrea C.; YOUNG, Tim. Showcasing metabolomic applications in aquaculture: a review. **Reviews in Aquaculture**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 135–152, 2018.
- ARAÚJO, Carlos A.S. *et al.* Effects of atmospheric cold fronts on stratification and water quality of a tropical reservoir: Implications for aquaculture. **Aquaculture Environment Interactions**, [s. l.], v. 9, n. Mpa 2013, p. 385–403, 2017.
- AZAZA, M. S.; DHRAÏEF, M. N.; KRAÏEM, M. M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], 2008.
- BATISTA, Rosana Oliveira *et al.* *Aurantiochytrium* sp. Meal improved body fatty acid profile and morphophysiology in Nile tilapia reared at low temperature. **Fishes**, 2021, 6(4), 45; <https://doi.org/10.3390/fishes6040045>
- BATISTA, Rosana Oliveira *et al.* Soy Lecithin Supplementation Promotes Growth and Increases Lipid Digestibility in GIFT Nile Tilapia Raised at Suboptimal Temperature. **Fishes**, 2023, 8(8), 404; <https://doi.org/10.3390/fishes8080404>
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- BLOCH, Konrad E. Sterol structure and membrane function. **CRC critical reviews in biochemistry**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 47–92, 1983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6340956/>. Acesso em: 13 jun. 2023.
- CABALLERO, M. J. *et al.* Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. **Journal of Fish Diseases**, [s. l.], 2004.
- CAHU, Chantal L.; INFANTE, José L. Zambonino; BARBOSA, Valérie. Effect of dietary phospholipid level and phospholipid:neutral lipid value on the development of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed a compound diet. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 21–28, 2003.
- CAJKA, Tomas; FIEHN, Oliver. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 61, p. 192–206, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.04.017>.
- CHEN, Yong Po *et al.* Exogenous phospholipids supplementation improves growth

and modulates immune response and physical barrier referring to NF- κ B, TOR, MLCK and Nrf2 signaling factors in the intestine of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish and Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 46–62, 2015.

CHEN, Cuiying *et al.* n-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Bioconverting LNA to DHA is relatively efficient and the LC-PUFA biosynthetic pathway is substrate limited in juvenile fish. **Aquaculture**, [s. l.], v. 495, n. June, p. 513–522, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.023>.

CORRÊA, C. F. *et al.* Dietary lipid sources affect the performance of Nile tilapia at optimal and cold, suboptimal temperatures. **Aquaculture Nutrition**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 1016–1026, 2017.

CORRÊA, Camila Fernandes *et al.* LC-PUFA endogenous biosynthesis is improved in Nile tilapia fed plant-oil sources at cold suboptimal temperature. **Aquaculture**, [s. l.], v. 562, n. May 2022, 2023.

CORRÊA, Camila Fernandes *et al.* Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. **Aquaculture**, [s. l.], v. 497, n. July, p. 82–90, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.034>.

CROCKE, Elizabeth L. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: Membrane-specific roles in adaptation to temperature. **American Zoologist**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 291–304, 1998.

DAPRÀ, Franco *et al.* Physiological and molecular responses to dietary phospholipids vary between fry and early juvenile stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, [s. l.], v. 319, n. 3–4, p. 377–384, 2011.

DU, Zhen-Yu; TURCHINI, Giovanni M; ZHEN-YU DU, Correspondence. Are we actually measuring growth? -An appeal to use a more comprehensive growth index system for advancing aquaculture research. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/raq.12604>.

DUNN, Warwick B.; ELLIS, David I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 285–294, 2005.

EL-SAYED, Abdel Fattah M.; TAMMAM, Marwa S.; MAKLED, Sarah O. Lecithin-containing bioemulsifier boosts growth performance, feed digestion and absorption and immune response of adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 757–770, 2021.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. **FAO**, [s. l.], 2020.

FAO. **World Fisheries and Aquaculture, FAO:Rome,2022**. [S. l.: s. n.], 2022. E-book. Disponível em: <https://www.fao.org/3/ca9229en/online/ca9229en.html#chapter->

1_1.

FENAILLE, François *et al.* Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: Where do we stand?. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1526, n. March, p. 1–12, 2017.

FENG, Shuoheng *et al.* Effects of dietary phospholipids on growth performance and expression of key genes involved in phosphatidylcholine metabolism in larval and juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. **Aquaculture**, [s. l.], v. 469, p. 59–66, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.002>.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.

GEURDEN, I.; COUTTEAU, P.; SORGELOOS, P. Increased docosahexaenoic acid levels in total and polar lipid of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) postlarvae fed vegetable or animal phospholipids. **Marine Biology**, [s. l.], v. 129, n. 4, p. 689–698, 1997.

GIL-SOLSONA, Rubén *et al.* Contributions of MS metabolomics to gilthead sea bream (*Sparus aurata*) nutrition. Serum fingerprinting of fish fed low fish meal and fish oil diets. **Aquaculture**, [s. l.], v. 498, p. 503–512, 2019.

GLENCROSS, Brett D. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. **Reviews in Aquaculture**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 71–124, 2009.

HAN, Xianlin; GROSS, Richard W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: A bridge to lipidomics. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 1071–1079, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.R300004-JLR200>.

HAN, Xianlin; GROSS, Richard W. Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. **Mass Spectrometry Reviews**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 367–412, 2005.

HAN, Xianlin; YE, Hongping. Overview of lipidomic analysis of triglyceride molecular species in biological lipid extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 69, n. 32, p. 8895–8909, 2021.

HANNUN, Yusuf A.; OBEID, Lina M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 175–191, 2018.

HAZEL, J.R. Adaptation to temperature: Phospholipid synthesis in hepatocytes of rainbow trout. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [s. l.], v. 258, n. 6 27-6, 1990.

HENNEBERRY, Annette L.; WRIGHT, Marcia M.; MCMASTER, Christopher R. The

major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity. **Molecular Biology of the Cell**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 3148–3161, 2002.

HU, Chunxiu *et al.* Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, [s. l.], v. 877, n. 26, p. 2836–2846, 2009.

HU, Changfeng; DUAN, Qiao; HAN, Xianlin. **Strategies to Improve/Eliminate the Limitations in Shotgun Lipidomics**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pmic.201900070>.

JACOBS, René L. *et al.* Targeted deletion of hepatic CTP:phosphocholine cytidyltransferase α in mice decreases plasma high density and very low density lipoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 45, p. 47402–47410, 2004.

JOSEPH, Jeanne D; ACKMAN, Robert G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 488–506, 1992. Disponível em: <https://academic.oup.com/jaoac/article/75/3/488/5686475>. Acesso em: 16 maio 2023.

KANAZAWA, Akio. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. **Aquaculture**, [s. l.], v. 155, n. 1–4, p. 129–134, 1997.

KASPER, Craig S; BROWN, Paul B. Growth Improved in Juvenile Nile Tilapia Fed Phosphatidylcholine; Growth Improved in Juvenile Nile Tilapia Fed Phosphatidylcholine. **North American Journal of Aquaculture**, [s. l.], v. 65, p. 39–43, 2003.

KORBER, Martina; KLEIN, Isabella; DAUM, Günther. Steryl ester synthesis, storage and hydrolysis: A contribution to sterol homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1862, n. 12, p. 1534–1545, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.09.002>.

KOSTETSKY, E. Ya; VELANSKY, P. V.; SANINA, N. M. Phase transitions of phospholipids as a criterion for assessing the capacity for thermal adaptation in fish. **Russian Journal of Marine Biology**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 214–222, 2013.

LIN, Shi-Mei *et al.* Effect of dietary phospholipid levels on growth, lipid metabolism, and antioxidative status of juvenile hybrid snakehead (*Channa argus* × *Channa maculata*). **Fish Physiol Biochem** (2018), [s. l.], v. 44, p. 401–410, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0443-3>.

LIU, Chengyue *et al.* Differences in fatty acid composition of gill and liver phospholipids between Steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) under declining temperatures. **Aquaculture**, [s. l.], v. 495, p. 815–822, 2018.

LIU, Chengyue *et al.* Effects of decreasing temperature on phospholipid fatty acid composition of different tissues and hematology in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, [s. l.], v. 515, n. May 2019, p. 734587, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734587>.

LV, Shuang *et al.* Comprehensive lipidomic analysis of the lipids extracted from freshwater fish bones and crustacean shells. **Food Science & Nutrition**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 723, 2022. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8907742/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40111111/). Acesso em: 8 maio 2023.

MA, X. Y. *et al.* Changes in the physiological parameters, fatty acid metabolism, and SCD activity and expression in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at three different temperatures. **Fish Physiology and Biochemistry**, [s. l.], 2015.

MARTINEZ-PALACIOS, C. A.; CHAREZ-SANCHEZ, Ma Cristina; ROSS, L. G. The effects of water temperature on food intake, growth and body composition of *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther) juveniles. **Aquaculture Research**, [s. l.], 1996.

MELIS, Riccardo *et al.* Molecular details on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) sensitivity to low water temperatures from 1H NMR metabolomics. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology**, [s. l.], v. 204, p. 129–136, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.11.010>.

NOBREGA, Renata Oselame *et al.* Dietary supplementation of *Aurantiochytrium* sp. meal, a docosahexaenoic-acid source, promotes growth of Nile tilapia at a suboptimal low temperature. **Aquaculture**, [s. l.], v. 507, n. February, p. 500–509, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.030>.

NOBREGA, Renata Oselame *et al.* Improving winter production of Nile tilapia: What can be done?. **Aquaculture Reports**, [s. l.], v. 18, 2020.

OBOH, Angela *et al.* Two alternative pathways for docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) biosynthesis are widespread among teleost fish. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

OLSEN, Rolf Erik *et al.* Effect of soybean oil and soybean lecithin on intestinal lipid composition and lipid droplet accumulation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **Fish Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 181–192, 2003.

OVERGAARD, Johannes *et al.* Effects of acclimation temperature on thermal tolerance and membrane phospholipid composition in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 619–629, 2008.

SARGENT, John *et al.* Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. **Aquaculture**, [s. l.], v. 179, n. 1–4, p. 217–229, 1999.

SARGENT, J. R.; MCEVOY, L. A.; BELL, J. G. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. **Aquaculture**, [s. l.], v. 155, n. 1–4, p. 117–127, 1997.

SCHLEDER, Delano Dias *et al.* Impact of combinations of brown seaweeds on shrimp gut microbiota and response to thermal shock and white spot disease. **Aquaculture**, [s. l.], v. 519, n. November 2019, p. 734779, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734779>.

SHEN, Qing *et al.* Shotgun Lipidomics Strategy for Fast Analysis of Phospholipids in Fisheries Waste and Its Potential in Species Differentiation. [s. l.], 2012. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

SHI, Gui Cheng *et al.* Physiological responses and HSP70 mRNA expression of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under cold stress. **Aquaculture Research**, [s. l.], 2015.

SILVA, Bruno Corrêa *et al.* Cold tolerance and performance of selected Nile tilapia for suboptimal temperatures. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 1071–1077, 2021.

SILVA, Tomé S. *et al.* Metabolic fingerprinting of gilthead seabream (*Sparus aurata*) liver to track interactions between dietary factors and seasonal temperature variations. **PeerJ**, [s. l.], v. 2014, n. 1, 2014.

TEETS, Nicholas M.; DENLINGER, David L. Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. **Physiological Entomology**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 105–116, 2013.

THOMASSEN, M. S. *et al.* Organ and phospholipid class fatty acid specificity in response to dietary depletion of essential n-3 fatty acids in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture Nutrition**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 433–443, 2017.

TIAN, Juan *et al.* Dietary phosphatidylcholine impacts on growth performance and lipid metabolism in adult Genetically Improved Farmed Tilapia (GIFT) strain of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 12–21, 2018.

TOCHER, Douglas R. **Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish**. [S. l.: s. n.], 2003. Disponível em: <http://www.arraina.eu/>. Acesso em: 5 ago. 2022.

TOCHER, Douglas R. *et al.* The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. **Aquaculture**, [s. l.], v. 280, n. 1–4, p. 21–34, 2008.

VAN NIEUWENHUYZEN, Willem; TOMÁS, Mabel C. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. **European Journal of Lipid Science and Technology**, [s. l.], v. 110, n. 5, p. 472–486, 2008.

WU, Bangfu *et al.* Mass spectrometry-based lipidomics as a powerful platform in foodomics research. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 107, n. January 2020, p. 358–376, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.045>.

YEO, Judong; PARRISH, Christopher C. Shotgun lipidomics for the determination of phospholipid and eicosanoid profiles in atlantic salmon (*Salmo salar* L.) muscle tissue using electrospray ionization (ESI)-MS/MS spectrometric analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 1–14, 2021.

YUAN, Ye *et al.* Untargeted lipidomics reveals metabolic responses to different dietary n-3 PUFA in juvenile swimming crab (*Portunus trituberculatus*). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 354, n. February, 2021.

ZHAO, Jinzhu *et al.* Effects of dietary phospholipids on survival, growth, digestive enzymes and stress resistance of large yellow croaker, *Larimichthys crocea* larvae. **Aquaculture**, [s. l.], v. 410–411, p. 122–128, 2013.

ZHOU, Tao *et al.* Transcriptomic responses to low temperature stress in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 84, p. 1145–1156, 2019.

ZHU, Si *et al.* Influence of a Dietary Vegetable Oil Blend on Serum Lipid Profiles in Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 34, p. 9097–9106, 2018.