

Gabriel Fernandes Alves Jesus

**Suplementação dietária com butirato de sódio no cultivo de
tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus***

Tese submetida como requisito final para a
obtenção do grau de Doutor em Aquicultura
pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Laterça Martins
Coorientador: Dr. Bruno Correa da Silva

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Jesus, Gabriel Fernandes Alves

Suplementação dietária com butirato de sódio no cultivo de tilápia-do-nylo, *Oreochromis niloticus* / Gabriel Fernandes Alves Jesus ; orientador, Maurício Laterça Martins, coorientador, Bruno Correa da Silva, 2019.

156 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Saúde animal. 3. Ácidos orgânicos. 4. Microbiota intestinal. 5. Óleo essencial. I. Martins, Maurício Laterça . II. Silva, Bruno Correa da . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Suplementação dietária com butirato de sódio no cultivo de tilápia-
do-nilo *Oreochromis niloticus***

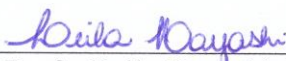
Por

GABRIEL FERNANDES ALVES JESUS

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.



Profª. Leila Hayashi, Dra.

Coordenadora do PPG em Aquicultura

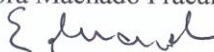
Banca Examinadora:



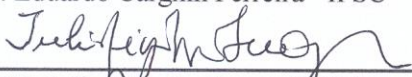
Dr. Mauricio Laterça Martins – *Orientador*



Dra. Débora Machado Fracalossi - UFSC



Dr. Eduardo Cargnin Ferreira - IFSC



Dra. Juliet Kyoko Sugai - UFSC

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o amor, carinho, educação e incentivo ao longo da vida.

À minha esposa, Sthefanie, por todo o amor, cumplicidade, simplicidade, e por estar ao meu lado sempre me apoiando e lutando por nossos sonhos, te amo!

Ao amigo e orientador, Prof. Maurício Laterça Martins, pela orientação, pela confiança, pelos exemplos e pelas braçadas ao longo desses anos.

Ao amigos e coorientadores Bruno Correa da Silva e José Luiz P. Mouriño, pela confiança depositada, pela amizade, pelos exemplos, pelas risadas, pelas valiosas orientações desde 2008.

Aos grandes mestres da Microbiologia - LCM, Felipe do Nascimento Vieira, Adolfo Jatoba, Bruno Correa da Silva, José Luiz P. Mouriño, pela amizade, por acreditarem, por confiarem, por todos os ensinamentos e oportunidades.

Ao Dr. Eduardo Cargnin Ferreira, à Dra. Débora Machado Fracalossi, à Dra. Juliet Kiyoko Sugai, ao Dr. Felipe do Nascimento Vieira, ao Dr. Adolfo Jatobá e ao Dr. José Luiz P. Mouriño, pela participação na banca examinadora e por suas valiosas contribuições.

A todos os amigos do Laboratório NEPAQ, por todas as amizades, risadas, alegrias, competência, ensinamentos e trabalho em equipe.

A todo o suporte fornecido pelos laboratórios, alunos e servidores da UFSC e de outras instituições (LCME, NEPAq, LAPMAR, LABNUTRI, LCM, Lab. de Enzimologia, IFC-Araquari, Epagri, UFMG).

Ao Secretário do Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Carlito Klunk, por seu profissionalismo e competência.

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

A todos que contribuíram com a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Somos um exército, o exército de um homem só
No difícil exercício de viver em paz
Nesse exército, o exército de um homem só
Todos sabem
Que tanto faz
Ser culpado
Ou ser capaz
Tanto faz...”

“Exército de um homem só”, O papa é Pop
Augusto Licks / Humberto Gessinger (1990)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da suplementação dietária de butirato de sódio na forma protegida e desprotegida, em duas concentrações diferentes de inclusão, assim como o possível efeito sinérgico do butirato com o óleo essencial de *Lippia origanoides*, em juvenis de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*. No primeiro ensaio, 3150 pós-larvas (0.0183 ± 0.0014 g) recém eclodidas foram distribuídas aleatoriamente em seis tratamentos e um controle, em triplicata: ração sem suplementação (Controle); ração com Na-butilato puro (Puro 0,25% e Puro 0,5%), ração com Na-butilato protegido com óleo de palma (Óleo 0,25% e Óleo 0,5%) e alimentados com Na-butilato protegido com solução tampão (Tampão 0,25% e Tampão 0,5%). Após 28 dias de alimentação, a produtividade e biomassa final apresentaram incremento significativo nos peixes alimentados com as dietas Tampão 0,5% e Óleo 0,5%. Observou-se diminuição da atividade da protease alcalina nos grupos Óleo 0,25%, Óleo 0,5% e Tampão 0,5%, quando comparado ao grupo controle. Os grupos suplementados com Na-butilato protegido apresentaram melhorias na estrutura e saúde intestinal. Com relação ao fígado, o grupo Puro 0,5% apresentou os maiores índices de macroesteatose quando comparado ao grupo controle, além de maior índice para necrose quando comparado ao grupo Puro 0,25%. Para as variáveis de alteração da microbiota intestinal, o grupo Óleo 0,5% apresentou maior quantidade de “Operational Taxonomic Unit” (OTUs) de 207, enquanto observou-se menor quantidade no controle que foi de 44. O grupo Óleo 0,5% apresentou índices superiores de abundância, riqueza e diversidade quando comparado aos demais grupos, além de apresentar maior distanciamento filogenético, principalmente em comparação ao grupo controle. Além disso, verificou-se aumento das Firmicutes no grupo Óleo 0,5%, representado principalmente por bactérias da ordem Lactobacillales. No segundo ensaio, um total de 120 peixes ($5,38 \pm 0,65$ g) foram distribuídos em 12 unidades experimentais e alimentados com diferentes dietas experimentais, durante 30 dias: dieta comercial sem suplementação (C); suplementada com 0,5% de Na-butilato protegido (B); suplementada com 0,125% de *L. origanoides* (L); e suplementada com mistura de 0,5% de Na-butilato e 0,125% de *L. origanoides* (BL). Após o período experimental, verificou-se redução na concentração de bactérias heterotróficas totais no intestino dos animais do grupo B, em relação ao grupo C, além do aumento de bactérias ácido-láticas no grupo B, quando comparado aos demais grupos. Observou-se aumento significativo no

número de eritrócitos totais no grupo L em relação aos grupos C e BL, além da redução da hemoglobina corpuscular média, quando comparada ao controle. Os animais do grupo BL apresentaram aumento no número de vilos intestinais em relação ao grupo controle. Observou-se no grupo BL a redução de infiltrados linfocitários no fígado, quando comparado ao grupo controle; enquanto que o grupo B apresentou aumento de macroesteatose no fígado e diminuição de melanomacrófagos soltos no baço, quando comparado ao grupo controle. Dessa forma, o butirato de sódio na forma protegida e na concentração de 0,5% de inclusão na dieta, foi capaz de incrementar o desempenho zootécnico dos animais, beneficiar a estrutura, saúde e microbiota intestinal, além de apresentar efeito sinérgico quando utilizado em conjunto com o óleo essencial de *L. origanoides*.

Palavras-chave: Aquicultura; Saúde animal; Ácidos orgânicos; Microbiota intestinal; Óleo essencial.

ABSTRACT

The aim of this study was to verify the effects of dietary supplementation of Na-Butyrate in the protected and unprotected form, in two different concentrations of inclusion, as well as the possible synergistic effect of butyrate with the essential oil of *Lippia origanoides*, in juveniles of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. In the first trial, a total of 3,150 newly hatched post-larvae (0.0183 ± 0.0014 g) were distributed on six treatments and one control, in triplicate: fish fed unsupplemented diet (control); fed Na-butyrate supplemented diet (Pure 0.25% and Pure 0.5%); fed Na-butyrate coated with palm oil (Oil 0.25% and Oil 0.5%) and fed Na-butyrate coated with buffered solution (Buffer 0.25% and Buffer 0.5%). After 28 days of feeding, the yield and final biomass presented an increase in Buffer 0.5% and Oil 0.5%. The decrease in alkaline protease activity was observed in the Oil 0.25%, Oil 0.5% and Buffer 0.5%, when compared to the Control. The groups supplemented with Na-butyrate protected showed improvements in intestinal health and structure. The Pure 0.5% had the highest macrosteatosis indexes when compared to the control, besides a higher necrosis index when compared to the Pure 0.25%. For the variables of intestinal microbiota, the Oil 0.5% had a higher quantity of OTUs (207), while a smaller amount was observed in the control (44). The Oil 0.5% presented higher indexes of abundance, richness and diversity when compared to the other groups, besides showing greater phylogenetic distancing, mainly in comparison to the control. In addition, Firmicutes increased in the Oil 0.5%, mainly represented by bacteria of the order Lactobacillales. In the second trial, a total of 120 fish (5.38 ± 0.65 g) were randomly distributed in 12 experimental units and fed with different experimental diets, during 30 days, being: commercial diet without supplementation (C); supplemented with 0.5% Na-Butyrate (B); supplemented with 0.125% of *L. origanoides* (L); and supplemented with a mixture of 0.5% Na-Butyrate and 0.125% *L. origanoides* (BL). After the experimental period, there was a reduction in the concentration of total heterotrophic bacteria in the intestine of the animals of the BL, in relation to L, in addition to the increase of acid-lactic bacteria in B, when compared to the other groups. There was a significant increase in the number of total erythrocytes in the L in relation to the C and BL, in addition to the reduction of the mean corpuscular hemoglobin, when compared to the Control. The animals of the BL showed an increase in the number of intestinal villi in relation to the Control. The reduction of lymphocytic infiltrates in the liver was observed in the BL when

compared to the Control; while B showed liver macrosteatosis increase and decrease of loose melanomacrophages in the spleen when compared to the Control. Thus, Na-Butyrate in the protected form and at the concentration of 0.5% inclusion in the diet was able to increase the zootechnical performance of the animals, to benefit the structure, health and intestinal microbiota, besides having a synergistic effect when used in with the essential oil of *L. origanoides*.

Keywords: Aquaculture; Animal health; Organic acids; Intestinal microbiota; Essential oil.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Fig. 1. Total mortality (number of fish) over time of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* challenged at the pathogenicity assay with different bacteria for 96 h..... 49

Fig. 2. Minimum inhibitory concentration of sodium butyrate at different pHs against pathogens of *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae*.. 50

Fig. 3. Effects on cumulative mortality of juvenile tilapia, fed different diets for 28 days, challenged by immersion in an *Aeromonas hydrophila* solution.....54

CAPÍTULO II

Fig. 1. Qualitative evaluation of the anterior and posterior region of the intestinal tract of the main groups of Nile tilapia fed during 28 days with different diets containing or not sodium butyrate in different concentrations and forms, during the period of sexual reversion..... 76

Fig. 2. Evaluation of intestinal integrity by transmission electron microscopy (TEM) of Nile tilapia supplemented or not with sodium butyrate in different concentrations and forms during the 28-day period of sexual reversion 78

CAPÍTULO III

Fig. 1. Curva de rarefação para verificação do sequenciamento das diferentes espécies presentes no intestino tilápias-do-nilo alimentadas ou não com diferentes concentrações e fonte de butirato de sódio, durante 28 dias..... 95

Fig. 2. Distanciamento filogenético dos grupos através do UPGMA (do inglês *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*), da microbiota intestinal de tilápias-do-nilo alimentadas ou não com diferentes concentrações e fonte de butirato de sódio, durante 28 dias..96

Fig. 3. Gráfico de barras, em nível de filo, indicando as alterações da microbiota intestinal de tilápias-do-nilo alimentadas ou não com diferentes concentrações e fonte de butirato de sódio, durante 28 dias..... 97

Fig. 4. Gráfico de barras, em nível de espécie, indicando as alterações da microbiota intestinal de tilápias-do-nilo alimentadas ou não com diferentes concentrações e fontes de butirato de sódio, durante 28 dias.....107

CAPÍTULO IV

Fig. 1. Valores do pH das dietas C: controle; B: suplementada com 0,5% butirato de sódio; CO: suplementada com 0,125% de óleo essencial de *Lippia origanoides* e BO: suplementada com 0,5% butirato de sódio e 0,125% óleo essencial 131

Fig. 2. Contagem de bactérias (Log 10) por grama do trato intestinal de tilápias-do-nilo *O. niloticus* alimentadas, durante 30 dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia origanoides* (CO), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial de *L. origanoides* (BO). Dados são apresentados em média \pm desvio padrão..... 134

Fig. 3. Parâmetros imunológicos de tilápias-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentadas, durante 30 dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia origanoides* (CO), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial (BO). **A-** representa a concentração de proteína total plasmática (mg mL⁻¹) e a concentração de imunoglobulina total (mg mL⁻¹), . **B-** título antimicrobiano do plasma contra *Streptococcus agalactiae* e título aglutinação do plasma contra *Streptococcus agalactiae*. 136

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Table 1.** Ingredients and proximate composition analysis of the experimental diets (g kg^{-1}) supplemented or not with sodium butyrate, which were fed to Nile tilapia for 28 days. 43
- Table 2.** Phenotypic characterization of strains isolated from mortality outbreaks of tilapia in Joiville, Brazil 48
- Table 3.** Zootechnical parameters (mean \pm standard deviation) of fingerlings of Nile tilapia *Oreochomis niloticus* fed seven different diets for 28 days.51
- Table 4.** Hematological parameters (mean+standard deviation) of fingerlings of Nile tilapia fed with 7 different diets for 28 days. 53

CAPÍTULO II

- Table 1.** Ingredients and proximate composition analysis of the experimental diets (%) supplemented or not with sodium butyrate for Nile tilapia during 28 days 69
- Table 2.** Digestive enzymes activity (mean \pm standard deviation) (U mg^{-1} protein) of juveniles of Nile tilapia fed seven different diets during 28 days in the period of sexual reversion..... 74
- Table 3.** Histomorphometric parameters (mean \pm standard deviation) of the intestinal tract (anterior and posterior portion) of juveniles of Nile tilapia fed seven different diets during 28 days in the period of sexual reversion..... 75
- Table 4.** Histological indices (mean \pm standard deviation) of the liver of juveniles of Nile tilapia fed seven different diets during 28 days in the period of sexual reversal..... 79

CAPÍTULO III

Tabela 1. Ingredientes e análise da composição proximal das diferentes dietas (%) suplementadas ou não com butirato de sódio, utilizadas no ensaio de alevinagem de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, durante o período de reversão sexual. 90

Tabela 2. Resultados do agrupamento, número, qualidade por amostra, índices de riqueza e diversidade da microbiota intestinal de tilápias-do-Nilo alimentadas ou não com diferentes concentrações e fontes de butirato de sódio, durante 28 dias..... 94

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de *Lippia organoides* após processo de extração..... 130

Tabela 2. Análise do pH (média \pm desvio padrão) do conteúdo estomacal, intestino anterior, médio e posterior do trato intestinal de tilápias-do-Nilo *O. niloticus* alimentadas, durante 30 dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia organoides* (L), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial de *L. organoides* (BL).. 132

Tabela 3. Parâmetros zootécnicos (media \pm desvio padrão) de juvenis de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados, durante 30 dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia organoides* (L), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial de *Lippia organoides* (BL).. 133

Tabela 4. Parâmetros hematológicos (média \pm desvio padrão) de tilápias-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentadas, durante 30 dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia organoides* (L), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial de *L. organoides* (BL).. 135

Tabela 5. Histomorfometria intestinal anterior e posterior de juvenis de tilápias-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentadas, durante 30

dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia origanoides* (L), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial (BL)..... 139

Tabela 6. Intensidade de alteração histológica no fígado de juvenis de tilápia-do-nilo *O. niloticus* sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia origanoides* (L), suplementados com butirato de sódio (B) e suplementados com mistura de butirato de sódio e óleo essencial (BL) por 30 dias. Dados são apresentados em média \pm desvio padrão..... 139

Tabela 1: Intensidade de alteração histológica no baço de juvenis de tilápias-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentadas, durante 30 dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia origanoides* (CO), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial (BO). Dados são apresentados em média \pm desvio padrão ... 140

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	23
Piscicultura no Brasil	23
Ácidos e sais orgânicos na aquicultura	23
<i>a) Ácido fórmico e/ou formiatos</i>	25
<i>b) Ácido acético e/ou acetatos</i>	26
<i>c) Ácido propiônico e/ou propionatos</i>	26
<i>d) Ácido butírico e/ou butirato</i>	27
<i>e) Blends de ácidos orgânicos e/ou seus sais</i>	28
Adaptações para o uso de ácidos e sais orgânicos na aquicultura ..	29
Ácidos orgânicos e óleos essenciais	30
JUSTIFICATIVA	31
OBJETIVOS	32
Objetivo Geral	32
Objetivos Específicos	32
FORMATAÇÃO DOS CAPÍTULOS DA TESE	33
CAPÍTULO I	35
Protected forms of sodium butyrate improve the growth and health of Nile tilapia fingerlings during sexual reversion.	35
Abstract	35
Introduction	36
Material and methods	39
In vitro analysis	39
Isolation of Aeromonas hydrophila	39
Identification of Aeromonas hydrophila by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and phenotypic characteristics	40
Pathogenicity assay	40
Feed and intestinal pH analysis	41
Minimal Inhibitory Concentration (MIC)	41
Experimental diets	42
Experimental design	44
Sexual reversion	45
Zotechnical parameters	45
Hematological parameters	45
Challenge test	46
Statistical analyses	47
Results	47
Identification of bacteria and phenotypic characterization	47
Pathogenic assay	49

Minimal Inhibitory Concentration (MIC)	49
Sexual reversion	50
Zootechnical parameters	50
Hematological parameters	52
Experimental Challenge	54
Discussion	54
Conclusion	59
Acknowledgements	59
References	59
CAPÍTULO II	65
Use of protected forms of sodium butyrate benefit the development and intestinal health of Nile tilapia during the sexual reversion period	65
Abstract	66
Introduction	67
Material and methods	68
Experimental diets	68
Experimental design	70
Digestive enzymes activity	71
Histological analysis	72
Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	73
Statistical analysis	73
Results	73
Digestive enzymes activity	73
Histomorphometric parameters	74
Intestinal integrity	76
Histological parameters	78
Discussion	80
Conclusion	82
Acknowledgment	82
References	83
CAPÍTULO III	87
Butirado de sódio como ferramenta eficaz para manipulação da microbiota intestinal de tilápia-do-nilo como constatado pela técnica de sequenciamento de alta resolução	87
Gabriel F.A. Jesus^a; Scheila A. Pereira^a; Marco S. Owatari^a; Flávia L. Zacchi^a; Bruno C. Silva^b; Delano Dias Schleder^c; José Luiz.P. Mouriño^a, Mauricio L. Martins^a	87
Resumo	87
Introdução	88
Material e Métodos	90

Dietas experimentais	90
Delineamento experimental.....	91
Análise da microbiota intestinal.....	92
Resultados	93
Discussão	98
Conclusão.....	102
Agradecimentos	102
Referências.....	103
CAPÍTULO IV	121
Sinergismo entre butirato de sódio e <i>Lippia organoides</i> no crescimento, parâmetros hematológicos, saúde intestinal, integridade de órgãos e resposta imunológica em juvenis de tilápia-do-nylo.....	121
Introdução.....	122
Material e Métodos.....	123
Extração e análise da composição do óleo essencial	123
Preparo das Dietas Experimentais.....	124
Delineamento experimental.....	125
Análises do pH das dietas	125
Análise do pH do trato gastrointestinal.....	126
Desempenho zootécnico	126
Análise da microbiota intestinal.....	126
Análises Hematológicas.....	127
Análise Imunológicas	127
Análises Histológicas	128
Análise Estatística	129
Resultados	130
Composição do óleo essencial	130
Análise do pH da Dieta	131
Análise do pH do Trato Intestinal.....	132
Desempenho zootécnico	133
Análises Microbiológicas	134
Figura 2: Contagem de bactérias (Log₁₀) por grama do trato intestinal de tilápias-do-nylo <i>O. niloticus</i> alimentadas, durante 30 dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de <i>Lippia organoides</i> (L), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial de <i>L. organoides</i> (BL). Dados são apresentados em média ± desvio padrão	134
Parâmetros Hematológicos.....	134
Parâmetros imunológicos	135

Análises	136
Discussão.....	140
Conclusão.....	144
Agradecimentos.....	144
Referências.....	145
CONCLUSÃO GERAL.....	149
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	151

INTRODUÇÃO GERAL

Piscicultura no Brasil

A aquicultura no Brasil apresenta um crescimento intenso, destacando-se como terceiro maior produtor aquícola das Américas, com um produção aquícola de 692 mil toneladas no ano de 2017. O cultivo de tilápias é o mais representativo, responsável por 51% do total produzido, com 357.639 mil toneladas (PEIXEBR, 2018).

A criação de tilápias sofre com o surgimento e disseminação de doenças, principalmente bacterianas, como: *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Francisella* sp., *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae* (HUICAB-PECH et al., 2017). Dentre essas doenças, apenas estreptococose é prevenida com imunização (vacina comercial), enquanto que para as demais é necessário que os animais se mantenham saudáveis e imunocompetentes para que as mesmas não se manifestem. A fim de solucionar esse problema, existe uma crescente busca no desenvolvimento de substâncias capazes de inibir patógenos, incrementar a saúde e promover o crescimento animal.

Ácidos e sais orgânicos na aquicultura

À medida que se pretende aumentar a produção, seja em pequena ou larga escala, um quesito importante a ser observado é a biossegurança. Grandes mortalidades de peixes são observadas quando há a intensificação desordenada da produção. A ocorrência de enfermidades tem como principal fator o desequilíbrio do triângulo epidemiológico patógeno, hospedeiro e meio ambiente, o qual consequentemente diminui a capacidade imunológica dos animais, além de deteriorar a qualidade da água, favorecendo assim o desenvolvimento de doenças (LIZAMA et al., 2007).

Durante estes surtos, diversos agentes químicos proibidos são utilizados como tratamentos profiláticos e remediadores às enfermidades, tais como ácido acético, amônia quaternária, cal, cloreto de sódio, formol, iodo, metrifonato, sulfato de cobre, verde malaquita, ácido oxolínico, sulfamerazina, sulfato de magnésio e especialmente os antibióticos, os quais são comumente utilizados indiscriminadamente e de maneira errônea (ELER e MILLANI, 2007).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2013) já proibiu o uso de diversos antibióticos (cloranfenicol e nitrofuranos, quilononas e sulfonamidas, eritromicina) como aditivos alimentares na produção animal. Dessa forma, tendo em vista o atual

cenário de expansão da aquicultura mundial, a utilização de estratégias alternativas para redução do uso de antibióticos e outros antimicrobianos na produção animal vem se tornando realidade. Aditivos alimentares como ácidos orgânicos e seus sais, além de óleos essenciais, são potenciais substitutos a utilização de antibióticos como promotores de crescimento e de saúde aos animais. Estudos relatam a capacidade de ácidos e seus sais orgânicos em incrementar parâmetros de crescimento, parâmetros de saúde, resistência a doenças e qualidade do alimento, quando utilizado nas concentrações e formas apropriadas (NG e KOH, 2017). Porém, muitos resultados são controversos, uma vez que uma série de fatores podem influenciar os mesmos, sendo eles: o ácido e/ou sal orgânico, fonte, dose, espécie alvo, delineamento experimental, forma de aplicação (pura ou protegida; isolado ou em blend), saúde e hábito alimentar do animal alvo.

Os ácidos orgânicos são comumente chamados de ácidos graxos de cadeia curta, ácidos graxos voláteis ou ácidos carboxílicos fracos. São considerados ácidos orgânicos de cadeia curta os que apresentam cadeias com até sete carbonos. Estas moléculas são denominadas ácidos orgânicos por apresentarem átomos de carbono, ligação com um ou mais carboxilas (COOH) (SNYDER, 1995) e uma cadeia saturada de hidrocarbonetos. A estrutura molecular geral deste composto é R-COOH onde R representa o grupo funcional. Estas moléculas se tornam sais de ácidos orgânicos ao serem ligados/quelados a um sódio, potássio, cálcio, ou outros, tendo assim maior estabilidade e facilidade de manuseio (NG e KOH, 2017).

Estas moléculas são produtos que podem ser oriundos da fermentação natural de microrganismos, sintetizados quimicamente ou pela degradação/oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (THOMAS et al., 2013; PANDEY et al., 2008). Ácidos orgânicos produzidos pela fermentação de carboidratos na microbiota intestinal podem ocorrer sob diferentes condições e vias metabólicas. Alguns ácidos são comumente produzidos dentro do intestino grosso de humanos e em animais que apresentam altas concentração de microrganismos anaeróbios, sendo os principais ácidos produzidos o propiônico e butírico.

Na aquicultura, estudos com a utilização de ácidos orgânicos ou seus sais em animais aquáticos são recentes (SILVA et al., 2013, 2015). Segundo Lückstädt (2008), os mais utilizados são os ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico, láctico, sórbico, málico e cítrico. Os ácidos orgânicos indissociados (ou não dissociados), são lipofílicos e podem difundir-se passivamente através da membrana das bactérias, dissociar-se quando o pH interno é superior a constante de dissociação (pKa), e

promover a diminuição do pH interno. Os íons de H⁺ reduzem o pH interno, sendo incompatível com bactérias que não toleram um gradiente significativo de pH em ambos os lados da membrana (BOOTH e STRATFORD, 2003). Os prótons são bombeados para fora da bactéria, por ação da bomba de ATPase, consumindo energia e esgotando completamente a bactéria. A síntese de ácido nucleico é interrompida, bloqueando as reações enzimáticas e alterando o transporte através da membrana (CHQUIERI et al., 2009).

Sendo assim, os sais e/ou ácidos orgânicos podem atuar diretamente no alimento, no trato intestinal ou no metabolismo dos ácidos graxos, principalmente. Na dieta, atuam na conservação, devido a redução do pH, o que promove a diminuição do crescimento microbiano (LÜCKSTÄDTS, 2008). No trato intestinal, podem aumentar a atividade da pepsina e inibir o crescimento bacteriano, principalmente de bactérias Gram negativas (DEFOIRDT et al., 2009). Já no metabolismo, agem diretamente como fonte de energia para o animal (NG E KOH, 2017; LÜCKSTÄDTS, 2008;). Pesquisas sobre os efeitos da suplementação de sais ácidos orgânicos em dietas para animais aquáticos tem demonstrado melhorias significativas no crescimento, na eficiência nutricional, na alteração da microbiota intestinal e na resistência a patógenos bacterianos (ROMANO et al., 2015; LÜCKSTÄDTS, 2008). Tais aditivos já são conhecidos e empregados na produção de aves e suínos (VIOLA E VIEIRA, 2007; PARTANEN E MROZ, 1999).

a) *Ácido fórmico e/ou formiatos*

O ácido fórmico ou oficialmente ácido metanoico, tem a estrutura mais simples dos ácidos orgânicos. A primeira substância aprovada pelo Conselho Europeu, não antibiótico, para promover o crescimento na produção animal foi o sal orgânico diformato de potássio (KDF) (NG et al., 2009), e dessa forma, esta substância é uma das mais utilizadas em pesquisas aquícolas. Estudos relatam aumento da resistência de animais aquáticos a patógenos, quando a dieta é suplementada com este sal. Ramli et al. (2005) observaram melhorias no ganho em peso e conversão alimentar de tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* suplementadas com 2% de KDF, e que após o desafio com *Vibrio anguillarum*, verificou-se aumento da sobrevivência conforme aumentou-se a concentração do acidificante (2, 3 e 5% de KDF). Fato também evidenciado em tilápias híbridas (*Oreochromis* sp.) suplementadas com 0,2% diformato de potássio e desafio com

Streptococcus agalactiae, onde apresentaram redução de 58,3% para 16,6% na taxa mortalidade (NG et al., 2009). Similarmente, Elala e Ragaá (2015) observaram que *O. niloticus* suplementadas com diformiato de potássio nas concentrações 0,1%, 0,2% e 0,3%, desafiadas via oral com *Aeromonas hydrophila*, apresentaram maior sobrevivência com o aumento desse sal, sendo que as concentrações 0,2% e 0,3% proporcionaram melhorias no ganho de peso, taxa de crescimento específico, conversão alimentar, taxa de eficiência proteica e na digestibilidade aparente da proteína. No entanto, estudos realizados com crustáceos suplementados com ácido fórmico ou formato de sódio não apontam impactos significativos no crescimento de camarão branco do Pacífico *L. vannamei*, dados reportados por Chuchird et al. (2015) e Silva et al. (2015). Contudo, Chuchird et al. (2015) apontaram evidências de a suplementação de ácido fórmico promover maior resistência a enfermidade causada pelo *V. parahaemolyticus* em desafio experimental.

b) Ácido acético e/ou acetatos

O ácido acético ou ácido etanoico é um dos ácidos orgânicos mais difundidos na indústria, pois é encontrado no vinagre de cozinha e utilizado na confecção de garrafas pets. É um ácido orgânico de apenas dois carbonos, comumente produzido na via de beta oxidação de ácidos graxos de cadeia longa. Por exemplo, quando um ácido graxo de cadeia longa de número par é oxidado e clivado por enzimas específicas, a acetil-CoA, que nada mais é do que o radical acetil ligado a coenzima A. Estas pequenas moléculas produzidas na oxidação de ácidos graxos são muito energéticas e entram diretamente no ciclo do ácido cítrico para a geração de energia. Dentre os estudos com a suplementação deste ácido orgânico, Sugiura et al. (2006) relataram que a suplementação de ácido acético na concentração de 5% aumentou a digestibilidade de fósforo (P) e tendeu a diminuir o pH do estômago, mas não interferiu no pH do intestino de truta arco-íris suplementadas.

c) Ácido propiônico e/ou propionatos

Outro sal de ácido orgânico com grande potencial na aquicultura é o propionato de sódio. Silva et al. (2013) demonstraram por múltiplos critérios de seleção, que dentre os seis sais orgânicos de sódio a 2% (acetato, butirato, citrato, formato, L-lactato, propionato) testados como aditivo alimentar para *Litopenaeus vannamei*, o propionato apresentou maior potencial de suplementação, por apresentar boa atividade inibitória *in vitro* contra vibrios e sua redução na microbiota intestinal.

Além disso, os autores observaram melhorias na digestibilidade de fósforo e energia da dieta. Posteriormente, Silva et al. (2015) observaram um aumento na atividade *in vitro* de tripsina e quimotripsina na presença de acetato e propionato de sódio.

Hassaan et al. (2014) avaliaram a suplementação de propionato de cálcio e lactato de cálcio nas concentrações de 0,5%, 1% e 1,5%, em tilápia-do-nylo, e observaram melhorias significativas no ganho de peso, comprimento corporal e crescimento específico em relação ao grupo controle. Da mesma forma, camarões marinhos suplementados com propionato e butirato de sódio em diferentes concentrações (0,5%, 1% e 2%) também proporcionaram aumento no ganho de peso final, ganho de peso semanal, título aglutinante do soro e alteração da microbiota intestinal (SILVA et al., 2016).

Pereira et al. (2018) compararam o efeito de duas concentrações de propionato com dois quelantes diferentes, cálcio e sódio, na dieta de “silver catfish” *Rhamdia quelen* e verificaram que o quelante influenciou positivamente os parâmetros zootécnicos e de saúde, sendo o propionato de cálcio na concentração de 0,25% de inclusão na dieta o aditivo com melhor efeito no animal.

d) *Ácido butírico e/ou butirato*

A utilização de ácido butírico ou butirato de sódio é bem conhecida e estudado em animais terrestres e humanos. Atua na melhoria da saúde intestinal, pois dentre muitas funções pode fornecer energia às células epiteliais, promovendo a diferenciação, proliferação e consequentemente aumento da altura das vilosidades intestinais (CANANI et al., 2011; GALFI E BOKORI, 1990).

Guilloteau et al. (2010) verificaram que o butirato é capaz de modular a resposta inflamatória, inibindo a liberação de algumas dessas moléculas e reduzindo a produção dos mediadores inflamatórios, reduzindo a inflamação e modulando o estresse oxidativo. Os autores concluíram que as mudanças poderiam reduzir os efeitos oxidante danosos e proteger as células da cancerogênese.

Sunkara et al. (2011) demonstraram que a suplementação de butirato de sódio para frangos é um potente indutor de vários peptídeos antimicrobianos e consequentemente proporcionou melhoria da resposta imune inata. Fato também evidenciado por Zhang et al. (2011), os quais verificaram que a adição de butirato de sódio melhorou o ganho de peso e imunidade de aves suplementadas. Em outro estudo com suínos recém-desmamados, Fang et al. (2013) observaram que adição de 0,1% de butirato de sódio reduziu significativamente a incidência de diarreia,

além de melhorar a reposta imune e a integridade da mucosa intestinal. Já, com *Sparus aurata* o butirato de sódio protegido com óleo de palma, na concentração de 0,3%, foi estudado quanto aos efeitos nos processos metabólicos, onde avaliaram mais de 80 moléculas, dentre eles nucleotídeos, aminoácidos e derivados, intermediários da glicólise, coenzimas redox e coenzimas do metabolismo de lipídios. Os autores observaram aumento de ganho em peso dos animais suplementados e alguns efeitos deste aditivo no metabolismo. Ao que tudo indica, o butirato de sódio aumenta a disponibilidade de vários aminoácidos essenciais e derivados de nucleotídeos, além de fornecer energia para as células entéricas (ROBLES et al., 2013).

Além disso, sabe-se que a suplementação de Na-butilato em outras formas, como a forma de polímero, também pode promover absorção gradual ao longo do trato intestinal. Situmorang et al. (2016) avaliaram a alimentação de larvas de *O. niloticus*, por 28 dias, com a suplementação do polímero β -hidroxibutilato (PHB) em diferentes concentrações de inclusão na dieta (0,5%, 2,5% e 5%), verificaram melhores taxas de crescimento específico no grupo suplementado com a menor concentração de PHB (0,5%).

e) *Blends de ácidos orgânicos e/ou seus sais*

Diante de tais fatos, fica eminente que o uso de aditivos alimentares constituídos de sais e ácidos orgânicos isoladamente pode propiciar grandes benefícios aos diferentes hospedeiros, sejam animais terrestres ou aquáticos. Entretanto, estas substâncias podem, ou não, ser utilizadas conjuntamente a fim de potencializar seus efeitos. Ng et al. (2009) utilizaram uma mistura de seis ácidos orgânicos (0,1%, 0,2%, 0,3%) e KDF (0,2%) na dieta de tilápias híbridas e observam aumento da sobrevivência dos peixes suplementados com 0,2% de KDF e 0,1% da mistura, em desafio experimental com *Streptococcus agalactiae*.

Com abalone *Haliotis midae* suplementados com ácido acético + fórmico (1:1), ácido benzoico + sórbico (1:1) e benzoato + sorbato (1:1) todos na concentração de 1%, apresentaram maior ganho de peso e taxa de crescimento específico em relação ao grupo controle (GOOSEN et al., 2011). Entretanto, em trutas *Oncorhynchus mykiss* suplementada com uma mistura de sais de ácido orgânico (OAB, na concentração de 1%, formada de formato de sódio e butirato de sódio na proporção 2:1 em duas dietas com diferentes fontes de proteína (animal ou vegetal), foi relatado que a adição de OAB em ambas as dietas, após extrusão, reduziu a digestibilidade da gordura bruta, não favoreceu o crescimento e influiu negativamente na conversão alimentar (GAO et al., 2016).

O efeito sinérgico da suplementação do ácido propiônico + fórmico (3:2), na concentração de 0,6% para *Oncorhynchus mykiss*, foi investigada por Jaafar et al. (2013), os quais verificaram mudanças significantes na microbiota intestinal dos animais. Já em estudo avaliando uma mistura de ácidos orgânicos, compostos de formiato, láctico, málico e ácido cítrico, microencapsulado com estearina, nas concentrações de 1%, 2% e 4% na dieta de *L. vannamei*, foi relatado que 2% de OAB promoveu maior ganho de peso, menor concentração de vibrios e melhor digestibilidade da matéria seca e fósforo. Após desafio experimental com *Vibrio harveyi*, os animais suplementados com OAB, independente da concentração, apresentaram maior atividade de fenoxidase e menores lesões no hepatopâncreas, sendo a suplementação de 1% e 2% de OAB as que apresentaram maior sobrevivência, quando comparadas ao controle e ao grupo suplementado com 4% de OAB (ROMANO et al., 2015).

Adaptações para o uso de ácidos e sais orgânicos na aquicultura

Ainda são poucos os estudos com ácidos orgânicos e seus sais para espécies aquáticas, além disso, os resultados são frequentemente inconsistentes e as respostas são altamente variáveis. Tais variações podem ser causadas por vários fatores, como o estágio de vida do animal, a fonte do sal ou ácido orgânico, o hábito alimentar da espécie, a concentração do ácido orgânico usado na dieta, a forma de proteção, a interação entre a mistura de sais orgânicos, bem como o estado de saúde dos animais (JESUS et al., 2019; NG E KOH, 2017; LIM et al., 2010).

Para o uso de sais e ácidos orgânicos nas dietas de peixes e camarões há necessidade de adaptações, uma vez que existem diferenças anatômicas e fisiológicas essenciais no sistema digestório dos animais aquáticos, quando comparados entre si e quando comparados aos terrestres. Aspectos relacionados ao comprimento do trato intestinal das espécies-alvo, tempo de passagem da alimentação ao longo do trato intestinal e a capacidade do ácido/sal orgânico para resistir à ação do ácido clorídrico no estômago devem ser considerados.

Na tentativa de alcançar maior eficiência dos ácidos orgânicos e seus sais, alguns destes produtos são revestidos com derivados de óleos vegetais, que permitem a proteção e liberação de seu princípio ativo ao longo do intestino dos animais de criação. A microencapsulação pode assegurar que o ácido orgânico não dissociado seja absorvido ao longo de todo o trato intestinal, caso contrário, seria provavelmente totalmente

absorvido nas primeiras porções do intestino (PIVA et al., 1997). Além disso, na aquicultura, esses revestimentos ajudam a proteger contra a lixiviação de ácidos orgânicos ou sais na água (SILVA et al., 2016). Como exemplo de produtos encontrados no mercado, existem produtos que possibilitam a liberação de seu princípio ativo (ácido orgânico / sal) no local de ação desejado, pois o princípio ativo é encapsulado com um revestimento de óleo, além de outros os produtos, os quais são quimicamente e fisicamente protegidos por sais tamponantes, evitando que se dissolvam e se desintegram na parte inicial do sistema digestório.

Dessa forma, novas pesquisas devem ser direcionadas para a adaptação do uso desses aditivos em espécies aquáticas, a fim de viabilizar a sua utilização em escala comercial de forma eficiente.

Ácidos orgânicos e óleos essenciais

Os óleos essenciais já são conhecidos na produção animal, pois possuem substâncias bioativas capazes de inibir patógenos, beneficiar os parâmetros de crescimento, modular a microbiota intestinal, diminuir o estresse, incrementar a imunidade e resistência dos animais frente a desafios (DA CUNHA et al., 2018; SUTILI et al., 2016; GIANNENAS et al., 2012).

Segundo da Cunha et al. (2018), o mecanismo de ação dos óleos essenciais depende dos seus principais grupos funcionais e sua concentração final na solução. Os óleos essenciais que contém majoritariamente terpenos (p - cimeno, limoneno, terpineno, sabineno e pineno) e algumas estruturas oxigenadas (borneol, cânfora, 1,8 cineol, α -pineno, camfona, verbenona e acetato de bornil) apresentam atividade antibacteriana fraca ou inexistente. Os terpenóides (timol, carvacrol, mentol, geraniol, acetato de linalila, citronelal e piperitona) apresentam sua atividade antibacteriana mediada pelo grupo funcional, atuando na membrana das bactérias, alterando sua permeabilidade e fluidez, além de afetar as proteínas da membrana e enzimas periplasmáticas. Os fenilpropenóides (eugenol, isoeugenol, vanilina, safrol e cinamaldeído) apresentam atividade antimicrobiana conferida por grupos hidroxila livres, e seu mecanismo de ação depende o tipo e o número de substituições no anel aromático da sua estrutura.

Na aquicultura, diversos estudos relatam efeitos positivos da suplementação de ácidos/sais orgânicos, assim como óleos essenciais, na nutrição e saúde de peixes, porém ainda existe uma grande lacuna de informações elucidando os reais efeitos desses compostos quando utilizados conjuntamente. O conceito de utilização sinérgica desses dois compostos se dá ao fato dos óleos essenciais agirem sobre as

membranas biológicas das bactérias, causando mudanças na sua composição lipídica, alterando a sua fluidez, facilitando assim a ação dos ácidos orgânicos. Estudos sugerem que os compostos ativos dos óleos essenciais podem se ligar à superfície celular, inibindo o crescimento das bactérias, degradando a membrana plasmática e as proteínas de membrana, reduzindo a força motriz de prótons, reduzindo a síntese de ATP e aumentando a hidrólise, aumentando a permeabilidade da membrana aos prótons (efeito o qual pode ser potencializado pela utilização dos ácidos orgânicos) e consequente redução do pH interno da bactérias (DA CUNHA et al., 2018; BAJPAI et al., 2013; BAJPAI et al., 2008). Dessa forma, estudos que avaliem o efeito sinérgico desses aditivos são necessários para maior entendimento de sua eficácia e mecanismos de ação.

JUSTIFICATIVA

Para a continuidade no crescimento e desenvolvimento da aquicultura, existe a necessidade de se criar estratégias capazes de minimizar os prejuízos oriundos do aparecimento de doenças nos cultivos. A ferramenta mais difundida atualmente para o controle de bacterioses são os antibióticos, porém estes podem favorecer a seleção de bactérias resistentes e seu acúmulo tanto na carne dos peixes, como no ambiente.

Devido à necessidade de reduzir os efeitos do uso de antibióticos na piscicultura e melhorar o controle e a prevenção de enfermidades, técnicas e produtos alternativos devem ser adotadas. Uma das alternativas é a utilização de sais orgânicos como aditivos alimentares capazes de auxiliar na diminuição do impacto ambiental da atividade, além de trazer benefícios aos cultivos.

Estudos realizados até o momento indicam que os sais orgânicos possuem bom potencial como suplemento alimentar para melhorar, principalmente, as taxas de desempenho zootécnico, eficiência alimentar, digestibilidade de nutrientes; alterar a microbiota intestinal e aumentar a resistência a doenças das espécies aquáticas. Contudo, ainda são poucos os estudos sobre a ação dos sais orgânicos na nutrição de peixes, os quais são necessários para melhor compreender os mecanismos e seus potenciais efeitos nos animais de cultivo.

O sal orgânico butirato tem recebido grande destaque devido aos efeitos positivos causados no trato intestinal de diversos animais. Possui um grande potencial como ferramenta alternativa aos antibióticos

promotores de crescimento, além de ser fonte energética preferencial para os enterócitos, atuando sobre o crescimento e a integridade da mucosa, favorecendo a absorção de minerais e atuando positivamente sobre a microbiota intestinal, favorecendo microrganismos benéficos e controlando os patogênicos.

Para maior eficiência dos sais orgânicos, alguns destes produtos possuem revestimentos derivados de óleos vegetais, que possibilitam a proteção e liberação do seu princípio ativo ao longo do intestino dos animais cultivados, porém os reais efeitos do revestimento e seu modo de ação no trato intestinal ainda não estão bem definidos. O mesmo se aplica para a ação sinérgica de ácidos/sais orgânicos e óleos essenciais, onde muitos resultados positivos se espera, principalmente na potencialização do efeito do ácido, porém ainda não há evidências concretas dos reais efeitos do uso combinado dos aditivos.

Atualmente existe uma série de produtos comerciais à base de sais orgânicos no mercado agropecuário, porém a grande maioria é direcionada para o uso em animais terrestres, sendo pouco conhecidos os seus efeitos, as formas e concentrações ideais de aplicação na dieta de animais aquáticos. O número limitado de informações sobre a influência dos sais orgânicos na nutrição de peixes proporciona caráter de ineditismo, sendo importante a realização de estudos que avaliem seu uso como aditivos alimentares na nutrição e saúde de tilápia-do-nilo nas fases de larvicultura e engorda.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Contribuir para o desenvolvimento da piscicultura, avaliando o uso do butirato de sódio como aditivo alimentar no auxílio da nutrição e saúde de tilápia-do-nilo

Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos das diferentes concentrações de suplementação de butirato de sódio, na forma protegida e desprotegida, em juvenis de tilápia-do-nilo, sobre os parâmetros zootécnicos, hematológicos e de resistência à doença (Capítulo I).

- Avaliar os efeitos das diferentes concentrações de suplementação de butirato de sódio, na forma protegida e desprotegida,

em juvenis de tilápia-do-nylo sobre a atividade de enzimas digestivas, alterações e integridade de intestino e fígado (Capítulo II).

- Avaliar os efeitos das diferentes concentrações de suplementação de butirato de sódio sobre a microbiota intestinal de juvenis de tilápia-do-nylo (Capítulo III).

- Avaliar os efeitos da suplementação dietética de butirato de sódio e *Lippia origanoides*, de forma combinada ou isolada, sobre os parâmetros de saúde e desempenho zootécnico de juvenis de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) (Capítulo IV).

FORMATAÇÃO DOS CAPÍTULOS DA TESE

Esta Tese está dividida em introdução geral e quatro capítulos redigidos em forma de artigo científico, sendo o Capítulo I e Capítulo II referentes aos artigos publicados no periódico “Aquaculture”, o Capítulo III formatado segundos as normas do periódico “Journal of Applied Microbiology” e o capítulo IV formatado segundos as normas do periódico “Aquaculture”.

CAPÍTULO I

Protected forms of sodium butyrate improve the growth and health of Nile tilapia fingerlings during sexual reversion.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.027>

Gabriel F.A. Jesus^a; Scheila A. Pereira^a; Marco S. Owatari^a; Nicholas Syracuse^a; Bruno C. Silva^b; Allan Silva^a; Bruno S. Pierri^a; Nicollas B. Lehmann^a; Henrique C.P. Figueiredo^c; Débora M. Fracalossi^a; José L.P. Mouriño^a; Mauricio L. Martins^{a*}

^aAQUOS - Aquatic Organisms Health Laboratory, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

^bEPAGRI - Company of Agricultural Research and Rural Extension of Santa Catarina, Rod. Antônio Heil, 6800, 88318112, Itajaí, SC, Brazil.

^cFederal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Abstract

The present study evaluated the effect of pure and protected sodium butyrate with palm oil and buffered solution supplemented in the diet of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* on the performance parameters, hematological parameters and disease resistance, during sexual reversion. Initially, the minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium butyrate (Na-butyrate) against *Aeromonas hydrophila* or *Streptococcus agalactiae* under three different pH to determine the concentration of inclusion of Na-butyrate in the diet were analyzed. After that a total of 3,150 newly hatched post-larvae (0.0183 ± 0.0014 g) were distributed in 21 tanks with 100 L of capacity on six treatments and one control, in triplicate: fish fed unsupplemented diet (control); fish fed Na-butyrate supplemented diet (Pure 0.25% and Pure 0.5%); fish fed Na-butyrate coated with palm oil (Oil 0.25% and Oil 0.5%) and fish fed Na-butyrate coated with buffered solution (Buffer 0.25% and Buffer 0.5%). After 28 days of feeding, zootechnical parameters, hematological parameters and resistance against *A. hydrophila* were verified. The MIC results showed that Na-butyrate had a better inhibitory effect *in vitro* at pH 6 and 6.6 than at pH 7, regardless of the microorganism. The addition of Na-butyrate at different concentrations and forms did not influence the sexual reversal process of tilapia. Yield and biomass gain

showed an increment in fish fed Buffer_{0.5%} and Oil_{0.5%}. Moreover, fish fed Oil_{0.5%} had a better feed conversion ratio than the other groups. An increase in the red blood cells (RBC) and monocytes were observed in fish fed Buffer_{0.5%} and Oil_{0.25%} when compared to control group, while those fed Pure_{0.25%} and Oil_{0.5%} showed the lowest monocytes number when compared to Buffer_{0.5%} and Oil_{0.25%}. After challenge by immersion in *A. hydrophila* solution, no difference was found among the treatments for 14 days of observation, except for the nonchallenged fish that showed no mortality ensuring the effectiveness of the experimental infection. The use of coated Na-butyrate either in buffer or oil showed to be feasible to improve the zootechnical parameters of Nile tilapia during the sexual reversion period.

Key-words: organic salts, animal health, sodium butyrate, feed additive, aquaculture.

Introduction

The use of salts of organic acids is a preventive alternative in the maintenance of the health of cultured fish, because of its actions in the gastrointestinal tract, inhibiting the growth of pathogenic bacteria, mainly Gram-negative, aiding in the digestion and absorption of nutrients, besides exerting beneficial effects on animal performance (Hossain et al., 2007; Defoirdt et al., 2009).

In tilapia farming, one of the main ways to disseminate diseases through crops is the insertion of fish carrying pathogens, often with no clinical signs. After sexual reversion phase that consists in one of the most critical stages in tilapia production cycle, the fingerlings are marketed to different production units and can spread the pathogens to different regions. Therefore, the use of tools to improve the nutritional quality and animal health during sexual reversion is fundamental for sustainable aquaculture and productive chain.

In aquaculture, studies using organic acids or their salts in aquatic animals are recent (Silva et al., 2013, 2016). According to Ng and Koh (2017) the most investigated organic acids in aquaculture is citric acid and its salts and formic acid and its salts.

Organic acids can act in the gastrointestinal tract by inhibiting the growth of pathogenic bacteria, especially Gram-negative bacteria; aid in the digestibility and absorption of nutrients and present positive effects on the fish growth performance (Hossain et al., 2007; Defoirdt et al., 2009).

Organic acids may act by different ways such as: when not dissociated they are lipophilic and may diffuse passively through the

bacterial cell wall. In the cytosol they can dissociate at a pH higher than the dissociation constant (pKa) and promote the decrease of internal pH. The reduction of pH leads to the production of H⁺ protons, which is incompatible with the osmotic maintenance in the bacterial cell membrane, as they do not tolerate a significant pH gradient (Booth and Stratford, 2003). In this way, the protons are pumped out of the bacteria by the action of the ATPase pump, consuming energy and completely depleting the bacteria. In addition, the nucleic acid synthesis is interrupted, therefore blocking the enzymatic reactions and altering the transport through the membrane, which can culminate in bacterial death (Chiquieri et al., 2009).

A study with 0.2% potassium diformate (KDF) dietary supplementation for red hybrid tilapia *Oreochromis* sp. showed significant decrease in the mortality rate after challenge with *Streptococcus agalactiae* going from 58.3% to 16.6% (Ng et al., 2009). Another study using supplementation of a commercial product with organic acid mixture (Acilux) at concentrations of 0.1% to 0.4% for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* found increased growth and resistance to disease after challenge with *Vibrio anguillarum* (Sherif and Doaa, 2013). Improved carcass yield and fish health have also been reported by Reda et al. (2016) in Nile tilapia fed supplemented diet with a mixture of formic acid, propionic acid and calcium propionate at concentrations of 0.1% and 0.2%.

Among the organic salts used in animal production, butyrate has been emphasized due to its positive effects on the gastrointestinal tract of animals (Guilloteau et al., 2010). The butyric acid is a short chain fatty acid, which becomes sodium butyrate (Na-butyrates) by being chelated to the sodium mineral (Na⁺) having the molecular formula presented as C₄H₇O₂Na. The salt is often used instead butyric acid, because it presents higher stability and less intense odor. This salt can be used on its free form, without any protection or coated by microencapsulation through the use of oils or buffer solutions (Piva et al., 2007).

Butyrate can be chemically obtained by the fermentation of beneficial bacteria in the intestinal tract. Kihara and Sakate (1997, 2001) demonstrated that butyrate is produced indirectly by the intestinal microbiota of fish that has been studied as an alternative way to provide defense against pathogenic bacteria. However, oral supplementation with this additive without prior protection may lead to losses on its effectiveness in the intestinal tract. Liu et al. (2014) observed that oral supplementation with microencapsulated sodium butyrate for two weeks

in common carp *Cyprinus carpio* was able to improve the immune status and intestinal condition. Lim et al. (2015) presented a series of studies that have demonstrated positive effects with organic acids or salts supplementation in the diet of fish leading to improved growth rate, feed efficiency and resistance to diseases, however there are studies that do not show similar results (Gislason et al., 1996; Bjerkgeng et al., 1999). The results are frequently inconsistent and the responses are highly variable that may be caused by a number of factors, such as the animal's life stage, the source of the salt or organic acid, the food habit of the species, the concentration of organic acid used in the diet, protection form, interaction between the mix of organic salts, as well as the fish health status (Ng and Koh, 2011; Lim et al. 2015).

For the use of salts and organic acids in fish diets there is a need for adaptations, since there are essential anatomical and physiological differences in the digestive system of aquatic animals when compared to terrestrials. Aspects related to intestinal tract length of the target species, time of feed passage along the intestinal tract, the ability of the acid/organic salt to resist the action of hydrochloric acid in the stomach should be considered.

In order to achieve greater efficiency of the organic acids/salts, some of these products have been coated with derivatives from vegetable oils, which allow the protection and release of their active principle only in the intestines of farmed animals. Microencapsulation can ensure that the undissociated organic acid are absorbed throughout the intestinal tract, otherwise would probably be totally absorbed in the small intestine region (Piva et al., 1997). In addition, in aquaculture these coatings help to protect against the leaching of organic acids or salts in the water (Silva et al., 2016).

As an example, the commercial product CM3000[®] enables the use of its active principle (Na-butyrate) at the desired site of action, because the active principle is encapsulated with a double coating of palm oil, according to the manufacturer. In the commercial product Butirex C4 Na-butyrate is chemically and physically protected by buffering salts, preventing it from dissolving and disintegrating in the initial part of the digestive system.

According to the topic, the lack of studies using organic salts during the sexual reversion phase, the present study aimed to verify the effect of Na-butyrate in protected and unprotected forms under two different concentrations (0.25% or 0.5%) on the growth performance, hematological parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia, during the sexual reversion.

Material and methods

Initially, the isolation of bacteria pathogenic to Nile tilapia was carried out for use in an experimental challenge. To determine the right pathogenic strain to be used in the experimental challenge, an *in vivo* pathogenicity assay was performed. An *in vitro* assay was realized to determine the inclusion concentration of Na-butyrate in the diets used in the *in vivo* test, minimum inhibitory concentration (MIC) test, which was able to indicate the concentrations that sodium butyrate has an antimicrobial effect against pathogenic bacteria to Nile tilapia. After determining the ideal concentrations, an assay with Nile tilapia fingerlings was performed to verify the effect of pure sodium butyrate and of two inclusion concentrations in the diet, which were protected with palm oil and with buffer solution.

***In vitro* analysis**

Isolation of *Aeromonas hydrophila*

Prior to the experimental infection, the pathogenic *A. hydrophila* strain (FF1) was isolated from a mortality outbreak of *O. niloticus* in the year 2016 in a commercial farm in the north of the state of Santa Catarina - Brazil. A total of eight moribund Nile tilapia, weighing approximately 400 g, were collected for subsequent isolation of the bacteria. Fish had clinical signs such as: dark skin; erratic swimming; lethargy; hemorrhages in the caudal fin and ascites. Liver, kidney and spleen were aseptically removed, macerated, seeded in brain-heart-infusion broth (BHI) culture medium (Himedia, Mumbai, India) and incubated at 26 ° C (pond temperature at collection) for 24 h. After growth in BHI, cultures were plated on tryptone soya agar (TSA) (Himedia, Mumbai, India) supplemented with 5% sheep blood to isolate haemolytic bacteria, and incubated at 26 ° C for 24 h. After growth in blood TSA, the strains were selected for each origin (each organ from each fish) that showed different colonies and different morphologies and Gram staining. Individual colonies were isolated from the plates to compose pure cultures. At the end of the process, four bacterial strains (FF1, FR1, FR2 and FB4) were selected, which showed total hemolysis in the blood TSA plates. These microorganisms were sent to AQUACEN / RENAQUA Laboratory, Federal University of Minas Gerais, for molecular identification.

Identification of *Aeromonas hydrophila* by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and phenotypic characteristics

All isolates were thawed and streaked onto TSA and incubated at 26 °C for 24 h. A fresh single colony of each bacterial strain was spotted using a toothpick into a target steel plate. For each strain, 1 µl of formic acid (70 %) and 1 µl of MALDI-TOF MS matrix, a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) were applied on top of the spot and allowed to air dry. Spectra were acquired using FlexControl MicroFlex LT mass spectrometer (Bruker Daltonics) with a 60-Hz nitrogen laser, in which up to 240 laser shots are fired in spiral movement to collect 40 shots steps for each strain spot. Furthermore, parameters for mass range detection were defined to allow identification from 1,960 to 20,137 m/z, Ion source 1 voltage was 19.99 kv, Ion source 2 voltage was 18.24 kv and lens voltage was 6.0 kv were used for data acquisition. Prior to measurements, calibration was preceded with a bacterial test standard (*E. coli* DH5 alpha; Bruker Daltonics). The Real-Time identification score criteria used were those recommended by the manufacturer: score ≥ 2.000 indicating species-level identification, score ≥ 1.700 and < 2.000 indicating genus-level identification, and score < 1.700 indicating no reliable identification.

Bacteria phenotypic characterization was made using the API identification kit 20E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), and biochemical tests such as esculin hydrolysis, gas production due to glucose fermentation, were carried out according to the Aerokey II identification key to differentiate aeromonas species (Carnahan et al., 1991).

Pathogenicity assay

This test was carried out to select one among the four isolated strains which had the highest pathogenicity to use in the experimental challenge. A total of 80 tilapia of approximately 1 g were distributed in ten experimental units (10 L), with constant aeration (5.63 ± 0.94 mg L⁻¹), heating ($28.4 \pm 0.7^\circ\text{C}$) and then challenged via immersion bath in duplicate. Thus, the animals were immersed and kept in boxes of 10 L containing water inoculated with the respective strains in the final concentration of 1×10^8 CFU mL⁻¹. The inoculum was prepared as follows: first the strains were cultured in BHI at 26°C for 24 h. Subsequently they were centrifuged at 4,000 g at 4°C for 30 min and resuspended in phosphate buffered solution (PBS - 0.04M monobasic

sodium phosphate and 0.16 M dibasic sodium phosphate at pH 7.2). The control group was maintained in water containing only sterile PBS. Mortality was verified every 6 h, during 96 h, being selected the strain that caused higher mortality in less time.

Feed and intestinal pH analysis

In order to verify the ideal pH values for the *in vitro* MIC pre-test, the pH of the control diet and intestinal tract of Nile tilapia fingerlings were measured. The pH of the diet was measured in triplicate according to the methodology described by Baruah et al. (2005). The intestinal pH of the fingerlings was measured according to Elala and Ragaa (2015), where 2 h after feeding with the diet without supplementation (control), 45 animals with a mean weight of 0.68 ± 0.029 g were euthanized and their intestinal tracts were removed. Samples of 0.25 g of intestinal tract were homogenized for 30 s with 2.25 mL of distilled water for determination of pH, in triplicate.

Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

To evaluate the antimicrobial concentration of Na-butyrate in its unprotected form, the minimum inhibitory concentration at different pHs was determined to verify the minimum concentration capable of totally inhibiting the growth of two pathogenic bacteria for Nile tilapia: *Aeromonas hydrophila* (FF1) and *Streptococcus agalactiae* (AQP / 049), being the first a Gram-negative pathogenic bacterium and the second a Gram-positive that is the major cause of mortality in tilapicultura, besides being a lactic acid producer bacteria (Kling et al., 2009).

To set the MIC, Na-butyrate (Sigma-Aldrich, MO-USA) was diluted in 1% peptone (PB) broth, in a final concentration of 8%, being a solution calibrated in pH 6, one in pH 6.6 and another in pH 7, which are desired values for the assay according to the results obtained in the pH analyzes of the diet and intestinal tract. The bacteria were cultured in Brain and Heart Infusion (BHI) broth and incubated for 24 h at 30°C. For the MIC, 100 μ L PB was added to each well of the flat bottom 96-well microplate and 100 μ L of sodium butyrate at the initial concentration of 8% in the first well of the line. Subsequently, a serial dilution in factor 2 was performed until the 12th well. Finally, 20 μ L of the bacterium suspensions prepared at the concentration of 1×10^5 CFU mL^{-1} were inoculated in all respective wells and incubated at 30°C for 24 h in an incubator with orbital shaking. The minimum inhibitory

concentration was determined, in triplicate, as the last dilution of the organic salt where total inhibition occurred.

Experimental diets

For the *in vivo* assay, the isonitrogenous and isoenergetic experimental diets were prepared based on the nutritional requirements of *Oreochromis sp.* juveniles, following NRC (2011) and Furuya et al. (2010).

Seven diets were prepared: without supplementation (control); supplemented with sodium butyrate 99% (Sigma-Aldrich, MO, USA) at concentrations of 0.25% (Pure_{0.25%}) or 0.5% (Pure_{0.5%}); with commercial product CM3000[®] 30% (VETANCO, Argentina) at concentrations of 0.25% (Oil_{0.25%}) or 0.5% (Oil_{0.5%}) and commercial product Butirex C4[®] 54% (Novation, Spain) at concentrations of 0.25% (Buffer_{0.25%}) or 0.5% (Buffer_{0.5%}). The addition of the organic salts in the experimental diets replaced Cellulose. All butyrate inclusions were performed based on the amount of active ingredients in the different products.

After diet preparation, the fish received 60 mg of methyl-testosterone kg⁻¹ of feed to induce the masculinization of the animals (Ng and Romano, 2013). The hormone was incorporated into the feed by mixing it with 400 mL of alcohol (96° GL) kg⁻¹ of prepared diet. The wet diet was placed on trays for 24 h in a well-ventilated room sheltered from the sun to allow the complete evaporation of the alcohol.

The proximate analysis of the seven diets were performed by the Nutrition Laboratory, UFSC (LabNutri/UFSC) according to methods standardized by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1999) with exception of energy, which was determined of the combustion in a calorimetric by the method of Potter and Matterson (1960). Variables analysed included moisture (measured by oven drying at 105°C to constant weight, method 950.01), ash (measured by muffle incineration at 550°C, method 942.05), crude protein (measured using the Kjeldahl method, method 945.01) and total lipid (measured using the Soxhlet method, method 920.39). Dietary carbohydrate (N-free extract) was estimated using the difference between the values of protein, lipid, ashes and moisture (Table 1).

Table 1: Ingredients and proximate composition analysis of the experimental diets (%) supplemented or not with sodium butyrate, which were fed to Nile tilapia for 28 days.

Ingredients (%)	Control	Pure	Pure	Oil	Oil	Buffer	Buffer
		0.25%	0.5%	0.25%	0.5%	0.25%	0.5%
Salmon by-product meal (71% CP)	56.00	56.00	56.00	56.00	56.00	56.00	56.00
Corn	36.00	36.00	36.00	36.00	36.00	36.00	36.00
Soy oil	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Premix microminerals ¹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Premix macrominerals ²	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cellulose	2.00	1.74	1.49	1.16	0.32	1.57	1.14
Sodium butyrate ³	0.00	0.26	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
CM3000 ^{®4}	0.00	0.00	0.00	0.84	1.68	0.00	0.00
Butirex C4 ^{®5}	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.43	0.86
Energy (kcal·kg ⁻¹)	4329	4329	4329	4329	4329	4329	4329
Crude protein	44.93	45.49	44.85	45.00	45.10	45.11	45.27
Ether extract	9.83	9.77	9.33	10.33	10.90	9.34	9.99
N-free extract	24.02	21.49	24.83	22.45	22.03	23.61	24.36
Ashes	11.28	11.10	11.52	11.40	11.38	11.38	12.06
Moisture	9.94	12.15	9.47	10.82	10.59	10.56	8.32

¹ Micromineral premix composition: Phosphorus 7,38 g kg⁻¹; Copper 3500 mg kg⁻¹; Iodine 160 mg kg⁻¹; Iron 20000 mg kg⁻¹; Manganese 10000 mg kg⁻¹; Zinc 24000 mg kg⁻¹; Selenium 100 mg kg⁻¹; Vitamin A 2400000 UI kg⁻¹; Vitamin D 600000 UI kg⁻¹; Vitamin E 30000 UI kg⁻¹; Vitamin K 3000 mg kg⁻¹; Riboflavin 4500 mg kg⁻¹; Pantothenic Acid 1000 mg kg⁻¹; Niacin 2000 mg kg⁻¹; Vitamin B12 8000 mg kg⁻¹; Choline 100000 mg kg⁻¹; Folic acid 1200 mg kg⁻¹; Biotin 200 mg kg⁻¹; Thiamine 4000 mg kg⁻¹; Vitamin B6 3500 mg kg⁻¹; Vitamin C 60000 mg kg⁻¹. ² Macromineral premix composition: Cálcium 70 g kg⁻¹; Magnesium 4 g kg⁻¹; Potassium 10,80 g kg⁻¹; Sódium 5,07 g kg⁻¹. ³ Pure sodium butyrate 99% pure. ⁴ CM3000[®] protected with 30% pure vegetable oil. ⁵Butirex C4[®] buffered with 54% purity.

Experimental design

The experiment was carried out at AQUOS-Aquatic Organisms Health Laboratory, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC). The post-larvae of Nile tilapia were obtained from the Agricultural Research and Rural Extension Company of Santa Catarina (Epagri). All animal procedures were approved by the Ethic Committee on Animal Use (CEUA-6827181016).

After transportation, a total of 3,150 post-larvae were randomly distributed into 21 tanks with 80 L, totaling 150 animals per experimental unit. These tanks were equipped with a recirculation aquaculture system composed by a decanter to remove solids, a mechanical filter, aerobic filters and UV filter (Cubos-16 W, São Paulo, Brazil), heater at the central tank (1,000 W), air blower (1/4 HP), capable of maintaining the parameters of water quality in ideas values for the growth of the species. The photoperiod was 12 h.

Fish were acclimatized for two days in the experimental tanks while feeding the control diet. After acclimatization, fish were considered healthy, without deformities or erratic swimming, absent of clinical signs characteristic of bacterial and fungal infections, besides presenting good appetite and good acceptance of the feed.

After this period, the post-larvae of Nile tilapia with approximately 5 days after hatching, with size smaller than 13.0 mm and an approximate mean weight of 0.0183 ± 0.0014 g, were submitted to the different treatments, in addition to the control group, in triplicate, being:

- Unsupplemented (control)
- Supplemented diet with 0.25% sodium butyrate (Pure 0.25%)
- Supplemented diet with 0.5% sodium butyrate (Pure 0.5%)
- Supplemented diet with 0.25% active principal of CM3000® (sodium butyrate protected with palm oil) (Oil 0.25%)
- Supplemented diet with 0.5% active principal of the CM3000® (Oil 0.5%)
- Supplemented diet with 0.25% active principal of Butirex C4 (sodium butyrate with buffer solution) (Buffer 0.25%)
- Supplemented diet with 0.5% active principal of Butirex C4 (Buffer 0.5%)

Fish were fed experimental diets five times a day (8 a.m., 10 a.m., 12 p.m. 2 p.m. and 5 p.m.) for 28 days, at an initial feeding rate of 20%, which was adjusted weekly after performing biometrics (Rani e Macintosh, 1997).

After 28 days of experiment, fish were fasted for 14 h and subsequently anesthetized in a solution of Eugenol (75 mg L^{-1}) and

euthanized by cerebral commotion for sample collection, in order to evaluate the zootechnical and hematological parameters.

The water quality parameters were: dissolved oxygen 6.42 ± 0.87 mg L⁻¹ and temperature 28.05 ± 0.82 °C measured with YSI-550A oximeter; total ammonia 0.32 ± 0.11 mg L⁻¹; nitrite 0.15 ± 0.12 mg L⁻¹ and pH 7.41 ± 0.29 , measured with the Labcon Test colorimetric kit.

Sexual reversion

Ten percent of the animals used in the experiment, totaling 15 animals per tank (45 animals per treatment) were fasted for 14 h to empty the gastrointestinal contents. Subsequently, the animals were euthanized and fixed in 10% buffered formalin solution for 7 days. The technique of sexing was determined by visualizing the gonads under an optical microscope, where the gonads were removed and placed on a glass slide. Subsequently, the slides received one drop of the aceto-carmin dye (0.5 g of carmine in 100 ml of 45% solution of glacial acetic acid) for observation in light microscopy at 100 x magnification.

Zootechnical parameters

At the end of the experiment the following zootechnical parameters were evaluated: biomass gain, weight gain, survival, feed conversion, yield and protein efficiency ratio (PER), as described below.

$$\text{a) Biomass gain (g)} = [(\text{Final biomass} - \text{Initial biomass})]$$

$$\text{b) Weight gain (g)} = \left[\frac{(\text{Biomass gain})}{\text{Total number of fish}} \right]$$

$$\text{c) Survival (\%)} = \left[\frac{(\text{Initial Population} - \text{Final Population})}{\text{Initial Population}} \right] \times 100$$

$$\text{d) Feed conversion} = \left[\frac{\text{Offered feed}}{(\text{Biomass gain})} \right]$$

$$\text{e) Yield (kg m}^{-3}\text{)} = \left[\frac{(\text{Biomass gain})}{\text{Experimental unit volume}} \right]$$

$$\text{f) PER} = \left[\frac{\text{Gain in body mass}}{\text{Protein intake}} \right]$$

Hematological parameters

For the hematological analysis, five animals per experimental unit were collected, totaling 15 individuals per treatment. Blood was obtained by puncturing the caudal vessel with a 1.0 mL syringe with a

drop of 10% EDTA, to prepare the blood smear in duplicate stained MayGrünwald-Giemsa-Wright, according to Ranzani-Paiva et al. 2013 and leukocyte (WBC) were determined by an indirect method (Ishikawa et al., 2008). Another aliquot of collected blood (4 μ L) was transferred (1: 200 dilution) to Eppendorf tubes containing modified Dacie solution according to Blaxhall and Daisley (1973), for the quantification of the total number of red blood cells (RBC) with a Neubauer chamber.

Challenge test

After 28 days of experiment, the experimental challenge was performed, where a total of 240 animals, 10 animals from each experimental unit (30 animals per treatment) were distributed in 24 experimental units (30 L) coupled to a recirculation system containing aerobic filters and filter UV, heater in the central tank (28.2 ± 0.5 ° C) and air blower (6.11 ± 1.02 mg L⁻¹), capable of maintaining water quality in the optimum range for cultivation of the species.

The *A. hydrophila* strain (FF1) was grown in BHI culture medium (Himedia, India) at 26° C for 24 h. The culture was centrifuged at 1,500 g 10 min and the supernatant discarded. The bacterial precipitate was resuspended in PBS. After 2 days of acclimation, the animals were anesthetized and immersed in an aquarium (10 L) for 30 min, with constant aeration (5.42 ± 0.67 mg L⁻¹), containing the bacterial inoculum at the concentration of 1×10^7 CFU mL⁻¹, a lighter concentration than that used in the pathogenicity to ensure lower mortality, determined according to LD50 performed on a pre-test. The bacterial concentration was adjusted using the growth curve (bacterial concentration x absorbance) previously performed, according to Silva et al. (2012). Subsequently, the animals were returned to the original experimental units. Mucus of the skin between the eyes was scraped and a scale of the dorsal region was removed, using a scalpel blade before immersion. Negative control was composed, in triplicate, by animals immersed in PBS solution and treated similarly (adapted de Iregui et al., 2015).

Fish were monitored for 14 days after the experimental challenge and the dead animals were removed from the experimental units every 8 h, where samples from the kidney, spleen and liver were collected for reisolated strain and confirmation of infection. Throughout this period, fish were fed with their respective experimental diet to apparent satiation twice a day. At the end of the challenge trial, the mean cumulative mortality of each treatment was determined.

Statistical analyses

The data were submitted to the Levene test to verify Homoscedasticity, followed by the Shapiro-Wilks test, to verify the normality of the data. With heterogeneous variances, the data were transformed into Log10. When the above premises were not reached, the nonparametric Kruskal-Wallis test was performed. For the *in vitro* analysis of MIC, a factorial variance analysis (3 x 2) was used, while for the other data, a one-way analysis of variance was performed. When significant differences were found, the Tukey test was used to separate the means. All tests were performed at a significance level of 5%.

Results

Identification of bacteria and phenotypic characterization

The four strains analyzed (FF1, FR1, FR2 e FB4) were identified as *Aeromonas hydrophila*, and all of them with ID scores superior than 2.000. All strains were identified phenotypically as *Aeromonas hydrophila* with more than 99% confidence, through the fermentation of different sugars characteristic of this species (Table 2).

Table 2: Phenotypic characterization of strains isolated from mortality outbreaks of Nile tilapia in Joinville, Brazil.*

	Cepa	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	ESC	GLUg	Identification (%)
FF1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>A. hydrophila</i> (99.7)
FR1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>A. hydrophila</i> (99.7)
FR2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>A. hydrophila</i> (99.7)
FB4	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>A. hydrophila</i> (99.7)

* ONPG: test for β -galactosidase enzyme by hydrolysis of the substrate o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside; ADH: decarboxylation of the amino acid arginine; LDC: decarboxylations of the amino acid lysine; ODC: decarboxylations of the amino acid ornithine; CIT: utilization of citrate as only carbon source; H₂S: production of hydrogen sulfide; URE: test for the enzyme urease; TDA: detection of the enzyme tryptophan deaminase; IND: indole Test-production of indole from tryptophan; VP: the Voges-Proskauer test for the detection of acetoin; GEL: test for the production of the enzyme gelatinase; GLU: fermentation of glucose; MAN: fermentation of mannose; INO: fermentation of inositol; SOR: fermentation of sorbitol; RHA: fermentation of rhamnose; SAC: fermentation of sucrose; MEL: fermentation of melibiose; AMY: fermentation of amygdalin; ARA: fermentation of arabinose. OX: cytochrome oxidase; ESC: aesculin hydrolysis; GLUg: gas production.

Pathogenic assay

The strain *Aeromonas hydrophila* (FF1) presented greater pathogenicity in the *in vivo* test, since it culminated in the total mortality of the animals in 48 h (Figure 1). Thus, it was the strain selected for the experimental challenge.

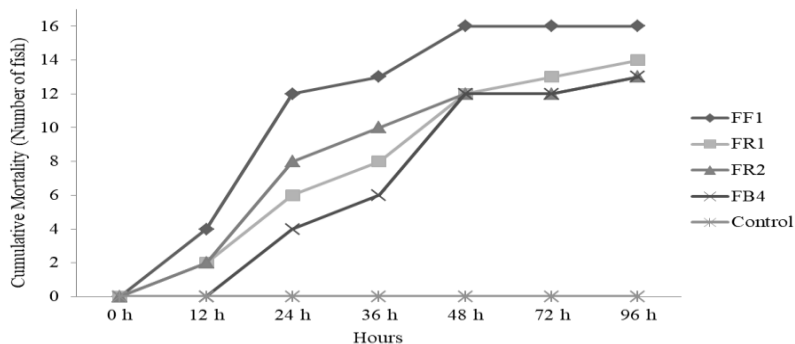


Figure 1: Total mortality (number of fish) over time of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* challenged at the pathogenicity assay with different bacteria for 96 h.

Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

It was verified that the pH factor influences the effectiveness of Na-butyrate against the microorganisms tested, since there was no difference in the minimum inhibitory concentration of butyrate in relation to the tested bacteria (Figure 2). MIC analysis indicated that the efficiency of sodium butyrate is better at pH 6 than at higher pHs, since that at pH 6 the minimum inhibitory concentration was $0.33 \pm 0.14\%$ for *A. hydrophila* and $0.66 \pm 0.28\%$ for *S. agalactiae*, and at pH 6.6, an increase in MIC was observed, where for *A. hydrophila* the concentration increased to $0.66 \pm 0.28\%$ and that of *S. agalactiae* to $0.83 \pm 0.28\%$. And at pH 7.0 the lowest efficiency in the inhibition of pathogens was observed in relation to the other pHs.

Based on these MIC results the inclusion concentrations of the active principle of sodium butyrate in the reference diets of 0.25 and 0.5% were defined. The pH values of the diets and intestines were respectively 6.1 ± 0.13 and 6.6 ± 0.15 . Thus, according to the MIC, at these pHs, sodium butyrate shows greater effectiveness in inhibiting pathogens. The concentration of 0.25%, in addition of being a close

concentration to that indicated in the MIC of 0.33%, was also included in the diet aiming a greater economic viability for the industry.

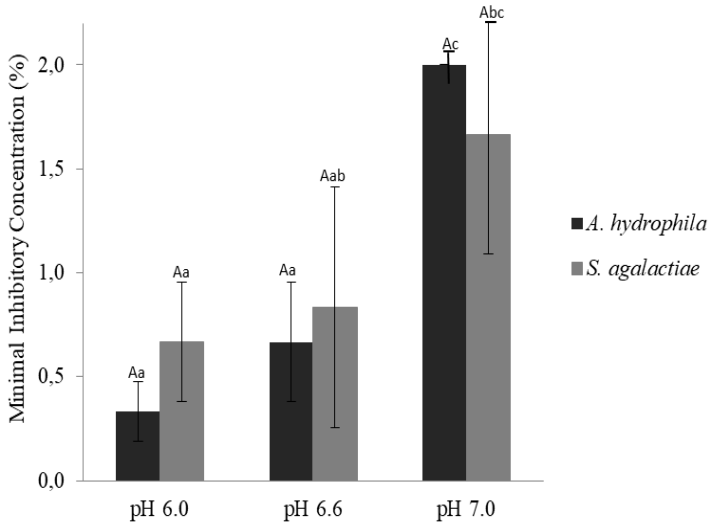


Figure 2: Minimum inhibitory concentration of sodium butyrate at different pHs against pathogens of *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae*. * *Different lowercase letters indicate significant difference among the pH (pH 6.0, pH 6.6 and pH 7.0) and uppercase letters indicate difference between the bacteria (*A. hydrophila* and *S. agalactiae*) ($p < 0.05$).

Sexual reversion

No females were found in the analyzes of sexual reversion. The inclusion of 60 mg kg⁻¹ of methyl-testosterone was efficient and the addition of Na-butyrate at different concentrations and forms did not influence the sexual reversal process of tilapia.

Zotechnical parameters

At the end of the feeding trial, both the treatment Buffer 0.5% and Oil 0.5% fish had an increase in final biomass and yield compared to the control treatment. In addition, Oil 0.5% also showed the best feed conversion and protein efficiency ratio in relation to the control treatment (Table 3). There were no significant differences in weight gain and final survival.

Table 3: Zootechnical parameters (mean \pm standard deviation) of fingerlings of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed seven different diets for 28 days.*

	Control	Pure 0.25%	Pure 0.5%	Oil 0.25%	Oil 0.5%	Buffer 0.25%	Buffer 0.5%	<i>p-value</i>
Biomass gain (g)	93.57 \pm 1.99 ^b	95.69 \pm 1.74 ^{ab}	96.34 \pm 0.89 ^{ab}	98.73 \pm 2.74 ^{ab}	100.26 \pm 3.68 ^a	96.93 \pm 1.73 ^{ab}	100.06 \pm 2.57 ^a	0.0097
Weight gain (g)	0.69 \pm 0.03	0.72 \pm 0.03	0.72 \pm 0.03	0.73 \pm 0.03	0.76 \pm 0.05	0.69 \pm 0.02	0.72 \pm 0.03	0.1960
Survival (%)	89.83 \pm 6.28	88.66 \pm 5.63	89.00 \pm 5.63	90.67 \pm 5.03	87.56 \pm 4.28	93.78 \pm 5.04	92.44 \pm 2.34	0.6649
Feed conversion	0.85 \pm 0.01 ^a	0.84 \pm 0.02 ^{ab}	0.85 \pm 0.02 ^{ab}	0.82 \pm 0.02 ^{ab}	0.79 \pm 0.03 ^b	0.83 \pm 0.01 ^{ab}	0.80 \pm 0.01 ^{ab}	0.0229
Yield (kg m⁻³)	1.17 \pm 0.02 ^b	1.2 \pm 0.02 ^{ab}	1.20 \pm 0.02 ^{ab}	1.23 \pm 0.04 ^{ab}	1.25 \pm 0.04 ^a	1.21 \pm 0.02 ^{ab}	1.25 \pm 0.03 ^a	0.0097
PER	2.94 \pm 0.06 ^b	2.98 \pm 0.08 ^{ab}	2.98 \pm 0.03 ^{ab}	3.04 \pm 0.07 ^{ab}	3.15 \pm 0.15 ^a	2.99 \pm 0.04 ^{ab}	3.11 \pm 0.06 ^{ab}	0.0213

*Different letters within a line indicate significant difference by Tukey test ($p < 0.05$). PER = Protein efficiency ratio.

Hematological parameters

Fish fed with supplemented diets with Buffer 0.5% and Oil 0.25% for 28 days showed an increase in the RBC count when compared with the control group and at circulating monocytes when compared with Pure 0.25% and Oil 0.5% (Table 4).

Table 4: Hematological parameters (mean + standard deviation) of fingerlings of Nile tilapia fed with 7 different diets for 28 days.*

	Control	Pure 0.25%	Pure 0.5%	Oil 0.25%	Oil 0.5%	Buffer 0.25%	Buffer 0.5%	p-value
RBC (x 10⁶ µL⁻¹)	1.12±2.9 ^b	1.01±0.5 ^b	1.16±2.8 ^b	1.70±0.4 ^a	1.11±0.9 ^b	1.39±1.6 ^{ab}	1.73±1.1 ^a	0.0010
Thrombocytes (x 10³ µL⁻¹)	4.7±1.7	6.7±1.9	5.5±0.8	8.2±2.3	5.4±2.2	6.1±2.8	8.7±1.9	0.1914
WBC (x 10³ µL⁻¹)	43.9±1.1	47.3±3.7	55.6±12.5	59.5±8.3	45.2±7.9	66.5±3.7	57.2±32.5	0.4303
Lymphocytes (x 10³ µL⁻¹)	24.7±9.6	23.0±2.7	31.6±8.7	40.8±0.7	34.5±5.6	23.0±8.3	31.6±7.2	0.2680
Monocytes (x 10³ µL⁻¹)	22.9±4.7 ^{ab}	17.1±1.1 ^b	24.9±7.9 ^{ab}	34.5±5.6 ^a	17.6±2.8 ^b	26.7±1.6 ^{ab}	32.9±3.7 ^a	0.0006
Neutrophils (x 10³ µL⁻¹)	6.02±6.0	7.7±3.4	3.2±0.81	6.0±1.5	4.3±0.04	7.8±1.8	5.1±2.7	0.0503

*Different superscript letters within a line denote significant differences (P <0.05). RBC: red blood cells; WBC: white blood cells

Experimental Challenge

Cumulative mortality of Nile tilapia was monitored for 14 days after experimental infection with *A. hydrophila* via immersion (Figure 3). The first mortalities were verified 24 h after the challenge. After the sixth day (144 h) the stabilization of the mortality curve was verified. The diseased animals showed clinical signs such as ulcers in the dermis, erosion of the fins, erratic swimming, lethargy and loss of appetite. There was no significant difference between the treatments during the experimental challenge, except for the negative control, which did not present any mortality during this period, being statistically different from the other groups.

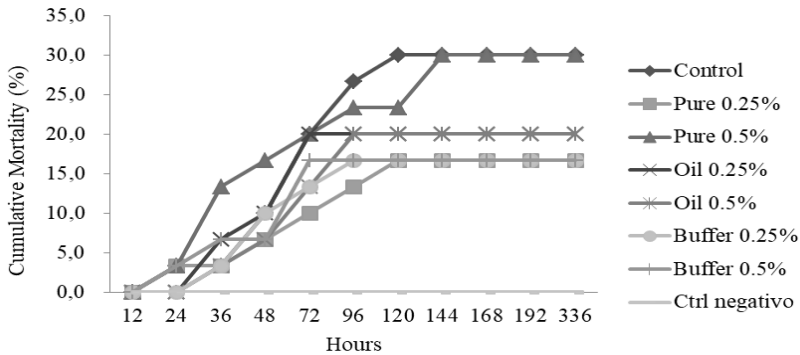


Figure 3: Effects on cumulative mortality of juvenile tilapia, fed with different diets for 28 days, challenged by immersion in an *Aeromonas hydrophila* solution.

Discussion

Currently there is a great commercial interest in the use of organic acids and salts in aquaculture, mainly aiming improvements in growth and resistance to diseases. The ability of sodium butyrate to inhibit pathogens has already been verified in previous studies, where Silva et al. (2013) through the MIC test, observed antimicrobial activity of Na-butyrate (pKa value of butyric acid=4.82) against three species of *Vibrio* (*V. anguillarum*, *V. alginolyticus* and *V. harveyi*) at different pHs (6.2 and 7.1) obtaining in the lower pH the greater activity of inhibition. This result corroborates the present work and can be explained by the fact that when the acid is in the undissociated form, it can diffuse freely through the microorganisms membrane into the cytoplasm of the cell.

Once inside the bacterial cell, which has a pH close to seven, the acid will dissociate and acidify the cytoplasm, suppressing enzymatic reactions and nutrient transport systems. In addition, the process of transporting the free proton from the cell requires energy, which will contribute to reduce the availability of energy for proliferation, resulting in bacteriostasis (Dibner and Buttin, 2002).

The antimicrobial activity of butyric acid has already been proven by Nuez-Ortin (2012) where it was evaluated the bactericidal properties of butyric, propionic and valerianic acids against some of the main pathogenic strains for fish and shrimps. The authors observed that butyric acid presented higher inhibitory power, requiring a lower concentration in relation to the other tested acids.

There is a lack of information on the efficiency of the use of organic salts in protected or unprotected form, as well as the ideal concentrations of inclusion in the diets of most type of fish species, with extremely different physiological and anatomical aspects. However, it is known that Na-butyrate could be readily absorbed and utilized as an energy source by the enteric epithelial cells in the first portions of the intestine (Roediger, 1980). Thus, there are restrictions on the use and expected effect of organic salt on fish, mainly omnivores and herbivores due to their long intestinal tract when compared to carnivores. The unprotected forms of sodium butyrate can be rapidly absorbed initially in the stomach and terminated in the first portions of the intestinal tract, so there is no control for the gradual release of this salt and consequently not reaching the necessary antimicrobial concentrations in the distal parts of the intestine (Yousaf et al., 2017). In the present work, the fact that the fish fed Buffer 0.5% and Oil 0.5% presented a higher final biomass and yield could be related to the previously explained fact, where higher concentrations of inclusion of Na-butyrate in the different protected forms guaranteed a gradual release of sodium butyrate throughout the intestine, possibly providing antimicrobial effect, increased energy for the intestinal epithelium and improvement the intestinal absorption surface. The fact that the Oil 0.5% supplemented fish presented the best feed conversion and protein efficiency ratio may be associated with the indices of weight gain and survival, although they were subtly superior and did not present a significant difference, they contributed to the reduction of feed conversion, increase in the biomass and yield when compared to other treatments, mainly to the treatment Buffer 0.5%.

Corroborating the present study, Robles et al. (2013) supplemented gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) with 0.21% sodium

butyrate that was protected with palm oil in the diet for 8 weeks, and verified an improvement in feed conversion. In addition, contrary to the results found in the present study, they verified a statistically significant increase in weight gain and in the specific growth index. Moreover, the authors verified that butyrate was a preferential energy substrate over glucose. Furthermore, dietary butyrate was shown to spare the oxidation of some amino acids and increased their bioavailability into arterial circulation, resulting in enhanced absorption of certain essential amino acids in the fish gut. Similarly, butyrate increased the concentration of some nucleotides in the gut of fish suggested that butyrate may have a potent effect on the nucleotides uptake. Such effects may also be related to the increase of zootechnical parameters related to the action of sodium butyrate. (Ng and Koh, 2017)

Furthermore, it is known that supplementation of Na-butyrate on its polymer form may also promote gradual absorption along the intestinal tract. Situmorang et al. (2016) observed that feeding *O. niloticus* larvae for 28 days with Polihydroxybutyrate (PHB) polymer at different concentrations of 0.5, 2.5 and 5% presented that the best specific growth rate was in the group supplemented with the lowest PHB concentration at 0.5%.

Short-chain fatty acids may also promote better absorption of minerals (calcium, magnesium and iron), which is very relevant for the treatment and prevention of certain diseases such as anemia and human osteoporosis (Teitelbaum e Walker, 2002; C. Lückstädt (2007)). In the present study, the increase in the total number of erythrocytes from the groups Buffer 0.5% and Oil 0.25% could be related to the stimulation in the production of hemoglobin and/or erythrocytes through the benefits of iron metabolism and mineral absorption. Since, Silva et al. (2008) pointed out that the increase in the RBC number is associated with an increase in iron absorption as consequence of probiotic supplementation or indirect effects of Na-butyrate.

Dietary supplementation of acids or salts of organic acids may contribute to the innate or nonspecific immune response since they are capable of altering the beneficial endogenous microbiota. As for example, increasing the amount of beneficial bacteria, which are capable of altering humoral responses and non-specific cellular immunity. Thus, the increase in the monocytes count herein observed in fish fed Buffer 0.5% and Oil 0.25% could be associated to possible alterations in the autochthonous microbiota such as the increase in the number of probiotic bacteria or in the balance between beneficial and pathogenic bacteria. Corroborating the raised assumptions, Elala and Ragaa (2015)

argued that increased concentration of lactic acid bacteria is capable of enhancing humoral responses and non-specific cellular immunity.

Apart from being an energy source for enterocytes, butyrate also influences a variety of cellular functions associated with intestinal health such as mitigating mucosal inflammation and oxidative stress and improving the intestinal epithelial barrier function (Hamer et al. 2008). The cells responsible for the inflammatory process can produce large amounts of reactive oxygen species in the intestinal tract, causing a number of intestinal cell damage. Leukocytes, especially neutrophils, migrate to the inflammatory site and, upon arriving, release molecules such as cytokines and reactive oxygen and nitrogen species (inflammatory mediators). These, in turn, signal the migration of other blood cells to the site of infection and, thereby, increase inflammation. Guilloteau et. al. (2010) found that butyrate can modulate the inflammatory response, inhibiting the release of some of these molecules and reducing the production of the inflammatory mediators, thus acting to reduce inflammation and modulate oxidative stress. The authors concluded that changes could reduce oxidant-damaging effects and protect cells from cancerogenesis.

Monocytes are important immunological cells in innate defense, as they promote nonspecific cytotoxic activities, phagocytosis and are considered transient cells in the blood because during the inflammatory process they migrate through connective tissue and become macrophages (Biller-Takahashi and Urbinatti, 2014). The reduction in the count of circulating monocytes in the group Oil_{0.5%} may be related to the overstimulation of the intestinal epithelium thus promoting the migration of these cells to this site, since the lower concentration of this compound did not promote this decrease. Perhaps the concentration of Oil_{0.5%} was unnecessary for the immune system, but not for the zootechnical parameters. The reduction in the monocyte count of the group Pure_{0.25%} may be related to the presence of some challenge that provided the migration of monocytes from the circulation. This challenge may also be related to the fact that fish fed Pure_{0.25%} had higher neutrophil count, although not statistically significant ($p=0.0503$). Ali et al. (2017) also observed decreased total number of circulating monocytes in fish fed 1% Na-butyrate compared to the lowest concentrations 0 and 0.5% for *O. niloticus*, where the unsupplemented fish exhibited increase of these cells.

The strategy of experimental infection that most resembles the natural pathway is immersion, since the bacterium will come into direct contact with the innate immune system existing in the skin, gills and

gastrointestinal mucosa (Soto et al., 2016). For this reason, it was the chosen route of infection for the present study, and as expected, some mortalities were detected in challenged fish, but the diseased tilapia showed dermal ulcers and fin erosion, in addition to erratic swimming and loss of appetite. Low mortalities in an experimental challenge through oral routes and immersion with the bacteria *S. agalactiae* for Nile tilapia was reported by Soto et al. (2016), corroborating the present study where the mortalities did not present values higher than 30%.

In the present study, the highest values of mortalities were found in fish of control group and Pure 0.5%, both of them with 30%, but did not presented a significant difference. The negative control group did not present mortalities, differing statistically from the other groups, therefore proving that the immersion method was not responsible for the mortality of the animals.

The increment in mortality in fish fed with Pure 0.5% and unsupplemented fish could possibly be better understood when hematological parameters were observed, where the treatment Pure 0.5% presented the lowest values in the total count of neutrophils ($3.29 \pm 0.81 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$) and a low ratio when compared to the total count of leukocytes, about 6% of neutrophils even though there was no statistically significant difference ($p=0.0503$), indicating a possible immunodepression. On the other hand, unsupplemented fish showed the lowest count of thrombocytes ($4.76 \pm 1.76 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$), even though there was no statistically significant difference, which may be related to a lower blood coagulation efficiency after the removal of the scale and providing a longer time of contact with the bacteria and the contamination by a greater amount of microorganisms. The greater resistance of fish fed Pure 0.25%, Buffer 0.25% and Buffer 0.5% may be explained with the higher concentrations of neutrophils, although not statistically significant, and to an increase in the monocyte number and erythrocytes by the latter group (Magnadottir, 2010; Uribe et al., 2011).

Suguna et al. (2013) tested the immunostimulatory effect of the supplementation of different concentrations (0%, 1%, 3% and 5%) of poly-b hydroxybutyrate and hydroxyvalerate (PHBeHV) on the immune system of *Oreochromis mossambicus*. After 28 days of feeding, an experimental challenge was performed with *A. hydrophila* via intraperitoneal injection, where they verified that the dose of 5% of PHBeHV was more efficient than the lower doses of 1% and 3%. Even though it was a different compound than sodium butyrate, the doses required to perform a satisfactory immunostimulatory action were much higher than those at the present study.

Conclusion

The present study compared for the first time the use of unprotected Na-butyrate with two forms of protection (Oil and Buffer) in two different concentrations in the sexual reversion phase. Na-butyrate presented an antimicrobial effect against two pathogenic bacteria of great importance for fish farming, *A. hydrophila* and *S. agalactiae*. No statistical difference on the survival in challenge trial was observed. The use of coated forms (Buffer_{0.5%} and Oil_{0.5%}) of Na-butyrate at the concentration of 0.5% showed increased zootechnical parameters of the animals, not influencing the efficiency of the sexual reversion presenting itself as a viable alternative to be commercially applied.

Acknowledgements

The authors thank National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) for financial support and research grant to M.L. Martins (CNPq 305869/2014-0) and J.L.P. (CNPq 308292/2014-6), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for PhD scholarship to G.F.A. Jesus, Novation Company for Butyrex donation and Vetanco Company for CM3000 donation, to Mr. Sergio Pitz for the donation of the hormone, to Professor F.N. Vieira and Phd. N.C. Bolívar for reviewing the article. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

References

- Ali, T.E.S., El-Sayed, A.M., Eissa, M.A.R., Hanafi, H.M., 2017. Effects of dietary Biogen and sodium butyrate on hematological parameters, immune response, and histological characteristics of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquac Int.* 26, 139-150.
- ANVISA, 2003. POPFQ–UNI031, RDC n° 360. Aoyama H., Silva T.M.A., Miranda M.A. & Ferreira C.V., (2003) Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Química Nova*, 26, 896-900.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1999. Official Methods of Analysis, 17th edn. AOAC, Gaithersburg, MD.
- Baruah, K., Pal, A.K., Sahu, N.P., Jain, K.K., Mukherjee, S.C., Debnath, D., 2005. Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. *Aquac. Res.* 36(8), 803-812.

- Biller-Takahashi, J.D., Urbinati, E.C., 2014. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *Ann. Acad. Bras. Cienc.* 86(3), 1484-1506.
- Bjerkeng, B., Storebakken, T., Wathne, E., 1999. Cholesterol and short-chain fatty acids in diets for Atlantic salmon *Salmo salar* (L.): effects on growth, organ indices, macronutrient digestibility, and fatty acid composition. *Aquac. Nutr.* 5(3), 181-192.
- Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *J Fish Biol.* 5(6), 771-781.
- Booth, I. R., Stratford, M., 2003. Acidulants and low pH. Food preservatives. Springer US, 25-47.
- Carnahan, A.M., Behram, S., Joseph, S.W., 1991. Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.* 29(12), 2843-2849.
- Chiquieri, J., Soares, R.T.R.N., Lyra, M.S., Hurtado-Nery, V.L., Fonseca, J.B., 2009. Ácidos orgânicos na alimentação de leitões desmamados. *Arch Zootec.* 58(1).
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., 2009. Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotechnol Adv.* 27(6), 680-685.
- Dibner, J.J., Buttin, P., 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *J Appl Poultry Res.* 11(4), 453-463.
- Elala, N.M.A., Ragaa, N.M., 2015. Eubiotic effect of a dietary acidifier (potassium diformate) on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *J Adv Res.* 6(4), 621-629.
- Furuya, W.M.F., 2010. *Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias*. GFM.
- Gislason, G., Olsen, R.E., Hinge, E. 1996. Comparative effects of dietary Na-lactate on Arctic char, *Salvelinus alpinus* L., and Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquac Res.* 27(6), 429-435.
- Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R., Van Immerseel, F., 2010. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev.* 23(2), 366-384.
- Hossain, M.A., Pandey, A., Satoh, S., 2007. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. *Fish Sci.* 73(6), 1309-1317.
- Iregui, C.A., Comas, J., Vasquez, G.M., Verjan, N., 2015. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis* spp. *J Fish Dis.* 39(2), 205-215.

- Ishikawa, A.N.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Lombardi, J.V., 2008. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. *Arc Vet Sci.* 13(1).
- Kihara, M., Sakata, T., 1997. Fermentation of dietary carbohydrates to short-chain fatty acids by gut microbes and its influence on intestinal morphology of a detritivorous teleost tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comp. Biochem. Physiol A.* 118(4), 1201-1207.
- Kihara, M., Sakata, T., 2001. Influences of incubation temperature and various saccharides on the production of organic acids and gases by gut microbes of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in a micro-scale batch culture. *Comp. Biochem. Physiol B.* 171(6), 441-447.
- Kling, D.E., Cavicchio, A.J., Sollinger, C.A., Madoff, L.C., Schnitzer, J.J., Kinane, T.B., 2009. Lactic acid is a potential virulence factor for group B Streptococcus. *Microb. pathogenesis*, 46(1), 43-52.
- Lim, C., Lückstädt, C., Webster, C.D., Kesius, P., 2015. Organic acids and their salts (chapter 15). Lee, C.S., Lim, C., Gatlin, D.M., Webster, C.D. (Eds.), *Dietary Nutrients, Additives and Fish Health*, Wiley-Blackwell (2015), pp. 305-315.
- Liu, W., Yang, Y., Zhang, J., Gatlin, D.M., Ringø, E., Zhou, Z., 2014. Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil. *British J Nutr.* 112(1), 15-29.
- Lückstädt, C., 2007. Acidifiers in animal nutrition -- a guide for feed preservation and acidification to promote animal performance. Nottingham University Press, 71-79.
- Magnadottir, B., 2010. Immunological control of fish diseases. *Mar Biotechnol.* 12(4), 361-379.
- MAPA, 1991. Produtos ou subprodutos de origem vegetal, rações e concentrados: POPFQ-UNI031, Portaria nº 108.
- Ng, W.K., Koh, C.B., Sudesh, K., Siti-Zahrah, A., 2009. Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. *Aquac Res.* 40(13), 1490-1500.
- Ng, W.K., Koh, C.B., 2011. Application of organic acids in aquafeeds: impacts on fish growth, nutrient utilisation and disease resistance. Standards for acidifiers, principles for the Use of organic acids in animal nutrition. Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom, 49-58.

- Ng, W.K., Romano, N., 2013. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Rev Aquac.* 5(4), 220-254.
- Ng, W.K., Koh, C.B. (2017). The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Rev. Aquac.* 9(4), 342-368.
- Nuez-Ortin, W.G., Prado, S., Toranzo, A.E., 2012. Antimicrobial properties of butyric acid and other organic acids against pathogenic bacteria affecting the main aquatic species. In: Conference proceedings aqua conference.
- Piva, A., Anfossi, P., Meola, E., Pietri, A., Panciroli, A., Bertuzzi, T., Formigoni, A., 1997. Effect of microcapsulation on absorption processes in the pig. *Livestock Prod Sci.* 51(1), 53-61.
- Piva, A., Grilli, E., Fabbri, L., Pizzamiglio, V., Campani, I., 2007. Free versus microencapsulated organic acids in medicated or not medicated diet for piglets. *Livestock Sci.* 108(1), 214-217.
- Rani, A., Macintosh, D.J., 1997. An evaluation of the effects of hormone concentration, treatment period, feeding regime, and rearing salinity on production of all-male Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry using 17 α -methyltestosterone. In Tilapia aquaculture: Proceedings from the fourth international symposium on tilapia in aquaculture. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Cooperative Extension Service. Ithaca, New York, USA (pp. 791-804).
- Ranzani-Paiva, M.J.T.R., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM.
- Reda, R.M., Mahmoud, R., Selim, K.M., El-Araby, I.E., 2016. Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 50, 255-262
- Robles, R., Lozano, A.B., Sevilla, A., Márquez, L., Nuez-Ortin, W., Moyano, F.J., 2013. Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem.* 39(6), 1567-1580.
- Roediger, W.E.W., 1980. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet* 316(8197), 712-715.
- Sherif, A.H., Doaa, M.G., 2013. Studies on the effect of acidifier on cultured *Oreochromis niloticus* fish. *J Arabian Aquac Soc.* 8, 229-236.

- Silva, B.C., Mouriño, J.L.P., Vieira, F.N., Jatobá, A., Seiffert, W.Q., Martins, M.L., 2012. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* × *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquac Res.* 43(6), 908-916.
- Silva, B.C., Nolasco Soria, H., Magallón Barajas, F., Civera Cerecedo, R., Casillas Hernández, R., Seiffert, W., 2016. Improved digestion and initial performance of whiteleg shrimp using organic salt supplements. *Aquac Nutr.* 22(5), 997-1005.
- Silva, B.C., Vieira, F.N., Mouriño, J.L.P., Ferreira, G.S., Seiffert, W.Q., 2013. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. *Aquaculture* 384, 104-110.
- Silva, M.R., Dias, G., Ferreira, C.L., Franceschini, S.C., Costa, N.M., 2008. Growth of preschool children was improved when fed an iron-fortified fermented milk beverage supplemented with *Lactobacillus acidophilus*. *Nutr Res.* 28(4), 226-232.
- Situmorang, M.L., De Schryver, P., Dierckens, K., Bossier, P., 2016. Effect of poly-β-hydroxybutyrate on growth and disease resistance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles. *Vet Microbiol.* 182, 44-49.
- Soto, E., Zayas, M., Tobar, J., Illanes, O., Yount, S., Francis, S., Dennis, M.M., 2016. Laboratory-controlled Challenges of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) with *Streptococcus agalactiae*: Comparisons between Immersion, Oral, Intracoelomic and Intramuscular Routes of Infection. *J Comp Pathol.* 155(4), 339-345.
- Suguna, P., Binuramesh, C., Abirami, P., Saranya, V., Poornima, K., Rajeswari, V., Shenbagarathai, R., 2014. Immunostimulation by poly-β hydroxybutyrate-hydroxyvalerate (PHB-HV) from *Bacillus thuringiensis* in *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 36(1), 90-97.
- Teitelbaum, J.E., Walker, W.A., 2002. Nutritional impact of pre-and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr.* 22(1), 107-138.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet Med.* 56(10), 486-503.
- Yousaf, M.S., Goodarzi Boroojeni, F., Vahjen, W., Männer, K., Hafeez, A., Ur-Rehman, H., Zentek, J., 2017. Encapsulated benzoic acid supplementation in broiler diets influences gut bacterial composition and activity. *British Poultry Sci.* 58(2), 122-131

CAPÍTULO II

Use of protected forms of sodium butyrate benefit the development and intestinal health of Nile tilapia during the sexual reversion period

DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.02.018

Gabriel F.A. Jesus^{a*}, Scheila A. Pereira^a, Marco S. Owatari^a, Kenya Addam^a, Bruno C. Silva^b, Fabio C. Sterzelecki^c, Juliet K. Sugai^d, Lucas Cardoso^a, Adolfo Jatobá^e, José L.P. Mouriño^a, Mauricio L. Martins^a.

^aAQUOS - Aquatic Organisms Health Laboratory, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346. CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

^bEPAGRI - Company of Agricultural Research and Rural Extension of Santa Catarina, Rod. Antônio Heil, 6800. CEP 88318-112, Itajaí, SC, Brazil.

^cLAPMAR - Marine Fisheries Laboratory, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Servidão Beco dos Coroas, 503. CEP 88061-600, Florianópolis, SC, Brazil.

^dApplied Enzymology Laboratory - Department of Biochemistry, Center for Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário Prof. Dr. João David Ferreira Lima - Trindade. CEP 88 010-970, Florianópolis, SC, Brazil.

^eAquaculture Laboratory, Federal Institute Catarinense – Campus Araquari, BR 280 – km 27. CEP 89245-000, Araquari, SC, Brazil.

*Corresponding author: Gabriel F. A. Jesus – gabriel_faj@hotmail.com

Running title: Sodium butyrate improves the performance and intestinal health of Nile tilapia

Abstract

The aim of the present study was to verify the effect of sodium butyrate in protected and unprotected forms at two different concentrations of diet inclusion (0.25% or 0.5%) on the digestive enzyme's activity, integrity and structure of the intestinal tract and liver, in juveniles of *Oreochromis niloticus*, during the period of sexual reversion. In the experimental period, 3150 newly hatched post-larvae were randomly distributed in 21 experimental units of 100 L, divided into six treatments and one control, with three replicates each. The treatments were: fish fed with feed without supplementation (Control); fed with pure Na-butyrate (Pure_{0.25%} and Pure_{0.5%}), fed with palm oil-protected Na-butyrate (Oil_{0.25%} and Oil_{0.5%}) and fed with protected Na-butyrate with buffer solution (Buffer_{0.25%} and Buffer_{0.5%}). At the end of the experimental period, a decrease in alkaline protease activity was observed in the Oil_{0.25%}, Oil_{0.5%} and Buffer_{0.5%} groups when compared to the control group. Fish fed Buffer_{0.5%} supplemented diet for 28 days had a longer length, perimeter and villus area of the anterior region of the intestinal tract when compared to Pure_{0.25%}. The Control, Pure_{0.25%} and Oil_{0.5%} groups had a reduction in villus width when compared to the other groups. In the posterior region, the group Oil_{0.25%} had a longer villus length when compared to the Pure_{0.25%} and Control, in addition to a greater area of villi when compared to the same groups and also to the Oil_{0.5%}. In this same intestinal portion, the Buffer_{0.5%} presented greater perimeter of intestinal villi when compared to the Control and Pure_{0.25%} groups. The Pure_{0.25%} and Buffer_{0.25%} presented higher number of goblet cells per villi when compared to Oil_{0.5%}. The control group and those supplemented with sodium butyrate, in the different concentrations and forms, presented the intact intestine and without the presence of lesions. Regarding the liver, the Pure_{0.5%} group presented the highest macrosteatosis indexes when compared to the Control group, besides a higher necrosis index when compared to the Pure_{0.25%}. Thus, it can be observed that the supplementation of protected forms of sodium butyrate in the diet of juvenile Nile tilapia during the period of sexual reversion was effective in maintaining intestinal health, because Oil_{0.5%} contributed to the intestinal health of the animals, and the Oil_{0.25%}, Buffer_{0.25%} and Buffer_{0.5%}, increased the development of the intestine.

Keywords: Organic salts, intestinal health, digestive enzymes, histology.

Introduction

Analyzing the current scenario of global expansion aquaculture, the use of alternative strategies to reduce the use of antibiotics in animal production has become a reality. Feed additives such as organic acids and their salts are potential substitutes for the use of antibiotics as growth promoters and animal health. Studies report the ability of acids and their organic salts to increase growth parameters, health parameters, disease resistance and feed quality, when used in appropriate concentrations and forms (Ng and Koh, 2017). However, many results are controversial, since a series of factors can influence the results, such as: acid and/or organic salt, source, dose, target species, experimental design, application form (pure or protected; in blend), health and dietary habits of the target animal.

The use of butyric acid or sodium butyrate is well known and studied in terrestrial and human animals, it acts in the improvement of intestinal health, since among many functions can supply energy to the epithelial cells promoting the differentiation, proliferation and consequently increase of the height of intestinal villi (Canani et al., 2011). In aquaculture there are still few studies that demonstrate the real effects of the use of butyrate on animal health, its action along the gastrointestinal tract, as well as on digestive physiology.

Ng and Koh (2017) report the need for studies to better understand the protected forms of organic acids (coated) in relation to unprotected (pure) forms in terms of transport and action of the active principle throughout the intestinal tract of aquatic organisms. The addition of protection to sodium butyrate may directly interfere with the stability of the product, maintenance of the integrity of the active principle and absorption in the intestine. Studies have shown that protection ensures that the active principle is released and absorbed gradually throughout the entire intestinal tract, since the product in its pure form would be absorbed shortly after passage through the stomach (Piva et al., 2007).

In this context, Jesus et al. (2019) evaluated the effects of sodium butyrate in pure form and in protected forms (palm oil and buffer) at concentrations of 0.25% and 0.5% during the period of sexual reversal of Nile tilapia, and verified an increase in the zootechnical parameters of the animals supplemented with of 0.5% of protected sodium butyrate. However, this study evaluated only the zootechnical, hematological and survival parameters against *Aeromonas hydrophila*, not evaluating the effects of butyrate along the intestinal tract, in order to determine its action on different portions of the tract and also possible organ damage.

The objective of this study was to verify the effect of sodium butyrate, in protected and unprotected forms, in two different concentrations of diet inclusion (0.25% or 0.5%) on the activity of digestive enzymes, structure of the intestinal tract and liver, in juveniles of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, during the period of sexual reversion.

Material and methods

The present manuscript continues the study of Jesus et al. (2019), which evaluated the effects of sodium butyrate, in two concentrations of inclusion in the diet and in pure forms, protected with palm oil and protected with buffer solution, on the zootechnical, hematological and disease resistance parameters. It also aimed to elucidate the effects of sodium butyrate supplementation on the different forms and concentrations of inclusion in diets, the activity of digestive enzymes, the structure of two distinct portions of the intestinal tract, as well as the integrity of the intestine and liver of Nile tilapia

Experimental diets

The preparation of the diets and the accomplishment of the proximal analysis were carried out under conditions similar to those described in Jesus et al. (2019). The ingredients and the values of the proximal composition of the diets are shown in Table 1.

Table 1: Ingredients and proximate composition analysis of the experimental diets (%) supplemented or not with sodium butyrate, which were fed to Nile tilapia for 28 days.

¹ Micromineral premix composition: Phosphorus 7,38 g kg⁻¹; Copper

Ingredients (%)	Control	Pure	Pure	Oil	Oil	Buffer	Buffer
		0.25%	0.5%	0.25%	0.5%	0.25%	0.5%
Salmon by-product meal (71% CP)	56.00	56.00	56.00	56.00	56.00	56.00	56.00
Corn	36.00	36.00	36.00	36.00	36.00	36.00	36.00
Soy oil	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Premix microminerals ¹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Premix macrominerals ²	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cellulose	2.00	1.74	1.49	1.16	0.32	1.57	1.14
Sodium butyrate ³	0.00	0.26	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00
CM3000 ^{®4}	0.00	0.00	0.00	0.84	1.68	0.00	0.00
Butirex C4 ^{®5}	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.43	0.86
Energy (cal·kg ⁻¹)	4329	4329	4329	4329	4329	4329	4329
Crude protein	44.93	45.49	44.85	45.00	45.10	45.11	45.27
Ether extract	9.83	9.77	9.33	10.33	10.90	9.34	9.99
N-free extract	24.02	21.49	24.83	22.45	22.03	23.61	24.36
Ashes	11.28	11.10	11.52	11.40	11.38	11.38	12.06
Moisture	9.94	12.15	9.47	10.82	10.59	10.56	8.32

3500 mg kg⁻¹; Iodine 160 mg kg⁻¹; Iron 20000 mg kg⁻¹; Manganese 10000 mg kg⁻¹; Zinc 24000 mg kg⁻¹; Selenium 100 mg kg⁻¹; Vitamin A 2400000 UI kg⁻¹; Vitamin D 600000 UI kg⁻¹; Vitamin E 30000 UI kg⁻¹; Vitamin K 3000 mg kg⁻¹; Riboflavin 4500 mg kg⁻¹; Pantothenic Acid 1000 mg kg⁻¹; Niacin 2000 mg kg⁻¹; Vitamin B12 8000 mg kg⁻¹; Choline 100000 mg kg⁻¹; Folic acid 1200 mg kg⁻¹; Biotin 200 mg kg⁻¹; Thiamine 4000 mg kg⁻¹; Vitamin B6 3500 mg kg⁻¹; Vitamin C 60000 mg kg⁻¹. ² Macromineral premix composition: Cálcium 70 g kg⁻¹; Magnesium 4 g kg⁻¹; Potassium 10,80 g kg⁻¹; Sódium 5,07 g kg⁻¹. ³ Pure sodium butyrate 99% pure. ⁴ CM3000[®] protected with 30% pure vegetable oil. ⁵Butirex C4[®] buffered with 54% purity.

Experimental design

The experiment was carried out at AQUOS-Aquatic Organisms Health Laboratory, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC). The post-larvae of Nile tilapia were obtained from the Agricultural Research and Rural Extension Company of Santa Catarina (Epagri). All animal procedures were approved by the Ethic Committee on Animal Use (CEUA-6827181016).

After transportation, a total of 3,150 post-larvae were randomly distributed into 21 tanks with 80 L, totaling 150 animals per experimental unit. These tanks were equipped with a recirculation aquaculture system composed by a decanter to remove solids, a mechanical filter, aerobic filters and UV filter (Cubos-16 W, São Paulo, Brazil), heater at the central tank (1,000 W), air blower (1/4 HP), capable of maintaining the parameters of water quality in ideal values for the growth of the species. The photoperiod was 12 h.

Fish were acclimatized for two days in the experimental tanks while feeding the control diet. After acclimatization, fish were considered healthy, without deformities or erratic swimming, absent of clinical signs characteristic of bacterial and fungal infections, besides presenting good appetite and good acceptance of the feed.

After this period, the post-larvae of Nile tilapia with approximately 5 days after hatching, with size smaller than 13.0 mm and an approximate mean weight of 0.0183 ± 0.0014 g, were submitted to the different treatments, in addition to the control group, in triplicate, being:

- Unsupplemented (control)
- Supplemented diet with 0.25% sodium butyrate (Pure 0.25%)
- Supplemented diet with 0.5% sodium butyrate (Pure 0.5%)
- Supplemented diet with 0.25% active principal of CM3000® (sodium butyrate protected with palm oil) (Oil 0.25%)
- Supplemented diet with 0.5% active principal of the CM3000® (Oil 0.5%)
- Supplemented diet with 0.25% active principal of Butirex C4 (sodium butyrate with buffer solution) (Buffer 0.25%)
- Supplemented diet with 0.5% active principal of Butirex C4 (Buffer 0.5%)

Fish were fed experimental diets five times a day (8 a.m., 10 a.m., 12 p.m. 2 p.m. and 5 p.m.) for 28 days, at an initial feeding rate of 20%, which was adjusted weekly after performing biometrics (Rani e Macintosh, 1997).

After 28 days of experiment, the animals were fasted for 18 h for subsequent anesthesia in eugenol solution (75 mg L^{-1}), euthanasia by

cerebral commotion and sample collection, in order to evaluate the activity of digestive enzymes, intestinal and liver integrity, histomorphometric parameters of the anterior and posterior region of the intestinal tract.

The water quality parameters were: dissolved oxygen 6.42 ± 0.87 mg L⁻¹ and temperature 28.05 ± 0.82 °C measured with YSI-550A oximeter; total ammonia 0.32 ± 0.11 mg L⁻¹; nitrite 0.15 ± 0.12 mg L⁻¹ and pH 7.41 ± 0.29 , measured with the Labcon Test colorimetric kit.

Digestive enzymes activity

To quantify the activities of the digestive enzymes (amylase, lipase, total alkaline and acid proteases) five fish per tank (in triplicate) were anesthetized and euthanized by anesthetic deepening using Eugenol (75 mg L⁻¹) and stored in liquid nitrogen for further determination.

To obtain enzymatic extracts, each animal was individually dissected for removal of the digestive tract. Subsequently, pools of five whole intestinal tracts removed per experimental unit were performed in order to achieve a sufficient volume of enzyme extract to carry out all the analyzes. Each pool was homogenized in ice-cold distilled water (1: 8 ratio (w: v)) through a tissue-tearor homogenizer for 2.5 min (5 shakes of 30 sec at approximately 5 min intervals for cooling).

Then the homogenized samples were transferred, each to an Eppendorf tube and centrifuged (model 5804R, Eppendorf, Germany) at $27,167 \times g$ for 15 min at 4 °C. The supernatants resulting from the centrifugation were individually transferred to a new Eppendorf tube and were used as an enzymatic extract for the quantification of digestive enzymes activities. Throughout the analysis the enzymatic extracts were kept in an ice bath.

Soluble protein quantification of enzyme extracts was performed by the method Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, United States) as standard.

All enzymatic assays were incubated at 25°C and absorbance was read with a microplate reader (Spectramax, Plus-384, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), by transferring an aliquot of 300 µl of the hydrolysis products to the well, except for the lipase activity, whose reaction was carried out directly in the microplate wells.

Quantification of total alkaline protease activity was performed according to the method described by Garcia-Carreño (1997), through the hydrolysis of azocasein (Sigma, St. Louis, Mo, USA). The specific activity of the alkaline protease was expressed as the difference in

absorbance at 366 nm between the sample and the control $\Delta A_{366\text{nm}} \text{ min}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of protein in the extract (U mg^{-1} of protein).

The activity of the acid protease was determined by hydrolysis of bovine hemoglobin (Sigma, St. Louis, USA) following the methodology recommended by Anson (1938) described by Vega-Orellana (2006). The specific activity (U mg^{-1} protein) of acid protease was expressed as μmol of tyrosine $\text{min}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of protein. The activity of the amylase was determined by the hydrolysis of the starch (E. Merck, Darmstadt, Germany), according to the method based on Rick and Stegbauer (1974) and described by Baloi et al. (2017). The reaction was stopped with dinitrosalicylic acid reagent and the hydrolysis product was quantified by the reducing sugar method of dinitrosalicylic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to Miller (1959), using maltose (E. Merck, Darmstadt, Germany) as a standard and read at 540 nm. The specific activity (U mg^{-1} protein) of amylase was expressed as μmol of maltose $\text{min}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of protein. Lipase activity was determined by the hydrolysis of the synthetic substrate p-nitrophenylmiristate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) according to the methodology described by Sæle (2010), and expressed as specific activity: μmol of p-nitrophenol $\text{min}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of protein (U mg^{-1} protein).

Histological analysis

After 28 days of experiment, five fish from each experimental unit (15 animals per treatment) were anesthetized in Eugenol® solution (75 mg L^{-1}) and euthanized by anesthetic deepening to collect histological samples. Fragments of liver and intestine (anterior and posterior region), collected from similar regions (sites) of all animals in order to standardize the results were fixed in buffered formalin 10%. The organs were dehydrated in increasing series of ethyl alcohol, clarified in xylol and included in paraffin at 60°C . Cuts of $4 \mu\text{m}$ thickness were performed on a microtome, sequenced with Harris hematoxylin and eosin (HHE). Subsequent to staining, the slides were mounted on Entellan® media and analyzed on Axio Imager A.2 phase interference contrast microscope (DIC) (Zeiss, Gottingen, Germany). In relation to intestinal histomorphometry, the total number of villi, length, width, perimeter and villi area, as well as the number of goblet cells per villi, were measured using Zen Pro software. For the analysis of liver and intestinal integrity, values (score) were attributed to histological changes, according to the degree of intensity: 0 (absence of change), 1

(mild change, corresponding to less than 25% of the organ area) , 2 (moderate change, 25% to 50% of the organ area) and 3 (severe alteration, more than 50% of the organ area), according to the method described by Schwaiger et al. (1997) modified by Brum et al. 2018. The following hepatic changes were evaluated: congestion of large vessels, congestion of the pancreas, sinusoid congestion, hepatocyte nucleus displacement, sinusoidal dilation, hepatocyte nucleus hypertrophy, hepatocyte hypertrophy, eosinophilic infiltrate, lymphocytic infiltrate, macrosteatosis, microsteatosis, necrosis, nuclei with karyolysis, nucleus with karyorrhexis, nucleus with pyknosis. For intestinal integrity, eosinophilic, lymphocytic and necrotic infiltrates were evaluated.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

In order to verify intestinal integrity at the cellular level, samples of the intestinal tract were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution and 2% sucrose, buffered in 0.1 M cacodylate buffer solution (pH 7.2) (Schmidt et al., 2010), post-fixed in osmium tetroxide solution 1% for 4 h, dehydrated in acetone series. The samples were then placed in Spurr resin. The ultra-thin sections were made with ultramicrotomes, contrasting the samples with uranyl acetate and lead citrate. The microphotographs were performed in a transmission electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan, at 80 kV) (Jesus et al., 2017).

Statistical analysis

The data were submitted to the Shapiro-Wilks test to verify the normality of the data, followed by the Levene test for homoscedasticity verification. With heterogeneous variances, villus area data from the posterior region of the intestines were transformed into ln. Subsequently, the data were submitted to a one-way analysis of variance, and when significant differences were found the Tukey test was used to separate the means. For the width data of intestinal villi of the anterior region, the Kruskal-Wallis test was performed, due to the absence of homoscedasticity. All tests were performed at a significance level of 5%.

Results

Digestive enzymes activity

The decrease in alkaline protease activity was verified in the Oil 0.25%, Oil 0.5% and Buffer 0.5%, when compared to the Control group. No statistically significant differences were found in the activities of the other digestive enzymes analyzed (Table 2).

Table 2: Digestive enzymes activity (mean±standard deviation) (U mg⁻¹ protein) of juveniles of Nile tilapia fed seven different diets during 28 days in the period of sexual reversion.*

	Protease Acid	Protease Alkaline	Amylase	Lipase
Control	0.038±0.008	0.17±0.01 ^a	0.70±0.13	12.26±1.61
Pure _{0.25}	0.030±0.004	0.12±0.00 ^{ab}	0.41±0.27	11.5±2.13
Pure _{0.5}	0.043±0.001	0.13±0.00 ^{ab}	0.57±0.12	8.54±0.5
Oil _{0.25}	0.028±0.007	0.10±0.01 ^b	0.46±0.06	10.54±3.09
Oil _{0.5}	0.040±0.013	0.10±0.02 ^b	0.37±0.12	13.01±0.55
Buffer _{0.25}	0.035±0.003	0.11±0.01 ^{ab}	0.43±0.07	11.28±1.87
Buffer _{0.5}	0.036±0.007	0.09±0.05 ^b	0.34±0.13	10.15±1.76
<i>P value</i>	0.2196	0.0177	0.1177	0.1528

*Different letters in the column indicate significant difference (p<0.05).

Histomorphometric parameters

The animals supplemented for 28 days with Buffer_{0.5%} had a longer length, perimeter and villus area of the anterior region of the intestinal tract when compared to Pure_{0.25%}. The protected groups, Oil_{0.25%} and Buffer_{0.25%} showed an increase in the perimeter when compared to the Pure_{0.25%}. The Control, Pure_{0.25%} and Oil_{0.5%} showed a reduction in villus width when compared to the other groups. For the posterior region, the Oil_{0.25%} had a longer villus length when compared to the Pure_{0.25%} and Control, in addition to a larger area of villi when compared to the same groups and also to the Oil_{0.5%}. The Buffer_{0.5%} had a greater perimeter of intestinal villi compared to Control and Pure_{0.25%}. The groups Pure_{0.25%} and Buffer_{0.25%} presented higher number of goblet cells per villi when compared to Oil_{0.5%} (Table 3). The aspect of the anterior and posterior region, as well as the main qualitative alterations of the groups that presented statistical differences are shown in Figure 1.

Table 3: Histomorphometric parameters (mean±standard deviation) of the intestinal tract (anterior and posterior portion) of juveniles of Nile tilapia fed seven different diets during 28 days in the period of sexual reversion.

Intestine Morphometry	Control	Pure _{0.25}	Pure _{0.5}	Oil _{0.25}	Oil _{0.5}	Buffer _{0.25}	Buffer _{0.5}	P value
Number of villi	22.16±4.75	19±3.22	20.18±38.79	21.8±38.79	22±3.84	23.33±5.71	21.9±3.38	0.6042
Length (µm)	118.41±41.66 ^{ab}	89.71±21.08 ^b	152.46±63.43 ^{ab}	164.25±37.39 ^{ab}	148.29±38.59 ^{ab}	171.20±65.96 ^{ab}	177.15±58.41 ^a	0.0357
Width (µm)	58.53±8.45 ^b	40.14±3.64 ^b	71.97±30.90 ^a	73.12±19.55 ^a	55.60±12.39 ^b	74.51±27.35 ^a	85.98±47.75 ^a	0.0296
Perimeter (x10 ³ µm)	6.15±2.03 ^{ab}	4.16±1.58 ^b	6.61±2.41 ^{ab}	8.85±1.69 ^a	7.31±2.87 ^{ab}	8.25±1.45 ^a	9.14±2.08 ^a	0.0004
Area (x10 ³ µm ²)	235.29±88.4 ^{ab}	96.78±50.63 ^b	325.34±193.6 ^{ab}	355.38±144.4 ^{ab}	228.00±98.53 ^{ab}	377.24±203.06 ^{ab}	414.68±279.22 ^a	0.0357
Goblet cells / villus	3.35±1.17	2.82±0.90	2.62±1.34	3.14±0.75	2.46±1.00	3.65±0.73	3.34±0.86	0.2721
Intestine Morphometry	Control	Pure _{0.25}	Pure _{0.5}	Oil _{0.25}	Oil _{0.5}	Buffer _{0.25}	Buffer _{0.5}	P value
Number of villi	17.4±2.42	17.8±2.43	17.5±3.0	18.5±0.8	16.5±1.87	16.5±1.50	18.8±4.25	0.4991
Length (µm)	81.26±16.43 ^b	81.05±28.45 ^b	95.91±23.11 ^{ab}	113.91±18.87 ^a	85.33±18.70 ^{ab}	92.19±9.49 ^{ab}	99.94±21.52 ^{ab}	0.0369
Width (µm)	55.26±6.59	53.63±8.07	50.05±3.63	52.34±4.01	43.42±6.59	57.66±18.17	48.02±13.55	0.1410
Perimeter (x10 ³ µm)	2.94±0.44 ^b	3.19±0.98 ^b	4.18±1.45 ^{ab}	4.90±1.39 ^{ab}	3.45±1.06 ^{ab}	3.84±1.46 ^{ab}	5.02±2.17 ^a	0.0084
Area (x10 ³ µm ²)	92.35±17.14 ^b	96.36±26.00 ^b	114.31±36.49 ^{ab}	220.63±127.91 ^a	76.72±15.80 ^b	152.77±136.96 ^{ab}	128.09±59.13 ^{ab}	0.0294
Goblet cells / villus	8.73±6.09 ^{ab}	10.6±3.71 ^a	4.81±3.61 ^{ab}	5.88±1.01 ^{ab}	1.63±1.14 ^b	10.72±6.47 ^a	7.21±7.12 ^{ab}	0.0106

* Different letters in the line indicate significant difference (p < 0.05).

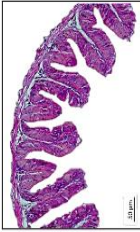
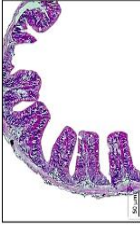






Group	Qualitative evaluation	Anterior	Posterior
Control	It presented inferior development of its villi when compared with the protected groups, for both regions. This fact was significant for the reduction of the perimeter when compared to the group Buffer 0.5%.		
Pure 0.25%	The development of the villi was inferior to the control group, since for the anterior region there was a reduction in the length, perimeter and area, and for the posterior region, reduction in length and perimeter when compared to the group Buffer 0.5%, as well as the increase of goblet cells when compared to the Oil 0.5%.		
Buffer 0.5%	It presented excellent development of the villi in both the anterior and posterior regions, confirming the importance of protection and concentration for complete action in the intestinal tract. This was confirmed by the increase in length, perimeter and area, when compared to the Control group and Pure 0.25%, for the appropriate regions.		
Oil 0.5%	Numerically presented a good development of intestinal villi, but not statistically significant. The highlight of this group is for the increase in the number of goblet cells, being a good indicator of intestinal health.		

Figure 1: Qualitative evaluation of the anterior and posterior region of the intestinal tract of the main groups of Nile tilapia fed during 28 days with different diets containing or not sodium butyrate in different concentrations and forms, during the period of sexual reversion.

Intestinal integrity

With the transmission electron microscopy (TEM) it was possible to verify that the intestinal tract of the animals, supplemented or not with the different forms and concentrations of sodium butyrate, presented the intestine intact and without the presence of lesions. In figure 2, the integrity of the intercellular junctions, the perfect organization of enterocytes and goblet cells, absence of vacuoles, translocations, inflammation and necrosis can be verified. Thus, it is confirmed that supplementation of sodium butyrate at the present concentrations and respective forms did not cause damage to the intestinal tract.

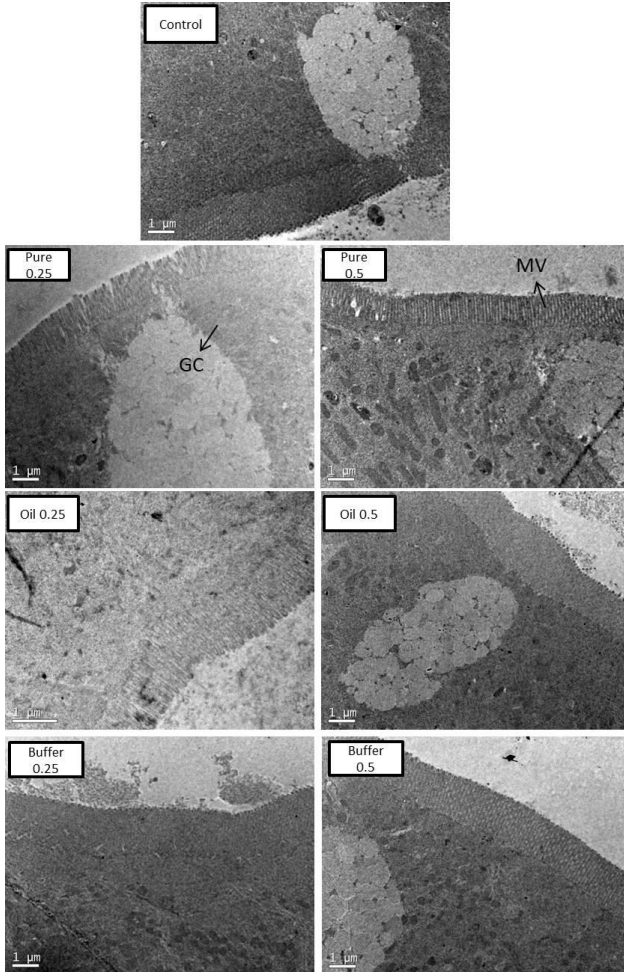


Figure 2: Evaluation of intestinal integrity by transmission electron microscopy (TEM) of Nile tilapia supplemented or not with sodium butyrate in different concentrations and forms during the 28-day period of sexual reversion.

Histological parameters

At the end of the experimental period, the group Pure 0.5% presented the highest indexes for the presence of macrosteatosis when compared to the Control group, in addition to a higher index for necrosis when compared to the Pure 0.25% group. (Table 4).

Table 4: Histological indices (mean \pm standard deviation) of the liver of juveniles of Nile tilapia fed seven different diets during 28 days in the period of sexual reversal.

Liver alterations	Control	Pure_{0.25}	Pure_{0.5}	Oil_{0.25}	Oil_{0.5}	Buffer_{0.25}	Buffer_{0.5}	P value
Congestion in large vessels	1.0 \pm 0.0	1.33 \pm 0.33	0.56 \pm 0.51	1.17 \pm 0.17	1.17 \pm 0.17	1.11 \pm 0.19	1.0 \pm 0.00	0.0571
Sinusoidal congestion	1.39 \pm 0.35	1.89 \pm 1.02	1.44 \pm 0.77	1.17 \pm 0.17	1.0 \pm 1.00	1.56 \pm 0.51	1.17 \pm 0.17	0.7230
Sinusoidal dilatation	0.72 \pm 0.25	1.44 \pm 0.69	1.0 \pm 1.15	0.67 \pm 0.33	0.92 \pm 0.42	1.0 \pm 0.0	0.5 \pm 0.7	0.5229
Nucleus hypertrophy	0	0	0.22 \pm 0.38	0	0	0	0	0.9322
Hepatocytes hipertrophy	2.0 \pm 0.33	2.0 \pm 0.88	1.78 \pm 0.69	2.17 \pm 0.83	1.83 \pm 0.83	2.22 \pm 0.38	2.33 \pm 0.33	0.9322
Eosinophilic infiltrate	0.11 \pm 0.19	0.22 \pm 0.19	0.89 \pm 0.84	0.17 \pm 0.17	0.42 \pm 0.08	0.44 \pm 0.38	0.33 \pm 0.0	0.2521
Lymphocytic infiltrate	0.28 \pm 0.25	0.78 \pm 0.38	0.56 \pm 0.51	0.17 \pm 0.17	0.42 \pm 0.08	0.56 \pm 0.51	0.17 \pm 0.17	0.2885
Macrosteatosis	0 ^b	0.89 \pm 0.77 ^{ab}	1.22 \pm 0.51 ^a	0 ^b	0 ^b	0.22 \pm 0.38 ^{ab}	0 ^b	0.0042
Microsteatosis	0	0	0	0	0	0	0	-
Necrosis	1.17 \pm 0.73 ^{ab}	0.33 \pm 0.33 ^b	1.56 \pm 0.38 ^a	1.17 \pm 0.17 ^{ab}	1.13 \pm 0.17 ^{ab}	1.33 \pm 0.58 ^{ab}	1.33 \pm 0.33 ^{ab}	0.0240
Karyolysis	1.0 \pm 0.00	0.67 \pm 0.58	0.67 \pm 0.58	0.17 \pm 0.17	0.5 \pm 0.50	0.78 \pm 0.19	0	0.6450
Karyorrhexis	1.33 \pm 0.58	1.33 \pm 0.33	0.89 \pm 0.84	1.0 \pm 0.0	0.5 \pm 0.50	1.44 \pm 0.51	0.5 \pm 0.5	0.1910
Pyknosis	1.44 \pm 0.69	0.89 \pm 0.84	0.89 \pm 0.84	0.17 \pm 0.17	0.5 \pm 0.50	1.38 \pm 0.69	0.17 \pm 0.17	0.1298

* Different letters in the line indicate significant difference ($p < 0.05$).

Discussion

The lack of knowledge about the efficiency and necessity of the use of protected forms of acids and organic salts in fish, generates a demand for studies that prove and characterize the real effect of these additives along the gastrointestinal tract. However, it is known that Nile tilapia has a long intestinal tract, and thus it is necessary to use strategies that ensure that the active ingredient (butyrate) of the feed additive is released gradually throughout the intestinal tract, ensuring a complete antimicrobial effect and increased intestinal health (Ng and Koh, 2017).

The fish's potential ability to digest the constituent biomolecules of feed can be assessed by quantifying the activity of major digestive enzymes present in the digestive tract of the species. Thus, the activity of digestive enzymes in a certain ontogenetic phase of fish can be used as an indicator of nutritional status (Babaei et al., 2011; Galaviz et al., 2011) and also to develop the best diet strategy (Cara et al., 2003).

In the present study, the decrease in alkaline protease activity in the groups Oil_{0.25%}, Oil_{0.5%} and Buffer_{0.5%}, when compared to the control group, may be associated with a compensatory effect, since these groups presented an increase in the zootechnical performance, statistically significant for the groups Oil_{0.5%} and Buffer_{0.5%}, observed in a previous study by Jesus et al. 2019. One hypothesis would be that the butyrate may have provided energy necessary for the metabolism of the animals, and it is not necessary to produce higher concentrations of proteases for the use of the protein as an energy source. Thus, butyrate may have spared the protein (Protein sparing effect), ensuring its use for fish growth (Lee, 2015). Furthermore, the histomorphometric analysis indicates, for the anterior region of the intestine, the upper indices of the Buffer_{0.5%} when compared to the Pure_{0.25%}, as well as to the posterior region of the intestines of the animals, where Buffer_{0.5%} presented higher villus perimeter when compared to the Control and Pure_{0.25%}, in addition to the increase in villus length of the Oil_{0.25%} when compared to the Pure_{0.25%} and Control group. These results contribute to the compensatory effect theory, since the Buffer_{0.5%} and Oil_{0.25%} groups showed improvements in the histomorphometric parameters of the intestinal tract, thus presenting greater capacity of nutrient absorption, and this may have led to a lower need for alkaline protease activity. The decrease in the number of goblet cells per villi of the posterior region of the animals of the group Oil_{0.5%} oil may be related to the good intestinal condition of the fish, indicating a possible absence of stressors, since it was not necessary to produce a greater number of these cells. This result

also contributes to the understanding of the compensatory effect suggested above.

In general, the possible inhibition of colonization by microorganisms may have brought benefits to the intestinal mucosa favoring villus structure. This effect may be caused by the reduction of peeling losses, caused by the toxins of pathogenic bacteria, resulting in an increase in villus size and, consequently, a greater area of nutrient absorption and intestinal health (Viola e Vieira, 2007; Partanen e Mroz, 1999).

Other studies point to contrary results to that verified in the present study, where the use of acids and / or organic salts increases the activities of digestive enzymes. Najdegerami et al. 2015 verified the increase of total protease, pepsin, lipase and amylase activity of rainbow trout larvae supplemented with 0.5% polyhydroxybutyrate (PHB) in relation to the control group. Situmorang et al. (2016) supplemented Mozambican tilapia for 28 days with 2.5% and 5% PHB and verified increased lipase activity when compared to control animals. Silva et al. 2016 found that white prawns fed diets supplemented with 2% PHB showed increased intestinal protease, trypsin, chymotrypsin and amylase activity when compared to the non-supplemented group and the group supplemented with 2% sodium butyrate. Animals supplemented with 2% sodium butyrate showed an increase in intestinal lipase when compared to the non-supplemented group.

The action of butyric acid or sodium butyrate is well known and studied in human and terrestrial animals, since it acts in the improvement of the intestinal health, because among many functions they can supply energy to the epithelial cells promoting the differentiation, proliferation and consequently increase of size of intestinal villi (Canani et al., 2011; Galfi and Bokori, 1990). Tran-Ngoc et al. 2018 found that supplementation of Nile tilapia with 0.2% calcium butyrate and 0.2% potassium diformate (KDF), separately for 5 weeks, increased intestinal morphology over normoxia conditions, even more pronounced when subjected to stress, hypoxia. Animals fed with KDF and calcium butyrate had a lower thickness of the submucosa and lamina propria, as well as a smaller number of goblet cells in the distal intestine when compared to the control group. The decrease in the number of goblet cells corroborates with the present study, where the Oil group 0.5% presented a reduction in the number, indicating an improvement in the quality of the intestinal epithelium. The results verified in the present study demonstrate the importance of the use of protected forms of sodium butyrate for the development and

maintenance of intestinal tract health, especially the 0.5% Buffer Group, which benefited the intestinal tract completely in both the middle region above, as the posterior average.

In the present study it was verified by light microscopy and TEM that the animals fed the different diets presented intact intestines, where the intestinal epithelia presented intact, well organized and defined, with well-defined goblet cells and well developed brush borders and dense. These results corroborate Silva et al. 2016, which supplemented *Litopenaeus vannamei* shrimps for 42 days with 2% pure sodium butyrate and 2% PHB, separately, and found by light microscopy and MET, that the treatments did not influence the integrity of the intestinal tract of the animals, when compared to the group fed control diet. On the other hand, the supplementation of shrimp with PHB increased the length, width and perimeter of intestinal villi.

For hepatic alterations, there was an increase in macrosteatosis and consequent necrosis in the liver of the fish of the group Pure 0.5%. Such a finding may be associated with the metabolism of fats, where the butyrate in the pure form and at the highest concentration was absorbed more rapidly, totally metabolized, being accumulated as fat in the liver, leading to inflammation and destruction of some cells. Few studies evaluate the effects of supplementation of organic acids and salts and their possible effects on the liver. This result showed that attention should be paid to this variable, especially when the additives are used in their pure forms and in high concentrations.

Conclusion

The protected forms potentiated the effect of sodium butyrate, since Oil 0.5% contributed to the intestinal health of the animals, as did Buffer 0.5%, Buffer 0.25% and Oil 0.25% increased capacity of absorption of nutrients through the development of villi, besides not attacking the liver as the pure form.

Acknowledgment

The authors thank the National Council for Scientific Development and (CNPq) for the financial support and research grants of M.L. Martins (CNPq 305869/2014-0) and J.L.P. (CNPq 308292/2014-6), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) by the doctoral scholarship of the student G.F.A. Jesus, the company Novation for the donation of the product Butyrex, the company Vetanco for the donation of the product CM3000 and the LCME-UFSC for technical support during electron microscopy

work. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

References

- Anson, M.L., Mirsky, A.E., 1938. The estimation of pepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22, 79-63.
- Babaei, S.S., Kenari, A.A., Nazari, R., Gisbert, E., 2011. Developmental changes of digestive enzymes in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) during larval ontogeny. *Aquaculture*, 318, 138-144.
- Baloi, M. F., Sterzelecki, F. C., Sugai, J. K., Passini, G., Carvalho, C. V. A., Cerqueira, V. R., 2017. Growth performance, body composition and metabolic response to feeding rates in juvenile Brazilian sardine *Sardinella brasiliensis*. *Aquac Nutr.*, 23(6), 1458-1466.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Brum, A., Cardoso, L., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Mouriño, J.L.P., Martins, M.L., 2018. Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, 490, 98-107.
- Canani, R.B., 2011. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J. Gastroenterol.*, 17, 1519-1528.
- Cara, J.B., Moyano, F.J., Cárdenas, S., Fernández-Díaz, M., Yúfera, M., 2003. Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *J. Fish Biol.*, 63, 48-58.
- Galaviz, M.A., García-Gasca, A., Drawbridge, M., Alvarez-González, C.A., López, L.M., 2011. Ontogeny of the digestive tract and enzymatic activity in white seabass, *Atractoscion nobilis*, larvae. *Aquaculture*, 318, 162-168.
- Galfi, P.; Bokori, J., 1990. Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. *Acta vet. hung.*, 38, 3-17.
- García-Carreño, F.L., Navarrete Del Toro, M.A., Ezquerro, J.M., 1997. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility in vitro. I. Effect of protease inhibition in protein ingredients. *J. Mar. Biotechnol.*, 5, 36-40.
- Jesus, G.F.A., Vieira, F.D.N., Silva, B.C., Junior, M.M.D.S., Ushizima, T.T., Schmidt, E.C., Mouriño, J.L.P., 2017. Probiotic bacteria may prevent haemorrhagic septicaemia by maturing intestinal host defences in Brazilian native surubins. *Aquac Nutr.*, 23(3), 484-491.

- Jesus, G.F., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Syracuse, N., Silva, B.C., Silva, A., Mouriño, J.L., Martins, M.L., 2019. Protected forms of sodium butyrate improve the growth and health of Nile tilapia fingerlings during sexual reversion. *Aquaculture*, 499, 119-127.
- Lee, C. S., 2015. *Dietary nutrients, additives and fish health*. John Wiley & Sons.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. chem.*, 31(3), 426-428.
- Najdegerami, E. H., Bakhshi, F., Tokmechi, A., Shiri Harzevili, A., Sorgeloos, P., Bossier, P. 2017. Dietary effects of poly- β -hydroxybutyrate on the growth performance, digestive enzyme activity, body composition, mineral uptake and bacterial challenge of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.*, 23(2), 246-254.
- Ng, W.K., Koh, C.B., 2017. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Rev. Aquac.*, 9(4), 342-368.
- Owatari, M.S., Jesus, G.F.A., de Melo Filho, M.E.S., Lapa, K.R., Martins, M.L., Mouriño, J.L. P., 2018. Synthetic fibre as biological support in freshwater recirculating aquaculture systems (RAS). *Aquac. Eng.*, 82, 56-62.
- Partanen, K. H., & Mroz, Z., 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr. Res. Rev.*, 12, 117-145.
- Piva, A., Grilli, E., Fabbri, L., Pizzamiglio, V., Campani, I., 2007. Free versus microencapsulated organic acids in medicated or not medicated diet for piglets. *Livest. Sci.* 108 (1), 214–217.
- Rani, A., Macintosh, D.J., 1997. An evaluation of the effects of hormone concentration, treatment period, feeding regime, and rearing salinity on production of all-male Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry using 17 α -methyltestosterone. In *Tilapia aquaculture: Proceedings from the fourth international symposium on tilapia in aquaculture*. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Cooperative Extension Service. Ithaca, New York, USA (pp. 791-804).
- Rick, W., Stegbauer, H.P. Alpha-Amylase: Measurement of reducing groups. In: Bergmeyer, H.U. (ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*, v. 2, 2. ed., Weinheim: Verlag Chemie, p.885-915. 1974.
- Sæle, Ø., Nordgreen, A., Olsvik, P.A., Hamre, K., 2010. Characterization and expression of digestive neutral lipases during ontogeny of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 157, 252-259.

- Schmidt, E.C., Dos Santos, R., Horta, P.A., Maraschin, M., Bouzon, Z.L., 2010. Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Micron*, 41, 919–930.
- Schwaiger, J., Wande, R., Adm, S., Pawert, M., Honnen, W., Triebkorn, R., 1997. The use of histopathologic indicators to evaluate contaminant related stress in fish. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery* 6, 75–86.
- Silva, B.C., Jesus, G.F.A., Seiffert, W.Q., Vieira, F.N., Mouriño, J.L.P., Jatobá, A., Nolasco-Soria, H., 2016. The effects of dietary supplementation with butyrate and polyhydroxybutyrate on the digestive capacity and intestinal morphology of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Marine and freshwater behaviour and physiology*, 49(6), 447-458.
- Situmorang, M.L., De Schryver, P., Dierckens, K., Bossier, P., 2016. Effect of poly- β -hydroxybutyrate on growth and disease resistance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles. *Vet microbiol.* 182, 44-49.
- Tran-Ngoc, K. T., Huynh, S. T., Sendão, J., Nguyen, T. H., Roem, A. J., Verreth, J. A., & Schrama, J. W., 2018. Environmental conditions alter the effect of organic acid salts on digestibility and intestinal morphology in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Nutr.*
- Vega-Orellana, M.O., Fracalossi, D.M., Sugai, J.K., 2006. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. *Aquaculture*, 252, 484-493.
- Viola, E.S., Vieira, S.L., 2007. Supplementation of organic and inorganic acidifiers in diets for broiler chickens: performance and intestinal morphology. *Rev. Bras. Zootec.*, 36, 1097-1104.

CAPÍTULO III

Butirado de sódio como ferramenta eficaz para manipulação da microbiota intestinal de tilápia-do-nylo como constatado pela técnica de sequenciamento de alta resolução

Gabriel F.A. Jesus^a; Scheila A. Pereira^a; Marco S. Owatari^a; Flávia L. Zacchi^a; Bruno C. Silva^b; Delano Dias Schleder^c; José Luiz.P. Mouriño^a, Mauricio L. Martins^a.

^aAQUOS - Aquatic Organisms Health Laboratory, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346. CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

^bEPAGRI - Company of Agricultural Research and Rural Extension of Santa Catarina, Rod. Antônio Heil, 6800. CEP 88318-112, Itajaí, SC, Brazil.

^cAquaculture Laboratory, Federal Institute Catarinense – Campus Araquari, BR 280 – km 27. CEP 89245-000, Araquari, SC, Brazil.

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito de diferentes concentrações (0,25% ou 0,5%) de butirato de sódio protegido com óleo de palma ou solução tampão sobre a composição, dinâmica e riqueza da microbiota intestinal de juvenis de tilápia-do-nylo *Oreochromis niloticus*, durante o período de reversão sexual, através do sequenciamento de alto rendimento (HTS). Um total de 1800 pós-larvas foram distribuídas aleatoriamente em 12 unidades experimentais de 100 L, totalizando 150 animais por unidade experimental, sendo submetidos, durante 28 dias, a diferentes tratamentos: peixes alimentados com dieta sem suplementação (Controle); alimentados com dietas suplementadas com 0,25% ou 0,5% de Na-butilato protegido com óleo de palma (Óleo 0,25% e Óleo 0,5%); e alimentados com dieta suplementada com 0,25% de Na-butilato protegido com solução tampão (Tampão 0,25%). Após o período experimental, o grupo Óleo 0,5% apresentou maior quantidade de Operational Taxonomic Unit (OTUs) de 207, enquanto observou-se uma menor quantidade no controle que foi de 44. A curva de rarefação demonstrou que o sequenciamento foi suficiente para contemplar a maioria das espécies presentes no intestino dos peixes. O grupo Óleo 0,5% apresentou índices superiores de abundância, riqueza e diversidade quando comparado aos demais grupos, além disso, o grupo Óleo 0,5%

apresentou maior distanciamento filogenético, principalmente em comparação ao grupo controle. Em nível de filo, verificou-se que o Óleo 0,5% apresentou menor da proporção de Fusobacteria (19,8%) em relação ao grupo Controle (94,7%), bem como aumento na abundância de bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, 28,2% e 21%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle, que apresentou cerca de 1,7% e 0,5%, respectivamente. Os grupos suplementados com butirato de sódio apresentaram um aumento na abundância relativa do filo Proteobacteria, em relação ao grupo controle. Adicionalmente, verificou-se o aumento das Firmicutes no grupo Óleo 0,5%, representado principalmente por bactérias da ordem Lactobacillales, em um total de 20%, valor superior ao grupo controle que apresentou 0,7%. Sendo assim, a forma protegida do butirato de sódio com óleo de palma, na maior concentração (Óleo 0,5%), foi capaz de alterar a microbiota intestinal de juvenis de tilápia-do-nylo, incrementando índices de abundância, riqueza e diversidade, além de estimular o aumento das Firmicutes, principalmente da ordem Lactobacillales.

Palavras-chave: Sais orgânicos, saúde intestinal, microbiota intestinal, HTS, *Oreochromis niloticus*.

Introdução

A microbiota intestinal de peixes é capaz de influenciar a digestão, a nutrição, o crescimento e a resistência a doenças do hospedeiro, fazendo com que o conhecimento dessa comunidade microbiana seja de extrema importância para a aquicultura. Contudo, pouco se conhece a respeito da relação entre composição e atividade da microbiota intestinal com o desenvolvimento de doenças e a fisiologia dos peixes. Sendo assim, o conhecimento da dinâmica, possíveis mecanismos de causa e efeito relacionados à microbiota intestinal e fisiologia animal é essencial para a aquicultura (Ghanbari et al., 2015; Austin, 2006).

Existe uma lacuna de informações a respeito das alterações da microbiota intestinal ao longo da vida dos peixes de cultivo, principalmente associadas às diferentes dietas, como: alimento vivo, dieta artificial, aditivos alimentares, além de possíveis tratamentos preventivos e/ou remediativos com antibióticos ou químicos, os quais são práticas rotineiras em larviculturas. Dessa forma, compreender alguns aspectos da ecologia microbiana na piscicultura, tais como as espécies e diversidade de bactérias associadas a diferentes estágios da vida são úteis para manipular a microbiota intestinal, como uma estratégia para prevenir infecções ou melhorar nutricionais

disponibilidade de nutrientes, especialmente nos estágios iniciais da vida dos animais (Romero et al., 2014).

O desenvolvimento de estratégias capazes de manipular e fortalecer a microbiota intestinal já é praticado, como a suplementação de probióticos, prébióticos e ácidos/sais orgânicos, que favorecem a estabilidade de comunidades microbianas benéficas, melhorando a saúde dos animais, resistência a doenças, crescimento, metabolismo dos lipídios, respostas imunológicas, além de melhorar a qualidade fisiológica intestinal (Ghanbari et al., 2015).

A suplementação de bactérias probióticas *Lactobacillus rhamnosus* e *L. lactis* durante seis semanas na alimentação de tilápias-do-nylo *Oreochromis niloticus*, promoveram aumento das Proteobacteria, além da redução do gênero potencialmente patogênico *Plesiomonas*, em comparação ao grupo controle. Além disso, a suplementação promoveu aumento significativo de *Rhizobium* e *Achromobacter*, os quais podem produzir uma variedade de enzimas com atividade celulolítica e pectolítica benéficas ao hospedeiro. Tais achados indicam que a suplementação probiótica potencializa a propagação de bactérias benéficas no trato intestinal dos animais suplementados (Xia et al., 2018).

Estudos dos efeitos de ácidos orgânicos e seus sais sobre a microbiota intestinal de animais, principalmente em peixes, ainda são raros. Contudo, para aves, segundo Nava et al. (2009), a suplementação de uma mistura de ácidos orgânicos (fórmico e propiônico), durante 29 dias, alterou a microbiota intestinal de frangos de corte, após análises realizadas por técnica de PCR-DGGE. Foi observado ainda, que as populações bacterianas foram mais homogêneas e distintas, além do aumento da colonização de *Lactobacillus* spp. no fêo dos animais, quando comparado ao grupo controle ou tratado com antibiótico.

Dentre os sais de ácidos orgânicos, o butirato vem sendo utilizado na aquicultura como ferramenta alternativa ao uso de antibióticos, promovendo efeitos benéficos comprovados no crescimento, para: tilápia-do-nylo (Jesus et al., 2019a; Jesus et al., 2019b), catfish (Owen et al., 2006), camarão marinho (Silva et al., 2016a,b) e no incremento da imunidade e condição intestinal em carpa comum (Liu et al., 2014). Apesar disso, a maioria desses estudos não analisou os efeitos desses compostos sobre a microbiologia do trato gastrointestinal através de técnicas mais avançadas, como o sequenciamento de alto rendimento (HTS) (Ghanbari et al., 2015).

Dessa forma, o presente estudo objetivou verificar o efeito de diferentes concentrações de butirato de sódio protegido com óleo de

palma ou solução tampão sobre a composição, dinâmica e riqueza da microbiota intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*, durante o período de reversão sexual, através do sequenciamento de alto rendimento (HTS).

Material e Métodos

Dietas experimentais

A preparação das dietas e análise proximal foram realizadas em condições semelhantes às descritas por Jesus et al. (2019a). Os ingredientes e os valores da composição proximal das dietas são mostrados na Tabela 1.

Tabela 2: Ingredientes e análise da composição proximal das diferentes dietas (g kg^{-1}) suplementadas ou não com butirato de sódio, utilizadas no ensaio de alevinagem de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*, durante o período de reversão sexual.

Ingredientes	Controle	Óleo 0,25%	Óleo 0,5%	Tampão 0,25%
Farinha resíduo de salmão (71 % PB)	560,0	560,0	560,0	560,0
Farelo de Milho	360,0	360,0	360,0	360,0
Óleo de soja	40,0	40,0	40,0	40,0
Premix microminerais ¹	10,0	10,0	10,0	10,0
Premix macrominerais ²	10,0	10,0	10,0	10,0
Celulose	20,0	11,6	3,20	15,7
CM3000® ⁴	0,00	8,40	16,8	0,00
Butirex C4® ⁵	0,00	0,00	0,00	4,30
Composição ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ matéria seca)				
Energia, kcal/kg($\text{cal} \cdot \text{kg}^{-1}$)	4329	4328	4329	4329
Proteína	449,3	450,0	451,0	451,1
Extrato etéreo	98,8	103,3	109,0	93,4
Extrativos não- nitrogenados	240,2	224,5	220,3	236,1
Cinzas	112,8	114,0	113,8	113,8
Umidade	99,4	108,2	105,9	105,6

¹Composição premix microminerais: Fósforo $7,38 \text{ g kg}^{-1}$; Cobre 3500 mg kg^{-1} ; Iodo 160 mg kg^{-1} ; Ferro 20000 mg kg^{-1} ; Manganês 10000 mg kg^{-1}

kg⁻¹; Zinco 24000 mg kg⁻¹; Selênio 100 mg kg⁻¹; Vitamina A 2400000 UI kg⁻¹; Vitamina D 600000 UI kg⁻¹; Vitamina E 30000 UI kg⁻¹; Vitamina K 3000 mg kg⁻¹; Riboflavina 4500 mg kg⁻¹; Ácido Pantotênico 1000 mg kg⁻¹; Niacina 2000 mg kg⁻¹; Vitamina B12 8000 mg kg⁻¹; Colina 100000 mg kg⁻¹; Ácido Fólico 1200 mg kg⁻¹; Biotina 200 mg kg⁻¹; Tiamina 4000 mg kg⁻¹; Vitamina B6 3500 mg kg⁻¹; Vitamina C 60000 mg kg⁻¹. ²Composição premix macrominerais: Cálcio 70 g kg⁻¹; Magnésio 4 g kg⁻¹; Fósforo 7,38 g kg⁻¹; Potássio 10,80 g kg⁻¹; Sódio 5,07 g kg⁻¹. ³Butirato de sódio puro com 99% de pureza. ⁴CM3000® protegido com óleo vegetal com 30% de pureza. ⁵Butirex C4® protegido com tampão com 54% de pureza.

Delineamento experimental

O experimento foi realizado no Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAQ), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As pós-larvas recém eclodidas de tilápia-do-nylo foram oriundas da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos do Comitê de Ética da UFSC (CEUA-6827181016).

Após o transporte, um total de 1800 pós-larvas foram distribuídas aleatoriamente em 12 unidades experimentais de 100 L (80 L úteis), totalizando 150 animais por unidade experimental. Estas unidades experimentais estavam acopladas ao sistema de recirculação de água do laboratório experimental, o qual contém um decantador de sólidos, filtro mecânico, filtros aeróbicos e filtro UV (Cubos -16 W, São Paulo - Brasil), aquecedor na cisterna central (1000 W), soprador de ar (1/4 HP), capazes de manter os parâmetros de qualidade de água na faixa ótima para cultivo da espécie. O fotoperíodo utilizado foi de 12 h de luz (Owatari et al., 2018).

As pós-larvas foram aclimatadas durante dois dias e alimentadas com a ração experimental controle. Após a aclimação, os peixes apresentavam-se saudáveis, sem deformidades ou natação errática, sem sinais clínicos característicos de infecções bacterianas e fúngicas, além de apresentar bom apetite e boa aceitação da ração.

Decorrido este período, as pós-larvas de tilápia-do-nylo (*O. niloticus*), com aproximadamente 5 dias de vida após a eclosão (DAE), com tamanho inferior a 13,0 mm e peso médio aproximado de 0,0183 ± 0,0014 g, foram distribuídas nos diferentes tratamentos em triplicata:

- a) Peixes alimentados com ração sem suplementação (Controle);
- b) Peixes alimentados com ração suplementada com 0,25% de CM3000® protegido com óleo (Óleo 0,25%);

c) Peixes alimentados com ração suplementada com 0,5% de CM3000® protegido com óleo (Óleo 0,5%);

d) Peixes alimentados com ração suplementada com 0,25% de Butirex C4® protegido com solução tampão (Tampão 0,25%);

Os animais foram alimentados com as diferentes rações experimentais formuladas (Tabela 1), cinco vezes ao dia (8:00 h, 10:00 h, 12:00 h, 14:00 h e 17:00 h), durante 28 dias, com taxa de arraçoamento inicial de 20%, sendo ajustada semanalmente (Rani e Macintosh, 1997).

Após 28 dias de ensaio, os peixes foram submetidos a um jejum por 18 h para posterior anestesia em solução de Eugenol® (75 mg L⁻¹), eutanásia por comoção cerebral e coleta do trato intestinal, a fim de avaliar alterações da microbiota intestinal.

Os parâmetros de qualidade de água foram mantidos em: oxigênio dissolvido 6,42 ± 0,87 mg L⁻¹ e temperatura 28,05±0,82 °C mensurados com oxímetro YSI-550A; amônia total 0,32±0,11 mg L⁻¹; nitrito 0,15±0,12 mg L⁻¹ e pH 7,41±0,29, medidos com kit colorimétrico Labcon Test.

Análise da microbiota intestinal

Os intestinos de cinco animais por unidade experimental foram removidos assepticamente e mantidos em recipientes estéreis sob refrigeração durante a coleta, armazenados imediatamente a -80 °C até o processamento. Para a extração de DNA total, 200 mg de intestino dos peixes foram pesados, confeccionando o *pool* de cada tratamento. Após incubação com 50 mg mL⁻¹ de lisozima a 37 °C, procedeu-se a extração de DNA utilizando o mini Kit QIAamp® DNA Stool (QIAGEN, Hilden, Germany, DE), seguindo especificações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado por NanoDrop™ 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific DE, USA). As amostras com concentração maior ou igual a 60 ng µL⁻¹ foram utilizadas para a realização do *next-generation sequencing* (NGS), pela empresa Macrogen®. Para a identificação da população microbiana, a amplificação da região V3-V4 do gene 16 S do gene ribossomal (rRNA) foi conduzida através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os iniciadores 341F (5'CCT ACG GGN GGC WGC AG 3') e 805R (5' GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC 3').

A síntese das bibliotecas foi realizada a partir da ligação de adaptadores e iniciadores aos *amplicons* previamente gerados, através do kit Herculase II Fusion DNA Polymerase Nextera XT Index Kit V2 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). As bibliotecas foram

então, quantificadas por fluorimetria em fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen), a validação dos produtos foi realizada em Bioanalyzer 2100 Agilent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). O sequenciamento das bibliotecas foi realizado em Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA), configuração 2 x 300 *paired-end* com volume de 100k por amostra.

O pacote de análise de dados QIIME (Caporaso et al., 2010) foi usado nas bibliotecas de 16S rRNA. Os *reads* foram agrupados baseados nos índices utilizados para cada amostra. Os adaptadores e iniciadores foram retirados. Para a filtragem, sequências menores do que 200 pb e escore médio de qualidade igual ou inferior a 20, foram excluídas. A detecção e remoção de quimeras foi realizada por comparação com a base de dados referência do RDP (*Ribosomal Database Project*), utilizando o algoritmo UCHIME.

As sequências efetivas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs). A afiliação taxonômica de cada OTU foi determinada por comparação com base no banco de dados RDP, agrupando e classificando as sequências com 97% de similaridade e *threshold* de 0,8. As quantidades de OTU e suas respectivas frequências foram computadas para o cálculo dos índices de diversidade de Shannon e para a estimativa de riqueza de espécies, pelo método não paramétrico de Chao1 (Chao e Bunge, 2002). Os resultados da caracterização do microbioma são apresentados nos níveis taxonômicos do filo, gênero, enriquecimento de comunidade e diversidade. A partir das OTUs identificadas nos diferentes grupos, uma árvore filogenética foi inferida utilizando o método de agrupamento de distâncias UPGMA.

Resultados

O sequenciamento da microbiota intestinal produziu 744,595 sequências no total, os quais foram agrupadas em 360 OTUs, sendo o tratamento Óleo 0,5 com maior quantidade de OTUs (207) e o controle com menor quantidade (44) (Tabela 2). A curva de rarefação demonstra que o sequenciamento foi suficiente para contemplar a maioria das espécies presentes no intestino dos peixes, pois não há adição de novas espécies após 10.000 sequências por amostra (Figura 1), sugerindo que a contagem total do ensaio foi representativa para todos os grupos.

Ao final do período experimental, o grupo suplementado com Óleo 0,5% apresentou índices superiores de abundância, riqueza e diversidade, quando comparado aos demais grupos. Os valores acima de 0,99 de cobertura demonstram que a microbiota intestinal foi completamente amostrada (Tabela 2).

Tabela 3: Resultados do agrupamento, número, qualidade por amostra, índices de riqueza e diversidade da microbiota intestinal de tilápias-donilo alimentadas ou não com diferentes concentrações e forma de proteção de butirato de sódio, durante 28 dias.

Grupos	TB	Nº de leituras	GC(%)	Q 20%	Q 30%
Controle	89.485,5	201.794	49.50	98.59	95.34
Óleo 0,25	76.222,6	171.634	49.73	98.64	95.35
Óleo 0,5	77.615,0	171.936	51.73	98.51	94.97
Tampão 0,25	88.333,6	199.231	49.68	98.59	95.29
Grupo	OTUs	Chao1	Shannon	IS	Cobertura
Controle	44.0	44.0	0.55340	0.10	0.999
Óleo 0.25%	52.0	52.0	114.198	0.23	0.999
Óleo 0.5%	207.0	208.0	585.314	0.95	0.999
Tampão 0.25%	57.0	58.5	140.158	0.29	0.999

* TB: Total de Bases : O número total de bases em leituras identificadas; * Número de leituras : O número total de leituras de sequência; * N(%) : A porcentagem N em seqüências lidas; * GC(%) : A porcentagem de GC em seqüências lidas; * Q20(%) : A porcentagem de bases em que o phred está acima de 20; * Q30(%) : A porcentagem de bases em que o phred está acima de 30; * OTUs: Unidade Taxonômica Operacional: definição operacional de uma espécie ou grupo de espécies frequentemente usada quando somente dados de sequência de DNA estão disponíveis; Chao1: retorna a estimativa de riqueza de Chao1 para uma definição de OTU; Shannon: IS: O índice de Shannon leva em conta o número e a uniformidade das espécies; Inverse Simpson: O índice de Inverse Simpson representa a probabilidade de que dois indivíduos selecionados aleatoriamente no habitat pertençam à mesma espécie; Cobertura: Cobertura é calculada como $C = 1 - (s / n)$, onde s é o número de OTUs únicos e n é o número de indivíduos na amostra.

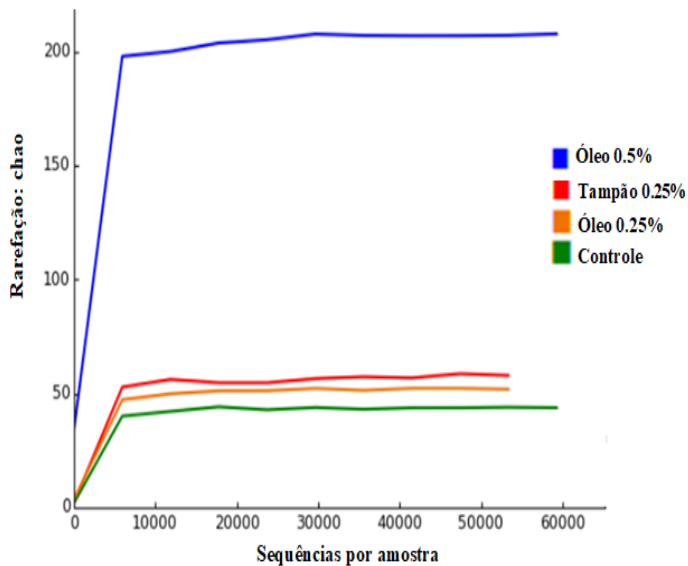


Figura 1: Curva de rarefação para verificação do sequenciamento das diferentes espécies presentes no intestino tilápias-do-nylo alimentadas ou não com diferentes concentrações e fonte de butirato de sódio, durante 28 dias.

O cladograma ou distanciamento filogenético (Figura 2) demonstra que a comunidade microbiana presente no trato intestinal do grupo controle é mais próxima ao grupo suplementado com Óleo 0,25% do que dos demais grupos. Além disso, o grupo suplementado com Óleo 0,5% apresentou maior distanciamento filogenético, principalmente em comparação ao grupo controle.

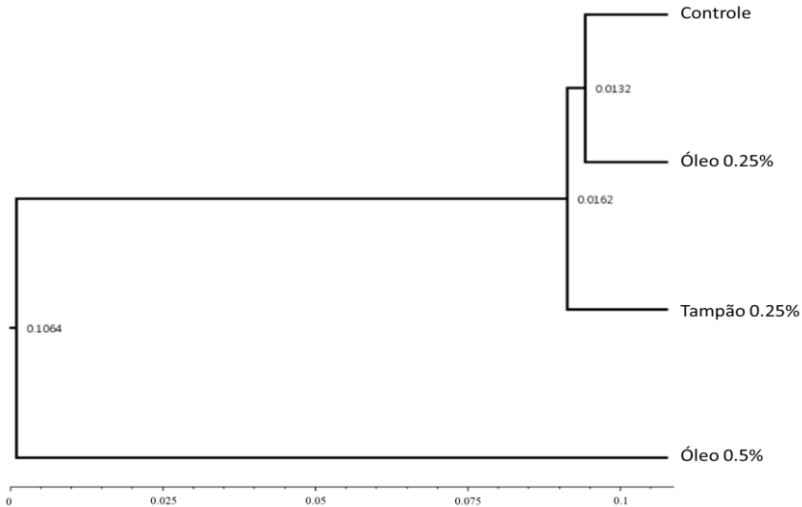


Figura 2: Distanciamento filogenético dos grupos através do UPGMA (do inglês *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*), da microbiota intestinal de tilápias-do-nilo alimentadas ou não com diferentes concentrações e fonte de butirato de sódio, durante 28 dias.

As análises taxonômicas revelaram que os grupos suplementados com a menor concentração (0,25%) independente do mecanismo de proteção (óleo ou tampão) apresentaram maiores similaridades entre si e entre o grupo controle. A suplementação de concentração mais elevada (0,5%), quando protegida com óleo, promoveu uma maior diferenciação da comunidade central microbiana (Figura 3). Analisando em nível de filo, verificou-se que o tratamento Óleo 0,5% apresentou menor da proporção de Fusobacteria (19,8%) em relação ao grupo controle (94,7%), bem como aumento na abundância de bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, 28,2% e 21% respectivamente, quando comparado ao grupo controle, que apresentou cerca de 1,7% e 0,5%, respectivamente. Nota-se também, o aparecimento do filo Cianobacteria no Óleo 0,5%, na proporção de 4,7%, sendo representado em sua totalidade pela *Aerosakkonema funiforme* (Dados suplementares).

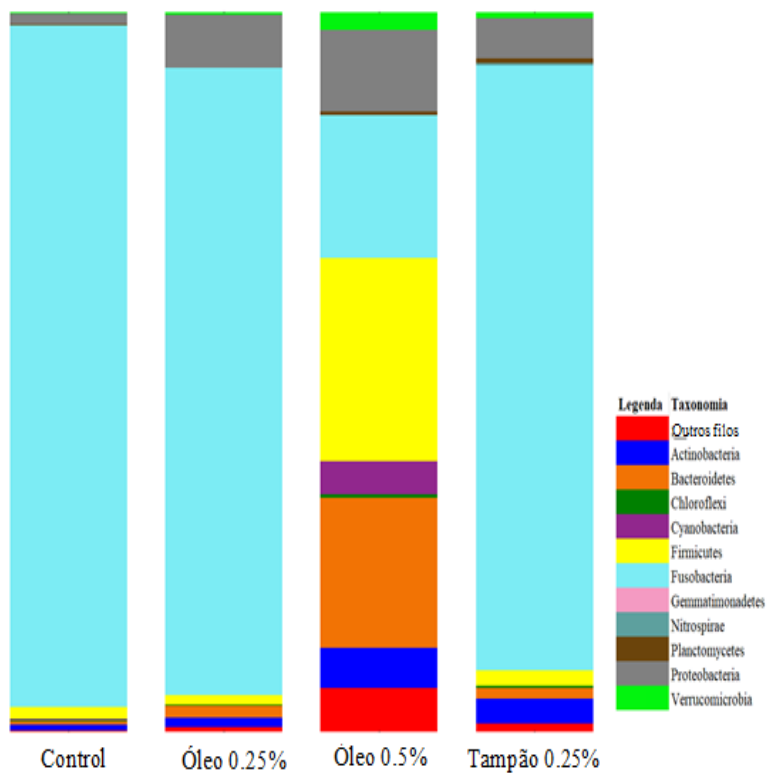


Figura 3: Gráfico de barras, em nível de filo, indicando as alterações da microbiota intestinal de tilápias-do-nilo alimentadas ou não com diferentes concentrações e fonte de butirato de sódio, durante 28 dias.

Bactérias do filo Fusobacteria foram as mais abundantes no grupo Controle (94,6%), Óleo 0,25% (87,2%) e Tampão 0,25% (84,1%), sendo representada em sua totalidade pela espécie *Cetobacterium somerae*. Já no grupo Óleo 0,5%, verificou-se a presença de *Cetobacterium somerae* (17,0%) e *Fusobacterium nucleatum* (2,7%).

Em nível de filo, observou-se também o aumento das Bacteroidetes no grupo Óleo 0,5%, sendo representado principalmente, por: *Alistipes finegoldii* (5,3%), *Muribaculum intestinale* (2,7%), *Bacteroides chinchillae* (2,6%), *Bacteroides fragilis* (1,7%), *Prevotella copri* (1,2%), *Barnesiella intestinihominis* (1,2%), *Bacteroides acidifaciens* (0,9%). No grupo controle, o filo Bacteroidetes é representado em sua totalidade por *Bacteroides caecigallinarum* (0,3%) e *Prevotella copri* (0,2%).

Os grupos suplementados com butirato de sódio apresentaram um aumento na abundância relativa do filo Proteobacteria, quando comparados ao grupo controle (1,59%), sendo 11,32%, 7,37% e 5,49%, para os grupos Óleo 0,5%, Óleo 0,25% e Tampão 0,25%, respectivamente. No grupo Óleo 0,5%, destaca-se a bactéria *Acetobacter pasteurianus*, a qual apresentou maior abundância, representando 3,4% do total, sendo que todas as demais representantes estiverem abaixo de 0,6%.

Adicionalmente, verificou-se o aumento do filo as Firmicutes no grupo Óleo 0,5%, representado principalmente por bactérias da ordem Lactobacillales, em um total de 20%, bastante superior ao grupo controle que apresentou apenas 0,7%. Quando analisado o grupo Óleo 0,5% em nível de espécie, observa-se que o total dos 20% de bactérias da ordem Lactobacillales é representado por: 7,2% de *Lactobacillus plantarum*, 4,9% de *Lactobacillus fermentum*, 2,9% *Pediococcus pentosaceus*, 1,6% *Weissella confusa*, 1,1% *Lactobacillus kimchii*, 0,9% *Lactobacillus animalis*.

Discussão

O efeito benéfico do butirato em animais terrestres já foi demonstrado em diversos estudos, promovendo a manutenção da saúde intestinal e da homeostase, assim como o estado metabólico e imunológico dos animais; causando também o incremento do crescimento e aumento das vilosidades intestinais; aumento da proliferação celular ao longo do intestino e melhoria no efeito barreira do intestino, entre outros (Jesus et al., 2019b; Wu et al., 2018; Onrust et al., 2015; Guilloteau et al., 2010).

No entanto, até mesmo para os animais terrestres existe um conhecimento limitado acerca do efeito do butirato sobre a ecologia da microbiota intestinal. Yang et al. (2018) estudaram as alterações induzidas pelo butirato na microbiota intestinal de frangos e verificaram que a suplementação do sal orgânico não afetou a diversidade da microbiota intestinal, mas foi capaz de alterar a sua composição. Já Wu et al. (2018) verificaram que a suplementação de 400 mg kg⁻¹ de butirato de sódio foi capaz de aumentar os níveis de Firmicutes e Proteobacteria em frangos, enquanto uma maior abundância relativa de Bacteroidetes foi observada no grupo suplementado com 800 mg kg⁻¹. Além disso, foi verificado uma redução nos níveis de Enterobacteriaceae e aumento em Lachnospiraceae e Rikenellaceae no lúmen cecal de aves alimentadas com 800 mg kg⁻¹ de butirato. Por fim, verificou-se uma maior proporção de Ruminococcaceae e uma notável redução de Lactobacillaceae em aves tratadas com 400 mg kg⁻¹ de butirato de sódio.

Em camundongos, o butirato de sódio foi capaz de corrigir o desequilíbrio da microbiota intestinal induzida por uma dieta rica em gorduras, elevando consideravelmente a abundância das bactérias benéficas *Christensenellaceae*, *Blautia* e *Lactobacillus*.

A composição basal do microbioma intestinal de importantes espécies econômicas, como a tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, ainda é bastante desconhecida, sendo necessários estudos para o melhor entendimento. Diversos autores analisaram os efeitos de diferentes aditivos alimentares na comunidade bacteriana intestinal de tilápia; no entanto, esses estudos empregaram um método baseado em “fingerprint-based method” (PCR-DGGE), adequado para identificar mudanças nas comunidades, mas sem descrever a composição de espécies (Ray et al., 2017).

A microbiota intestinal dos peixes é caracterizada por complexas comunidades que podem ser alteradas constantemente devido a uma série de fatores, como: o ambiente de criação, idade do animal, saúde, hábito alimentar, alimentação, entre outros (Giatsis et al., 2015; Merrifield et al. 2010). No presente estudo, o filo Fusobacteria foi o mais abundante na microbiota intestinal das tilápias, com exceção dos animais do grupo Óleo 0,5%, o qual apresentaram o filo Firmicutes como o mais abundante, seguido pelo Bacteroidetes. Diferentes estudos têm demonstrado variação na dominância dos filos no trato intestinal da tilápia-do-nilo, porém os filos mais frequentemente relatados como dominantes são

Proteobacteria e Fusobacteria (Ray et al., 2017; Giatsis et al., 2015; Zhou et al., 2009).

O butirato de sódio (Óleo 0,5%) foi capaz de alterar a microbiota intestinal de *O. niloticus*, reduzindo os níveis de Fusobacteria e aumentando Firmicutes e Bacteroidetes. Tal alteração fica evidenciada pelos valores mais altos de OTU, Chao1 e Shannon encontrados no grupo Óleo 0,5%, quando comparado aos demais grupos, embora sem significância, pois não foi realizada análise estatística. Assim como no grupo Óleo 0,5%, Standen et al. (2015) verificaram que tilápias-do-nilo (*O. niloticus*) alimentadas com probiótico comercial durante oito semanas, apresentaram como filo mais abundante o Firmicutes.

Por se tratar de peixes recém-eclodidos, os quais não apresentam o intestino totalmente desenvolvido, a comunidade microbiana intestinal sofre de maneira mais intensa os efeitos do ambiente de criação e da alimentação (Giatsis et al., 2015; Merrifield et al. 2010), podendo justificar a alteração da microbiota em 28 dias de suplementação do butirato de sódio. Além disso, o efeito de antimicrobiano do butirato de sódio, principalmente contra bactérias Gram negativas, já foi comprovado em estudos anteriores (Jesus et al., 2019a; Silva et al., 2013), o que pode justificar a inibição da *C. somerae* e o estímulo de outras bactérias, como por exemplo *L. plantarum* e *L. fermentum*.

A espécie de bactéria mais abundante nos grupos Controle (94,6%), Óleo 0,25% (87,2%) e Tampão 0,25% (84,1%) foi *C. somerae*. Tal bactéria já foi relatada como predominante na microbiota intestinal de peixes (Ray et al., 2017; Giatsis et al., 2015; Tsuchiya et al., 2008), sendo uma espécie anaeróbica capaz de produzir vitamina B₁₂ e metabólitos antimicrobianos. Tal característica sugere que a *C. somerae* desempenha um papel importante na produção de B₁₂, uma vez que a mesma é encontrada com frequência em tilápias (*O. niloticus*) e carpas (*Cyprinus carpio*), espécies que já demonstraram não necessitar de suplementação de vitamina B₁₂ na dieta (Ray et al., 2017; Tsuchiya et al., 2008; Sugita et al., 1991). No grupo Óleo 0,5%, foi encontrada outra bactéria do filo Fusobacteria, a *Fusobacterium nucleatum*. Trata-se de uma bactéria gram-negativa anaeróbica obrigatória, encontrada na cavidade oral de humanos e animais, responsável por doenças bucais, incluindo periodontite e gengivite. Recentemente, vários estudos relataram que *F. nucleatum* está associada ao desenvolvimento de neoplasias colorretais em humanos (Shang e Liu, 2018).

O aumento da abundância de Firmicutes no grupo Óleo 0,5% foi representado principalmente por membros do gênero *Lactobacillus* e *Pediococcus*, já relatados em estudos anteriores como bactérias endógenas da microbiota intestinal de tilápias (Jatobá et al., 2011; Ferguson et al., 2010). Tal alteração sugere melhorias à saúde do hospedeiro, uma vez que essas são bactérias capazes de trazer uma série de benefícios, como: inibição de bactérias patogênicas, exclusão competitiva, fonte de nutrientes e enzimas digestivas, modulação do sistema imunológico, além da produção de bacteriocinas e ácidos orgânicos (Jesus et al., 2016; Mouriño et al., 2012). Jatobá et al. (2011), suplementando tilápias com *L. plantarum*, verificaram, *in vitro*, a capacidade da bactéria de inibir o crescimento de uma série de patógenos e, *in vivo*, constataram incremento do sistema imunológico dos animais. Já, Ferguson et al. (2010) observaram que a suplementação oral de *P. acidilactici* foi capaz de modular o desenvolvimento de comunidades bacterianas intestinais em tilápias vermelhas, assim como estimular alguns aspectos da resposta imunológica inespecífica.

O grupo Óleo 0,5% também apresentou aumento na abundância relativa de Bacteroidetes. Tal filo ainda é pouco estudado em peixes, porém *Bacteroides* são especializados na fermentação de alguns polissacarídeos complexos e, pelo menos algumas das espécies mais comuns no intestino humano, são conhecidas por produzir succinato, acetato e propionato a partir da fermentação de polissacarídeos. Além disso, em mamíferos, podem auxiliar no desenvolvimento do “GALT” (*Gut-associated lymphoid tissue*) e na maturação do sistema imunológico, auxiliando no efeito barreira do trato intestinal contra patógenos, além de parecer ter um papel importante na prevenção da obesidade, em humanos (Koh et al., 2016; Wexler et al., 2007). O aumento da abundância desse filo no grupo Óleo 0,5% pode estar associado ao fato do butirato ser um ácido graxo. Wu et al. (2011) sugerem que dietas alimentadas a longo prazo influenciam diretamente a composição da microbiota intestinal, de forma que pessoas que se alimentam de proteína e gorduras apresentam a microbiota representada predominantemente por *Bacteroides*, enquanto as que consomem mais carboidratos apresentam predomínio de *Prevotella* spp. Essa hipótese pode ser levada em consideração para o presente estudo, uma vez que o grupo controle apresentou apenas duas espécies desse filo, sendo uma delas a *Prevotella copri*.

Em outro estudo, Turnbaugh et al. (2006) deduzem que o metabolismo de carboidratos é o fator determinante para modular a

comunidade bacteriana do trato intestinal. Eles observaram que a microbiota de indivíduos obesos é mais fortemente enriquecida com bactérias do filo Firmicutes e menos com Bacteroidetes, e supõem que esse perfil da comunidade bacteriana pode ser mais eficiente na extração da energia da dieta do que a microbiota de indivíduos magros, cuja as proporções são opostas.

A espécie *B. intestinihominis* foi verificada apenas na microbiota do grupo controle (0,3%) e no Óleo 0,5% (1,2%). Ray et al. (2017) verificaram um possível aumento nas populações de *Barnesiella* com decréscimos correspondentes no número de *Cetobacterium*, além de sugerir que o estudo seja o primeiro relato do gênero em peixes. O presente estudo corrobora com os possíveis achados desse autor, uma vez que a espécie *B. intestinihominis* foi encontrada também em tilápias-do-nilo e teve seu incremento com o decréscimo de *Cetobacterium*.

Além disso, o aumento da concentração do butirato na dieta foi acompanhado com o aumento da abundância de bactérias do filo Proteobacteria na microbiota intestinal de peixes *Oreochromis niloticus*, principalmente *A. pasteurianus* no grupo Óleo 0,5%. A importância e função dessa bactéria na microbiota de peixes ainda não são conhecidas, porém trata-se de um microrganismo da família Acetobacteraceae, capazes de oxidar parcialmente uma variedade de carboidratos e de liberar os metabólitos correspondentes (aldeídos, cetonas e ácidos orgânicos), principalmente o ácido acético. Estas pequenas moléculas, produzidas na oxidação de ácidos graxos, entram diretamente no ciclo do ácido cítrico para a geração de energia, o que melhora a disponibilidade energética para o animal Sugiura et al. (2006) relataram que a suplementação de ácido acético na dieta de truta arco-íris, na concentração de 5%, aumentou a digestibilidade de fósforo (P) e tendeu a diminuir o pH do estômago, mas não interferiu no pH do intestino.

Conclusão

A forma protegida do butirato de sódio na maior concentração (Óleo 0,5%) foi capaz de alterar a microbiota intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo, incrementando índices de abundância, riqueza e diversidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e (CNPq) pelo suporte financeiro e pelas bolsas de pesquisa

de M.L. Martins (CNPq 305869/2014-0) e J.L.P. (CNPq 308292/2014-6), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado do aluno G.F.A. Jesus, à empresa Novation pela doação do produto Butyrex e à empresa Vetanco pela doação do produto CM3000. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

- Austin, B., 2006. The bacterial microflora of fish, revised. *Sci World J.*, 6, 931-945.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pena, AG., Goodrich, JK., Gordon, JL., Huttley, GA., Kelley, ST., Knights, D., Koenig, JE., Ley, RE., Lozupone, CA., McDonald, D., Muegge, BD., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, JR., Turnbaugh, PJ., Walters, WA., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., Knight, R., Huttley, GA., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, 7(5), 335.
- Chao, A., Bunge, J., 2002. Estimating the number of species in a stochastic abundance model. *Biometrics*, 58(3), 531-539.
- Ferguson, R.M.W., Merrifield, D.L., Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S., Picchiatti, S., Balcázar, J.L., Davies, S.J., 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Appl Microbiol.* 109(3):851–862.
- Ghanbari, M., Kneifel, W., Domig, K. J., 2015. A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, 448, 464-475.
- Giatsis, C., Sipkema, D., Smidt, H., Heilig, H., Benvenuti, G., Verreth, J., Verdegem, M., 2015. The impact of rearing environment on the development of gut microbiome in tilapia larvae. *Sci Rep.* 5, 18206.
- Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R., Van Immerseel, F., 2010. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev.* 23(2), 366-384.
- Jatobá A.,Vieira, F.N., Buglione-Neto C., Mouriño, J., Silva, B.C., Seiffter, W., Andreatta, ER., 2011. Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. *Fish Physiol Biochem* 37(4):725–732.
- Jesus, G.F., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Syracuse, N., Silva, B.C., Silva, A., Mouriño, J.L., Martins, M.L., 2019a. Protected forms of

- sodium butyrate improve the growth and health of Nile tilapia fingerlings during sexual reversion. *Aquaculture*, 499, 119-127.
- Jesus, G. F., Pereira, S. A., Owatari, M. S., Addam, K., Silva, B. C., Sterzelecki, F. C., Sugai, J.K., Cardoso, I., Jatobá, A., Mourião, J.L.P., Martins, M. L., 2019b. Use of protected forms of sodium butyrate benefit the development and intestinal health of Nile tilapia during the sexual reversion period. *Aquaculture*, 504, 326-333.
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Bäckhed, F., 2016. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 165(6), 1332-1345.
- Romero, J., Ringø, E., Merrifield, D. L., 2014. The gut microbiota of fish. *Aquaculture nutrition: Gut health, probiotics and prebiotics*, 75-100.
- Liu, W., Yang, Y., Zhang, J., Gatlin, D. M., Ringø, E., Zhou, Z., 2014. Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil. *Br J Nutr.*, 112(1), 15-29.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., Børgwald, J., Castex, M., Ringø, E., 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 302(1-2):1-18.
- Mourião, J.L.P., Vieira, F.D., Jatoba, A.B., Da Silva, B.C., Jesus, G.F.A., Seiffert, W.Q., Martins, M.L., 2012 Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Aquac Nutr.*, 18, 73-80.
- Nava, G.M., Attene-Ramos, M.S., Gaskins, H.R., Richards, J.D., 2009. Molecular analysis of microbial community structure in the chicken ileum following organic acid supplementation. *Vet microbial.*, 137(3-4), 345-353.
- Owatari, M.S., Jesus, G.F.A., de Melo Filho, M.E.S., Lapa, K.R., Martins, M.L., Mourião, J.L. P., 2018. Synthetic fibre as biological support in freshwater recirculating aquaculture systems (RAS). *Aquac Eng.*, 82, 56-62.
- Ray, C., Bujan, N., Tarnecki, A., Davis, A. D., Browdy, C., Arias, C. R., 2017. Analysis of the Gut Microbiome of Nile Tilapia *Oreochromis Niloticus* L. Fed Diets Supplemented with Previda® and Saponin. *J Fish Sci.*, 11(2), 36.
- Silva, B.C., Jesus, G.F.A., Seiffert, W.Q., Vieira, F.N., Mourião, J.L.P., Jatobá, A., Nolasco-Soria, H., 2016a. The effects of dietary

- supplementation with butyrate and polyhydroxybutyrate on the digestive capacity and intestinal morphology of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Marine and freshwater behaviour and physiol., 49(6), 447-458a.
- Silva, B.C., Nolasco Soria, H., Magallón Barajas, F., Civera Cerecedo, R., Casillas Hernández, R., Seiffert, W., 2016b. Improved digestion and initial performance of whiteleg shrimp using organic salt supplements. Aquac Nutr. 22 (5), 997–1005b.
- Silva, B.C., Vieira, F.N., Mouriño, J.L.P., Ferreira, G.S., Seiffert, W.Q., 2013. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. Aquaculture 384, 104-110.
- Shang, F.M., Liu, H.L., 2018. *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A review. World J gastrointestinal oncology, 10(3), 71.
- Standen, B.T., Rodiles, A., Peggs, D.L., Davies, S.J., Santos, G.A., Merrifield, D.L., 2015. Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. Appl. microbiol. biotechnol., 99(20), 8403-8417.
- Sugita, H., Miyajima, C., Deguchi, Y., 1991. The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. Aquaculture, 92, 267-276.
- Sugiura, S.H., Roy, P.K., Ferraris, R.P., 2006. Dietary acidification enhances phosphorus digestibility but decreases H⁺/K⁺ ATPase expression in rainbow trout. J Exp Biol., 209(19), 3719-3728.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature, 444(7122), 1027.
- Tsuchiya, C., Sakata, T., Sugita, H., 2008. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. Lett Appl Microbiol., 46(1), 43-48.
- Owen, M.A.G., Waines, P., Bradley, G., Davies, S., 2006. The effect of dietary supplementation of sodium butyrate on the growth and microflora of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). XII international symposium fish nutrition and feeding, May 28–June 1, Book of abstracts: 149.
- Onrust, L., Ducatelle, R., Van Driessche, K., De Maesschalck, C., Vermeulen, K., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., 2015. Steering endogenous butyrate production in the intestinal tract of broilers as a tool to improve gut health. Front vet sci., 2, 75.
- Rani, A., Macintosh, D.J., 1997. An evaluation of the effects of hormone concentration, treatment period, feeding regime, and

- rearing salinity on production of all-male Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry using 17 α -methyltestosterone. In Tilapia aquaculture: Proceedings from the fourth international symposium on tilapia in aquaculture. Northeast Regional Agricultural Engineering Service, Cooperative Extension Service. Ithaca, New York, USA (pp. 791-804).
- Yang, X., Yin, F., Yang, Y., Lepp, D., Yu, H., Ruan, Z., Gong, J., 2018. Dietary butyrate glycerides modulate intestinal microbiota composition and serum metabolites in broilers. *Sci rep.*, 8(1), 4940.
- Wexler, H. M., 2007. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. microbiol. rev.*, 20(4), 593-621.
- Wu, W., Xiao, Z., An, W., Dong, Y., Zhang, B., 2018. Dietary sodium butyrate improves intestinal development and function by modulating the microbial community in broilers. *PloS one*, 13(5), e0197762.
- Wu, G.D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.Y., Keilbaugh, S.A., Sinha, R., 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052), 105-108.
- Xia, Y., Lu, M., Chen, G., Cao, J., Gao, F., Wang, M., Yi, M., 2018. Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & shellfish immunol.*, 76, 368-379.
- Zhou, Z. G., He, S., Liu, Y., Shi, P., Huang, G., Yao, B., 2009. The effects of dietary yeast culture or short-chain fructo-oligosaccharides on the intestinal autochthonous bacterial communities in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*♀ \times *Oreochromis aureus*♂. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40(4), 450-459.

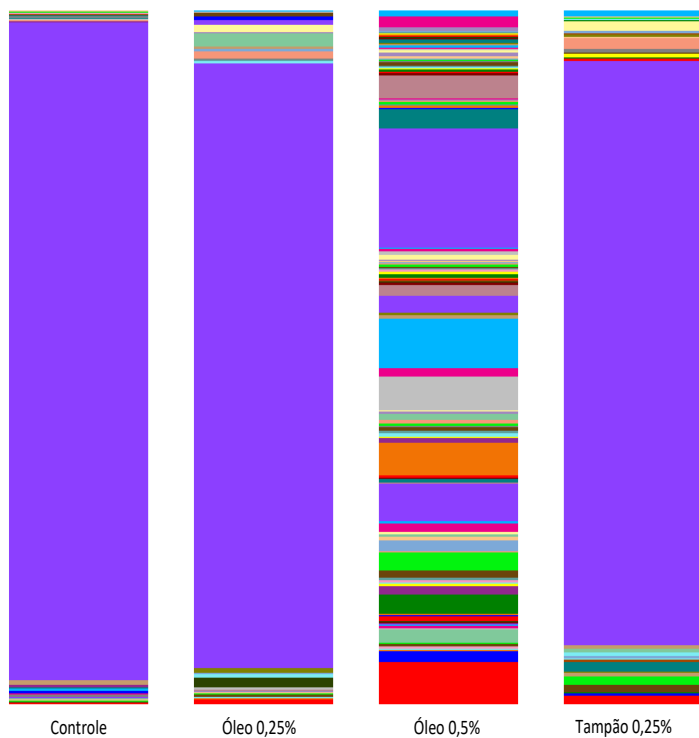


Figura 4: Dados Suplementares - Gráfico de barras, em nível de espécie, indicando as alterações da microbiota intestinal de tilápias-do-nilo alimentadas ou não com diferentes concentrações e fontes de butirato de sódio, durante 28 dias.

Legenda	Taxonomia	Total	Controle	Óleo 0,25%	Óleo 0,5%	Tampão 0,25%
		%	%	%	%	%
	Não identificada	2,0%	0,1%	0,8%	6,1%	1,2%
	Actinobacteria; <i>Lawsonella clevelandensis</i>	0,5%	0,0%	0,0%	1,5%	0,4%
	Actinobacteria; Corynebacteriaceae; Corynebacterium; <i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
	Actinobacteria; Corynebacteriaceae; Corynebacterium; <i>Corynebacterium vitaeruminis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
	Actinobacteria; Dietziaceae; Dietzia; <i>Dietzia maris</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Actinobacteria; Frankiaceae; Frankia; <i>Frankia inefficax</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
	Actinobacteria; Gordoniaceae; Gordonia; <i>Gordonia hongkongensis</i>	0,1%	0,0%	0,2%	0,1%	0,0%
	Actinobacteria; Intrasporangiaceae; Phycococcus; <i>Phycococcus badiiscoriae</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%
	Actinobacteria; Intrasporangiaceae; Tetrasphaera; <i>Tetrasphaera jenkinsii</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Actinobacteria; Microbacteriaceae; <i>Aurantimicrobium minutum</i>	0,5%	0,2%	0,4%	0,3%	1,0%
	Actinobacteria; Microbacteriaceae; <i>Lysinimonas soli</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Actinobacteria; Microbacteriaceae; <i>Leifsonia; Leifsonia lichenia</i>	0,4%	0,1%	0,2%	0,1%	1,2%
	Actinobacteria; Micrococcaceae; <i>Micrococcus; Micrococcus aloevarae</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Actinobacteria; Nocardioideaceae; <i>Aeromicrobium;</i> <i>Aeromicrobium ginsengisoli</i>	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%
	Actinobacteria; Nocardioideaceae; <i>Nocardioides;</i> <i>Nocardioides nanhaiensis</i>	0,0%	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%
	Actinobacteria; Propionibacteriaceae; <i>Propionibacterium acnes</i>	0,6%	0,2%	0,0%	2,0%	0,1%
	Actinobacteria; Pseudonocardiaceae; <i>Pseudonocardia; Pseudonocardia alni</i>	0,1%	0,1%	0,2%	0,0%	0,0%
	Actinobacteria; Pseudonocardiaceae; <i>Pseudonocardia;</i> <i>Pseudonocardia hispaniensis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%

	Actinobacteria; Pseudonocardiaceae; <i>Pseudonocardia</i> ; <i>Pseudonocardia kujensis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
	Actinobacteria; Acidimicrobiales; Acidimicrobiaceae; <i>Aciditerrimonas ferrireducens</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
	Actinobacteria; Acidimicrobiales; Acidimicrobiaceae; <i>Ilumatobacter</i> ; <i>Ilumatobacter nonamiensis</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%
	Actinobacteria; Acidimicrobiales; Iamiaceae; <i>Aquihabitans daechungensis</i>	0,2%	0,0%	0,1%	0,0%	0,5%
	Actinobacteria; Bifidobacteriales; Bifidobacteriaceae; <i>Bifidobacterium</i> ; <i>Bifidobacterium thermophilum</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
	Actinobacteria; Solirubrobacterales; Conexibacteraceae; <i>Conexibacter</i> ; <i>Conexibacter arvalis</i>	0,1%	0,2%	0,0%	0,1%	0,0%
	Actinobacteria; Solirubrobacterales; Solirubrobacteraceae; <i>Solirubrobacter</i> ; <i>Solirubrobacter taibaiensis</i>	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%
	Bacteroidetes; Sediminibacterium; <i>Sediminibacterium aquarii</i>	0,4%	0,0%	0,0%	0,0%	1,5%
	Bacteroidetes; <i>Terrimonas</i> ; <i>Terrimonas arctica</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%
	Bacteroidetes; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; <i>Flavobacterium</i> ; <i>Flavobacterium aquicola</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
	Bacteroidetes; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; <i>Flavobacterium</i> ; <i>Flavobacterium saliperosum</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Bacteria; Bacteroidetes; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae; <i>Flavobacterium</i> ; <i>Flavobacterium xueshanense</i>	0,2%	0,0%	0,0%	0,7%	0,0%
	Bacteroidetes; Sphingobacteriales; Sphingobacteriaceae; <i>Pedobacter</i> ; <i>Pedobacter ginsengiterrae</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
	Bacteroidetes; Bacteroidia; <i>Prolixibacter</i> ; <i>Prolixibacter denitrificans</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
	Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; <i>Muribaculum intestinale</i>	0,7%	0,0%	0,0%	2,7%	0,0%
	Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; <i>Barnesiella</i> ; <i>Barnesiella intestinihominis</i>	0,3%	0,0%	0,0%	1,2%	0,0%

Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; <i>Butyricimonas</i> ; <i>Butyricimonas faecihominis</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; <i>Odoribacter</i> ; <i>Odoribacter splanchnicus</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; <i>Parabacteroides</i> ; <i>Parabacteroides distasonis</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; <i>Parabacteroides</i> ; <i>Parabacteroides goldsteinii</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae; <i>Bacteroides</i> ; <i>Bacteroides acidifaciens</i>	0,2%	0,0%	0,0%	0,9%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae; <i>Bacteroides</i> ; <i>Bacteroides caecigallinarum</i>	0,1%	0,3%	0,0%	0,0%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae; <i>Bacteroides</i> ; <i>Bacteroides chinchillae</i>	0,7%	0,0%	0,0%	2,6%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae; <i>Bacteroides</i> ; <i>Bacteroides finegoldii</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae; <i>Bacteroides</i> ; <i>Bacteroides fragilis</i>	0,4%	0,0%	0,0%	1,7%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae; <i>Bacteroides</i> ; <i>Bacteroides massiliensis</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae; <i>Bacteroides</i> ; <i>Bacteroides mediterraneensis</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae; <i>Bacteroides</i> ; <i>Bacteroides uniformis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae; <i>Bacteroides</i> ; <i>Bacteroides vulgatus</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Porphyromonadaceae; <i>Fermentimonas caenicola</i>	0,1%	0,0%	0,3%	0,0%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae; <i>Prevotella</i> ; <i>Prevotella copri</i>	0,4%	0,2%	0,0%	1,2%	0,0%

Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae; Prevotella; Prevotella intermedia	0,1%	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae; Prevotella; Prevotella nigrescens	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae; <i>Prevotella; Prevotella ruminicola</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae; <i>Alistipes; Alistipes finegoldii</i>	1,3%	0,0%	0,0%	5,3%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae; <i>Alistipes; Alistipes onderdonkii</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae; <i>Alistipes; Alistipes putredinis</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae; <i>Alistipes; Alistipes senegalensis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Bacteroidetes; Cytophagia; Cytophagales; Flammoeovirgaceae; <i>Limibacter; Limibacter armeniacum</i>	0,3%	0,0%	1,3%	0,0%	0,0%
Chloroflexi; Sphaerobacterales; Sphaerobacteraceae; <i>Sphaerobacter;</i> <i>Sphaerobacter thermophilus</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,4%
Chloroflexi; Anaerolineae; Anaerolineales; Anaerolineaceae; <i>Thermanaerotherix daxensis</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%
Cyanobacteria; <i>Aliterella antarctica</i>	0,1%	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%
Cyanobacteria; Oscillatoriales; <i>Aerosakkonema funiforme</i>	1,2%	0,0%	0,0%	4,7%	0,0%
Firmicutes; Anaerococcus; <i>Anaerococcus octavius</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Firmicutes; Sedimentibacter; <i>Sedimentibacter saalensis</i>	0,2%	0,0%	0,0%	0,6%	0,0%
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Aeribacillus pallidus</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Bacillus; Bacillus cohnii</i>	0,4%	0,0%	0,7%	0,6%	0,1%
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Bacillus;</i> <i>Bacillus massiliosenegalensis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Bacillus; Bacillus niacini</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%

	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; <i>Bacillus velezensis</i>	0,2%	0,0%	0,0%	0,6%	0,0%
	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Oceanobacillus</i> ; <i>Oceanobacillus caeni</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; <i>Virgibacillus</i> ; <i>Virgibacillus halophilus</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; <i>Staphylococcus</i> ; <i>Staphylococcus capitis</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,6%	0,0%
	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; <i>Thermoflavimicrobium</i> ; <i>Thermoflavimicrobium dichotomicum</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%
	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Carnobacteriaceae; <i>Granulicatella</i> ; <i>Granulicatella elegans</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; <i>Lactobacillus</i> ; <i>Lactobacillus animalis</i>	0,2%	0,0%	0,0%	0,9%	0,0%
	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; <i>Lactobacillus</i> ; <i>Lactobacillus brevis</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; <i>Lactobacillus</i> ; <i>Lactobacillus cacaonum</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; <i>Lactobacillus</i> ; <i>Lactobacillus fermentum</i>	1,2%	0,0%	0,0%	4,9%	0,0%
	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; <i>Lactobacillus</i> ; <i>Lactobacillus kimchii</i>	0,3%	0,0%	0,0%	1,1%	0,0%
	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; <i>Lactobacillus</i> ; <i>Lactobacillus plantarum</i>	1,9%	0,5%	0,0%	7,2%	0,0%
	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; <i>Lactobacillus</i> ; <i>Lactobacillus reuteri</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%
	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; <i>Pediococcus</i> ; <i>Pediococcus claussenii</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%
	Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; <i>Pediococcus</i> ; <i>Pediococcus pentosaceus</i>	0,6%	0,0%	0,0%	2,3%	0,0%

Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Leuconostocaceae; <i>Weissella</i> ; <i>Weissella confusa</i>	0,4%	0,0%	0,0%	1,6%	0,0%
Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae; <i>Streptococcus</i> ; <i>Streptococcus agalactiae</i>	0,1%	0,2%	0,0%	0,1%	0,0%
Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae; <i>Streptococcus</i> ; <i>Streptococcus parauberis</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%
Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae; <i>Streptococcus</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; <i>Colidextribacter massiliensis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; <i>Flintibacter butyricus</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Christensenellaceae; <i>Christensenella</i> ; <i>Christensenella minuta</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; <i>Clostridium</i> ; <i>Clostridium quinii</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; <i>Clostridium</i> ; <i>Clostridium saudiense</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,6%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; <i>Clostridium</i> ; <i>Eubacterium tarantellae</i>	0,1%	0,3%	0,0%	0,0%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Eubacteriaceae; <i>Eubacterium</i> ; <i>Eubacterium coprostanoligenes</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; <i>Abyssivirga alkaniphila</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; <i>Acetatifactor muris</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; <i>Lachnoanaerobaculum umeaense</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; <i>Muricomes intestini</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae; <i>Blautia</i> ; <i>Blautia obeum</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Oscillospiraceae; <i>Oscillibacter</i> ; <i>Oscillibacter ruminantium</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%

Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae; <i>Thermincola</i> ; <i>Thermincola carboxydiphila</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; <i>Negativibacillus massiliensis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; <i>Phoceia massiliensis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; <i>Clostridium caenicola</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae ; <i>Clostridium clariflavum</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; <i>Clostridium straminisolvens</i>	0,2%	0,0%	0,0%	0,8%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; <i>Clostridium viride</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,5%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; <i>Anaerotruncus</i> ; <i>Anaerotruncus rubiinfantis</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Ruminococcaceae; <i>Faecalibacterium</i> ; <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; <i>Psychrosinus</i> ; <i>Psychrosinus fermentans</i>	0,4%	0,8%	0,0%	0,0%	0,6%
Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; <i>Sporomusa</i> ; <i>Sporomusa sphaeroides</i>	0,2%	0,0%	0,7%	0,0%	0,0%
Fusobacteria; Fusobacteriales; Fusobacteriaceae; <i>Cetobacterium</i> ; <i>Cetobacterium somerae</i>	70,7%	94,6%	87,2%	17,0%	84,1%
Fusobacteria; Fusobacteriales; Fusobacteriaceae; <i>Fusobacterium</i> ; <i>Fusobacterium mortiferum</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Fusobacteria; Fusobacteriales; Fusobacteriaceae; <i>Fusobacterium</i> ; <i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,7%	0,0%	0,0%	2,7%	0,0%
Gemmatimonadetes; Gemmatimonadales; Gemmatimonadaceae; <i>Gemmatirosa kalamazoonesis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

Gemmatimonadetes; Gemmatimonadales; Gemmatimonadaceae; <i>Gemmatimonas phototrophica</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Nitrospirae; Nitrospirales; Nitrospiraceae; <i>Nitrospira</i> ; <i>Nitrospira japonica</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Nitrospirae; Nitrospirales; Nitrospiraceae; <i>Thermodesulfobivrio</i> ; <i>Thermodesulfobivrio yellowstonii</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%
Planctomycetes; Planctomycetales; <i>Gemmata</i> ; <i>Gemmata massiliana</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Planctomycetes; Planctomycetales; Planctomycetaceae; <i>Bythopirellula goksoyri</i>	0,1%	0,1%	0,0%	0,2%	0,0%
Planctomycetes; Planctomycetales; Planctomycetaceae; <i>Planctomyces maris</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%
Planctomycetes; Planctomycetales; Planctomycetaceae; <i>Planctopirus limnophila</i>	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,1%
Planctomycetes; Planctomycetales; Planctomycetaceae; <i>Rubinisphaera brasiliensis</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,4%
Proteobacteria; Bdellovibrionales; Bdellovibrionaceae; <i>Bdellovibrio</i> ; <i>Bdellovibrio exovor</i>	0,1%	0,0%	0,3%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Hydrogenophilaceae; <i>Hydrogenophilus</i> ; <i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; <i>Phreatobacter oligotrophus</i>	0,2%	0,0%	0,3%	0,2%	0,1%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Caulobacteraceae; <i>Brevundimonas</i> ; <i>Brevundimonas naejangsanaensis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; <i>Alsobacter metallidurans</i>	0,2%	0,0%	0,1%	0,0%	0,5%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; <i>Bauldia consociata</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; <i>Nordella</i> ; <i>Nordella oligomobilis</i>	0,7%	0,2%	1,0%	0,3%	1,6%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; <i>Bosea</i> ; <i>Bosea robiniae</i>	0,1%	0,0%	0,4%	0,0%	0,1%

Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; <i>Bradyrhizobium</i> ; <i>Bradyrhizobium vignae</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae; <i>Hyphomicrobium</i> ; <i>Hyphomicrobium methylovorum</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Methylobacteriaceae; <i>Methylobacterium</i> ; <i>Methylobacterium brachythecii</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Methylocystaceae; <i>Methylocystis</i> ; <i>Methylocystis echinoides</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; <i>Mesorhizobium</i> ; <i>Mesorhizobium thioangeticum</i>	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Rhizobiaceae; <i>Rhizobium</i> ; <i>Rhizobium gei</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; <i>Defluviimonas aestuarii</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; <i>Tabrizicola aquatica</i>	0,1%	0,0%	0,3%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae; <i>Gemmobacter</i> ; <i>Gemmobacter tilapiae</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,4%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; <i>Reyranela graminifolia</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae; <i>Acetobacter</i> ; <i>Acetobacter pasteurianus</i>	0,8%	0,0%	0,0%	3,4%	0,0%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae; <i>Acidisphaera</i> ; <i>Acidisphaera rubrifaciens</i>	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae; <i>Gluconobacter</i> ; <i>Gluconobacter oxydans</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%

	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Acetobacteraceae; <i>Roseomonas</i> ; <i>Roseomonas arcticisoli</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae; <i>Dongia soli</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae; <i>Telmatospirillum</i> ; <i>Telmatospirillum siberiense</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Anaplasmataceae; <i>Ehrlichia</i> ; <i>Ehrlichia ewingii</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Rickettsiaceae; <i>Rickettsia</i> ; <i>Rickettsia bellii</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; <i>Sphingomonadaceae</i> ; <i>Parasphingopyxis lamellibrachiae</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%
	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae; <i>Blastomonas</i> ; <i>Blastomonas natatoria</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; <i>Aquabacterium</i> ; <i>Aquabacterium commune</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%
	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; <i>Sphaerotilus</i> ; <i>Sphaerotilus montanus</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; <i>Lautropia</i> ; <i>Lautropia mirabilis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%
	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; <i>Acidovorax</i> ; <i>Acidovorax facilis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; <i>Curvibacter</i> ; <i>Curvibacter delicatus</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,6%	0,0%
	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; <i>Diaphorobacter</i> ; <i>Diaphorobacter polyhydroxybutyrativ</i> <i>orans</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
	Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; <i>Malikia</i> ; <i>Malikia spinosa</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%

Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; <i>Ottowia</i> ; <i>Ottowia shaoguanensis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; <i>Simplicispira</i> ; <i>Simplicispira psychrophila</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,1%	0,3%
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae; <i>Herbaspirillum</i> ; <i>Herbaspirillum autotrophicum</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae; <i>Herbaspirillum</i> ; <i>Herbaspirillum lusitanum</i>	0,5%	0,0%	1,9%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae; <i>Undibacterium</i> ; <i>Undibacterium seohonense</i>	0,2%	0,0%	0,2%	0,5%	0,0%
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Neisseriales; Neisseriaceae; <i>Rivicola pingtungensis</i>	0,7%	0,0%	1,1%	0,4%	1,4%
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Gallionellaceae; <i>Gallionella</i> ; <i>Gallionella capsiferriformans</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Nitrosomonadales; Nitrosomonadaceae; <i>Nitrosospira</i> ; <i>Nitrosospira multiformis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales; <i>Thauera</i> ; <i>Thauera aminoaromatica</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%
Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfarculales; Desulfarculaceae; <i>Desulfarculus</i> ; <i>Desulfarculus baarsii</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%
Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae; <i>Desulfovibrio</i> ; <i>Desulfovibrio simplex</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; <i>Pantoea</i> ; <i>Pantoea gaviniae</i>	0,2%	0,0%	0,7%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; <i>Plesiomonas</i> ; <i>Plesiomonas shigelloides</i>	0,1%	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%

Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriaceae; <i>Escherichia</i> ; <i>Escherichia fergusonii</i>	0,2%	0,2%	0,0%	0,4%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriaceae; <i>Klebsiella</i> ; <i>Klebsiella aerogenes</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriaceae; <i>Klebsiella</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Aeromonadales; Aeromonadaceae; <i>Aeromonas</i> ; <i>Aeromonas caviae</i>	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Chromatiales; Ectothiorhodospiraceae; <i>Thioalbus denitrificans</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Legionellales; Legionellaceae; <i>Legionella</i> ; <i>Legionella pneumophila</i>	0,1%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Legionellales; Legionellaceae; <i>Legionella</i> ; <i>Legionella rubrilucens</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Legionellales; Legionellaceae; <i>Legionella</i> ; <i>Legionella tucsonensis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Methylococcales; Methylococcaceae; <i>Methylosphaera</i> ; <i>Methylosphaera hansonii</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Oceanospirillales; Halomonadaceae; <i>Halomonas</i> ; <i>Halomonas kenyensis</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pasteurellales; Pasteurellaceae; <i>Aggregatibacter</i> ; <i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae; <i>Moraxella osloensis</i>	0,0%	0,1%	0,0%	0,1%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae; <i>Acinetobacter</i> ; <i>Acinetobacter baumannii</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae; <i>Acinetobacter</i> ; <i>Acinetobacter guangdongensis</i>	0,1%	0,0%	0,5%	0,0%	0,0%

Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae; <i>Acinetobacter</i> ; <i>Acinetobacter johnsonii</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae; <i>Acinetobacter</i> ; <i>Acinetobacter lwoffii</i>	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,1%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae; <i>Acinetobacter</i> ; <i>Acinetobacter venetianus</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; <i>Pseudomonas</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; <i>Pseudomonas</i> ; <i>Pseudomonas glareae</i>	0,1%	0,2%	0,0%	0,0%	0,3%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; <i>Pseudomonas</i> ; <i>Pseudomonas knackmussii</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; <i>Pseudomonas</i> ; <i>Pseudomonas rhodesiae</i>	0,1%	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae; <i>Grimontia hollisae</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Verrucomicrobia; Spartobacteria; <i>Terrimicrobium sacchariphilum</i>	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; <i>Akkermansia</i> ; <i>Akkermansia muciniphila</i>	0,4%	0,0%	0,0%	1,7%	0,0%
Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Verrucomicrobiaceae; <i>Luteolibacter</i> ; <i>Luteolibacter flavescens</i>	0,5%	0,0%	0,2%	0,8%	0,8%

CAPÍTULO IV

Sinergismo entre butirato de sódio e *Lippia origanoides* no crescimento, parâmetros hematológicos, saúde intestinal, integridade de órgãos e resposta imunológica em juvenis de tilápia-do-nilo.

Gabriel F.A. Jesus^a; Scheila A. Pereira^a; Marco S. Owatari^a; Bruno C. Silva^b; Nicholas M. Syracuse^a; Gustavo R. Lopes^a; Kenya Addam^a; Lucas Cardoso^a; José L.P. Mouriño^a, Mauricio L. Martins^a.

^aAQUOS - Aquatic Organisms Health Laboratory, Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga 1346. CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

^bEPAGRI - Company of Agricultural Research and Rural Extension of Santa Catarina, Rod. Antônio Heil, 6800. CEP 88318-112, Itajaí, SC, Brazil.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos da suplementação dietética de butirato de sódio e *Lippia origanoides*, de forma combinada ou isolada, sobre os parâmetros de saúde e desempenho zootécnico de juvenis de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*. Um total de 120 peixes (5,38±0,65 g) foram aleatoriamente distribuídos em 12 unidades experimentais e alimentados com diferentes dietas experimentais, durante 30 dias, sendo elas: dieta comercial sem suplementação (C); dieta comercial suplementada com 0,5% de butirato de sódio (B); dieta comercial suplementada com 0,125% de *L. origanoides* (L) e dieta comercial suplementada com mistura de 0,5% de butirato de sódio e 0,125% de *L. origanoides* (BL). Após o preparado das dietas experimentais, verificou-se incremento no pH da dieta B, quando comparada as demais. Após 30 dias de suplementação, houve redução na concentração de bactérias heterotróficas totais no intestino dos animais do grupo BO, em relação ao grupo L, além do aumento de bactérias ácido-láticas no grupo B, quando comparado aos demais grupos. Observou-se aumento significativo no número de eritrócitos totais no grupo CO em relação aos grupos C e BL, além da redução da hemoglobina corpuscular média, quando comparada ao controle. Os animais do grupo BL apresentaram aumento no número de vilos intestinais em relação ao grupo controle. Para a região posterior,

verificou-se aumento do perímetro dos vilos no grupo L, quando comparado aos demais grupos. Foi observado no grupo BL a redução de infiltrados linfocitários no fígado, quando comparado ao grupo controle; enquanto que o grupo B apresentou aumento de macroesteatose no fígado e diminuição de melanomacrófagos soltos no baço, quando comparado ao grupo controle. Dessa forma, a ação sinérgica do butirato de sódio e o óleo essencial de *L. origanoides* apresentou efeitos positivos na microbiota intestinal, na estrutura intestinal, na integridade do fígado e baço, sugerindo uma maior eficiência dos compostos quando utilizados conjuntamente na nutrição de juvenis de tilápia-do-nilo.

Palavras-chaves: Sais orgânicos, óleos essenciais, microbiota intestinal, imunologia, saúde animal.

Introdução

Na tentativa de combate a bacterioses na aquicultura, a utilização em demasia de compostos sintéticos, como os antibióticos, pode acarretar na seleção de patógenos resistentes, agravar o problema, aumentar as perdas econômicas dos produtores, além da possível acumulação desses compostos no ambiente aquático e até mesmo na carne do animal produzido, o qual será destinado ao consumo humano (Defoirdt et al., 2011). Neste contexto, em busca de potenciais ferramentas capazes de substituir a utilização de antibióticos na produção animal, diversos aditivos alimentares vêm ganhando espaço no mercado aquícola, destacando-se os ácidos/sais orgânicos e óleos essenciais.

Na aquicultura, diversos estudos relataram efeitos positivos da suplementação de ácidos/sais orgânicos (Ng e Koh, 2017), assim como de óleos essenciais (da Cunha et al., 2018; Bajpai et al., 2013; Bajpai et al., 2008), na nutrição e saúde de peixes. Porém, ainda existe uma grande lacuna de informações que elucidem os reais efeitos desses compostos quando utilizados conjuntamente. A suplementação de ácidos orgânicos e/ou seus sais, em especial o butirato, podem promover aumento na disponibilidade de vários aminoácidos essenciais e derivados de nucleotídeos, além de fornecer energia ao tecido epitelial e células entéricas (Robles et al., 2013). Dessa forma, auxiliam na melhor absorção dos nutrientes, melhorando o desempenho zootécnico e saúde intestinal. Já os óleos essenciais agem nas membranas biológicas de bactérias, causando mudanças em sua composição lipídica e fluidez. Tais efeitos podem acarretar na inibição do crescimento de bactérias; degradação da membrana plasmática e proteínas de membrana; redução da força motriz de prótons e da síntese de ATP; aumento da hidrólise e

permeabilidade da membrana aos prótons (efeito o qual pode ser potencializado pela utilização dos ácidos orgânicos); consequentemente redução do pH interno da bactérias e morte microbiana (Cunha et al., 2018; Bajpai et al., 2013; Bajpai et al., 2008). Portanto, ao associar os diferentes aditivos, óleo essencial e ácido/sal orgânico, pode-se promover a melhora da saúde intestinal, uma vez que o efeito antibacteriano no trato intestinal pode ser potencializado. Além disso, possibilita-se a redução na quantidade de ácido orgânico a ser adicionado nas dietas, o que além de proporcionar efeitos benéficos à saúde dos animais, ainda traz uma maior viabilidade econômica para a indústria.

Em estudo recente com frangos, Yang et al. (2018) verificaram que a suplementação de 0,03% de uma mistura de ácidos orgânicos e óleo essencial (ácido sórbico, ácido fumárico e timol) promoveu melhor eficiência durante a fase de crescimento, possivelmente por melhorar a morfologia intestinal e aumentar as atividades enzimáticas digestivas dos animais. Com camarão branco do pacífico, *Litopenaeus vannamei*, He et al. (2017) verificaram que a suplementação de uma mistura de ácidos orgânicos e óleos essenciais (25% ácido cítrico, 16,7% ácido sórbico, 1,7% timol e 1,0% vanilina), durante oito semanas, beneficiaram a microbiota intestinal, melhoram a resposta imunológica e resistência ao *Vibrio parahaemolyticus*.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da suplementação dietética de butirato de sódio e *Lippia organoides*, de forma combinada ou isolada, sobre os parâmetros de saúde e desempenho zootécnico de juvenis de tilápia-do-nylo *Oreochromis niloticus*.

Material e Métodos

Extração e análise da composição do óleo essencial

O óleo essencial utilizado no estudo foi obtido a partir de folhas de *Lippia organoides*, popularmente conhecida como “Salva de Marajó”, cultivada na Seção de Plantas Medicinais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). A extração do óleo foi feita pelo método de hidrodestilação, com aparelho de Clevenger modificado. Um total de 500 g de folhas frescas de *L. organoides* foi colocado em um frasco com volume de 1200 mL, adicionou-se água até cobrir o material por completo. Em seguida, a manta aquecedora foi ativada. Após 2 h de extração, o óleo essencial foi coletado, acondicionado em frascos de vidro âmbar e estocado a -18 °C. Para a análise de composição química do extrato, utilizou-se cromatógrafo a

gás Agilent 7890A (Palo Alto, EUA), equipado com coluna capilar HP-5 de 5%-difênil-95%-dimetil silicone (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm). A temperatura foi programada de 60 a 240 °C, a 3 °C por minuto, utilizando hidrogênio como gás carreador (1,5 mL min⁻¹). Uma solução contendo 1% de óleo essencial em diclorometano (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) com divisão de fluxo (1:100, injetor a 250 °C) foi injetada. O espectro de massas foi operado pelo sistema Agilent 5973N em modo de impacto de elétrons a 70 eV e acoplado a cromatógrafo Agilent 6890, utilizando os mesmos procedimentos de injeção e temperatura anteriormente descritos. Os índices de retenção foram calculados a partir dos tempos de retenção dos compostos e de uma série de n-alcenos (C7-C26). A identificação dos componentes foi feita por comparação do espectro de massa obtido com os dados de uma biblioteca espectral (McLafferty e Stauffer, 1994) e pelos índices de retenção calculados e comparados com valores já publicados (Adams, 2007).

Preparo das Dietas Experimentais

Foi utilizada ração comercial (Supra®, Brasil) com 1,7 mm durante todo o período experimental, apresentando a seguinte composição: Umidade (máx):120 g kg⁻¹ (12%); Proteína bruta (mín): 460 g kg⁻¹ (46%); Extrato etéreo (mín) :80 g kg⁻¹ (8%) e Matéria fibrosa (máx):40 g kg⁻¹ (4%).

A inclusão do óleo essencial nas dietas seguiu as instruções de Dairiki et al. (2013), onde o óleo essencial e o butirato de sódio comercial (Butirex C4 54% pureza, Novation, Espanha) foram diluídos em álcool de cereais e aspergidos nas dietas na concentração de 100 mL kg⁻¹ de ração. Todas as rações foram aspergidas com suas respectivas concentrações na proporção de 100 mL kg⁻¹ de ração, inclusive o grupo controle, o qual apenas recebeu a adição de álcool de cereais. As dietas experimentais foram secas por 24 h à 25 °C e posteriormente armazenadas a -18 °C até o momento do fornecimento aos animais

As dietas experimentais utilizadas foram:

- a) Dieta comercial sem suplementação, Controle (C);
- b) Dieta comercial suplementada com butirato de sódio protegido com solução tampão na concentração de 0,5% (B) (Jesus et al. 2019);
- c) Dieta comercial suplementada com óleo essencial de *L. origanoides* na concentração de 0,125% (L);
- d) Dieta comercial suplementada com mistura de butirato de sódio protegido com solução tampão e óleo essencial de *L. origanoides*

nas concentrações de 0,5% e 0,125%, respectivamente (BL) (Brum et al., 2018; Antache et al. 2014; Talpur et al., 2013).

e)

Delineamento experimental

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas e procedimentos de manutenção de animais da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC – nº 5427100816). Foram utilizados 120 juvenis de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*, com peso médio $1,10 \pm 0,04$ g, provenientes da Piscicultura Pomerode, localizada na Mesorregião do Vale do Itajaí, Santa Catarina (SC). Os peixes foram aclimatados durante sete dias, alimentados até a saciedade aparente com a dieta comercial (controle), citada anteriormente.

Após a aclimação e biometria inicial, os peixes ($5,38 \pm 0,65$ g), foram aleatoriamente distribuídos em 12 unidades experimentais (UE) circulares de 27 L, com sistema de aeração e aquecimento controlados, totalizando 10 peixes por UE.. As unidades estavam acopladas a um sistema de recirculação com filtragem mecânica, biológica e ultravioleta (Owatari et al., 2018). O fotoperíodo durante o experimento foi controlado (12 h claro :12 h escuro).

Após o período de aclimação, os animais receberam as dietas experimentais específicas (C, B, CO ou BO) durante 30 dias. As alimentações foram ofertadas quatro vezes ao dia, na quantidade recomendada pelo fabricante para a fase de cultivo, sendo adaptada ao longo do experimento de acordo com consumo diário dos animais. Para essa avaliação, as sobras eram verificadas após 1 h do fornecimento da dieta. Caso não houvessem sobras no dia, era aumentado 10% da quantidade total da ração a ser fornecida no dia seguinte e, caso houvessem sobras em pelo menos três refeições, a oferta era reduzida em 10%.

Os parâmetros de qualidade da água mantiveram-se dentro do padrão de conforto para a espécie, sendo eles: oxigênio dissolvido $6,04 \pm 0,01$ mg.L⁻¹; pH $6,84 \pm 0,37$; temperatura $27,92 \pm 1,12$ °C; amônia total $0,23 \pm 0,06$ mg.L⁻¹; nitrito $0,24 \pm 0,04$ mg.L⁻¹ e alcalinidade $29,47 \pm 6,17$ mg CaCO₃ L⁻¹. Todos os parâmetros foram monitorados diariamente no período da manhã com o uso de sonda multiparâmetro (modelo HI 9828 – Hanna Instruments) e kit colorimétrico (Labcon Test).

Análises do pH das dietas

Para mensurar o pH das diferentes dietas, uma alíquota de 0,5 g de cada uma das dietas foi macerada, diluída em 4,5 mL de água

deionizada e o PH foi mensurado, utilizando-se o pHmetro de bancada (AT 350, Alfakit Ltda, Florianópolis, Brasil), de acordo com Ng et al. (2009).

Análise do pH do tratogastrointestinal

Após o período de suplementação de 30 dias, três peixes por UE foram mantidos em jejum por 16 h, posteriormente anestesiados, sendo coletado assepticamente o conteúdo estomacal e as diferentes porções intestinais (anterior, média, posterior). Seguindo o protocolo de Chang et al. (2006), uma amostra de 0,5 g da porção anterior, média e posterior do intestino foram adicionados diretamente em 4,5 mL de água deionizada e rapidamente seus respectivos pHs foram mensurados, em triplicata, usando um phmetro de bancada (AT 350, Alfakit Ltda, Florianópolis, Brasil).

Desempenho zootécnico

Após os 30 dias do período experimental, foram determinadas as taxas de sobrevivência (S), ganho em peso médio (g), conversão alimentar (C.A) e ganho em biomassa (G.B.), através das seguintes fórmulas:

$$S (\%) = \left[\frac{\text{população inicial} - \text{população final}}{\text{população inicial}} \right] \times 100$$

$$G.P.M (g) = \text{peso final} - \text{peso inicial}$$

$$C.A = \frac{\text{ração ofertada}}{\text{ganho de peso}}$$

$$GB = \text{Biomassa final} - \text{biomassa inicial}$$

Análise da microbiota intestinal

Amostras do trato intestinal de quatro animais por unidade experimental foram coletadas para contagem bacteriológica intestinal dos diferentes grupos. Porções iguais do trato intestinal dos animais da mesma UE foram maceradas juntas, formando um “pool”, em gral de porcelana com 1 mL de solução salina estéril 0,65%. Posteriormente, as amostras foram diluídas serialmente quatro vezes, em tubos de ensaio, em fator 1:10. As diluições de 10^{-1} a 10^{-4} foram semeadas em placas de

Petri, contendo os seguintes meios de cultura: Man Rogosa Sharpe Agar (MRS) para bactérias produtoras de ácido-lático; Ágar Triptona de Soja (TSA) para bactérias heterotróficas totais; Ágar Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose (TCBS) para o crescimento de vibrionáceas e Ágar Cetrimid para crescimento de *Pseudomonas* sp. As placas de MRS foram incubadas a 35°C por 48 h e as demais a 30°C por 24 h.

Análises Hematológicas

Amostras de sangue foram coletadas ao final do experimento, onde cinco peixes de cada UE foram amostrados, totalizando 15 peixes por tratamento. Os peixes foram anestesiados em solução de Eugenol[®] (75 mg L⁻¹) e o sangue coletado por punção do vaso caudal, em seringas de 3 mL contendo EDTA 10% (ácido etilenodiamino tetraacético) como anticoagulante.

A concentração de glicose plasmática foi determinada de forma individual, imediatamente após a coleta de sangue, com glicosímetro portátil Accu-Chek[®] Advantage (Roche Diagnóstica, Brasil). Uma alíquota do sangue foi utilizada para determinação do hematócrito pelo método do micro-hematócrito (Goldenfarb et al., 1971). Outra alíquota de sangue (5 µL) foi destinada à contagem total de eritrócitos em câmara de Neubauer, após diluição (1:200) em fluido de Dacie modificado de acordo com Blaxhall e Daisley (1973). A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina e as equações hematimétricas foram aplicadas para determinar o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Ranzani-Paiva et al., 2013).

Análise Imunológicas

O sangue de cinco animais por unidade experimental foi coletado por punção do vaso caudal, em seringas de 3 mL contendo EDTA 10% para a obtenção do plasma sanguíneo. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 1400 g por 10 min para separação do plasma, o qual foi coletado e armazenado a -20 °C para posterior realização das análises imunológicas.

A concentração de proteína total plasmática foi mensurada com o kit Proteína Total (Lab Test[®]) utilizando-se albumina bovina para confecção da curva padrão. A concentração de imunoglobulina total foi medida de acordo com o método descrito por Amar et al. (2000), onde misturou-se 100 µL do plasma com 100 µL de solução de polietilenoglicol 12% (PEG) (Sigma-Aldrich), para posterior incubação à temperatura ambiente, durante duas horas, a fim de precipitar as

moléculas de imunoglobulina. O precipitado foi removido por centrifugação a 5000 g a 6° C por 10 min. Após remoção do sobrenadante, mensurou-se a quantidade de proteína total com auxílio do kit Proteína Total (Lab Test®). A concentração de imunoglobulina total está expressa em mg mL⁻¹, sendo calculada pela fórmula:

Imunoglobulina total = (proteína total do plasma - proteína total tratada com PEG) / Volume (mL)

O título da atividade aglutinante do plasma foi realizado em microplaca de 96 poços de fundo U, onde o plasma diluído na proporção de 1:3 em solução tampão fosfato salino (PBS) no 1° poço (50 µL de plasma: 100 µL de solução PBS), foi diluído serialmente em fator 1:2 para os demais poços. Depois disso, foram adicionados 50 µL de bactéria inativada *Streptococcus agalactiae* (GRS 2035) na concentração de 5x10⁸ UFC mL⁻¹ em todos os poços. A microplaca foi incubada a 25°C durante 18 h em câmara úmida. A aglutinação foi confirmada com a observação a olho nu de um *bottom* no fundo do poço. O título aglutinante foi considerado recíproco a última diluição que apresentou aglutinação (Silva et al. 2009).

O título antimicrobiano do plasma foi realizado contra *S. agalactiae*, em microplaca de 96 poços com fundo chato, segundo metodologia utilizada por Silva et al. (2009). O inóculo da *S. agalactiae* foi cultivado em BHI a 28 °C por 24 h, preparado em meio de cultura Poor broth (PB) na concentração de 1x10⁵ UFC mL⁻¹. O plasma foi diluído na proporção de 1:3 em PB no 1° poço (50 µL de plasma: 100 µL de solução PB), e diluído serialmente em fator 1:2 para os demais poços. Para controle positivo e o branco, solução salina foi diluída em PB, da mesma forma que o plasma. Finalmente, 20 µL da *S. agalactiae* foram adicionados aos poços com plasma diluído e do controle positivo. As microplacas foram incubadas a 28 °C por 24 h. O crescimento do microrganismo determinado em leitora de microplaca, no comprimento de onda de 550 nm. O título antimicrobiano do plasma foi recíproco a última diluição que apresentou atividade bactericida, ou seja, onde houve inibição total do crescimento microbiano.

Análises Histológicas

Ao final do período experimental foram coletados fígado, baço e uma porção do intestino (anterior e posterior) de quatro peixes por UE para realização das análises histológicas e histoformétricas. Os órgãos foram fixados em formalina tamponada 10%. Após 24 h de fixação, as amostras foram desidratadas serialmente em álcool etílico e preparadas para as técnicas histológicas de rotina, com a inclusão de parafina a

60°C. Cortes de 4 µm de espessura (micrótomo PAT- MR10), foram corados com hematoxilina de Harris e eosina (HHE). Posteriormente à coloração, as lâminas foram montadas em meio Entellan® e analisadas em microscópio de contraste de interferência de fase (DIC) Axio Imager A.2 (Zeiss, Gottingen, Alemanha).

Com relação à morfologia intestinal, foram medidos o comprimento, largura e perímetro das vilosidades intestinais, além das contagens das células caliciformes por vilos, com o auxílio do software Zen Pro. Foi atribuído para todos os órgãos valores às alterações histológicas, conforme o grau de intensidade: 0 (ausência de alteração), 1 (alteração leve, correspondendo a menos de 25% da área do órgão), 2 (alteração moderada, 25% a 50% da área do órgão) e 3 (alteração severa, mais de 50% da área do órgão), de acordo com o método descrito por Schwaiger et al. (1997), adaptado por Brum et al. (2017).

No baço, foram avaliados as seguintes alterações: congestão, infiltrado eosinofílico e linfocitário, integridade das polpas brancas e vermelhas, centros de melanomacrófagos, melanomacrófagos isolados e congestão. No intestino, infiltrado eosinofílico, linfocitário e necrose. Em relação ao fígado, considerou-se como alterações a congestão nos grandes vasos, nos sinusoides e no pâncreas, dilatação dos sinusoides, hipertrofia dos hepatócitos, infiltrado eosinofílico e linfocitário, macroesteatose, microesteatose e necrose.

Análise Estatística

Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene para verificar a normalidade e homocedasticidade, respectivamente. Posteriormente, foi realizada análise de variância unifatorial (ANOVA), que quando significativa, os dados foram submetidos ao teste de Tukey para separação de médias. Todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%. Os dados de contagem bacteriológica, título aglutinante e antimicrobiano foram transformados em logaritmo na base 10. Os dados foram expressos em média ± desvio padrão.

Resultados

Composição do óleo essencial

Foi verificado que a composição química do óleo essencial é composta principalmente por 49,7% de carvacrol, 13,3% de p-cimeno, 9,9% de timol e 4,5% de Y-terpineno (Tabela 1).

Tabela 4: Composição química do óleo essencial de *Lippia origanoides* após processo de extração

Componentes	%	IR
(E) -2-hexenal	0,5	853
α -thujene	1,2	928
α -pineno	0,5	936
1-octen-3-ol	0,6	977
Mirceno	2,4	989
α -terpineno	1,1	1016
p-cimeno	13,3	1025
1,8-cineole	0,9	1032
γ -terpinene	4,5	1059
Linalool	2,8	1096
Ipsdienol	0,4	1144
Umbelulone	1,1	1175
Éter metil timol	0,9	1232
Timol	9,9	1288
Carvacrol	49,7	1298
Acetato de carvacrol	0,4	1369
(E) - β -cariofileno	1,5	1414
Óxido de cariofileno	1,0	1576
Total	92,7	-

*Índice de Retenção

Análise do pH da Dieta

As dietas B e BL apresentaram aumento significativo dos pHs, $5,77 \pm 0,00$ e $5,67 \pm 0,02$ respectivamente, em comparação com as dietas C ($5,45 \pm 0,02$) e L ($5,44 \pm 0,01$) (Figura 1).

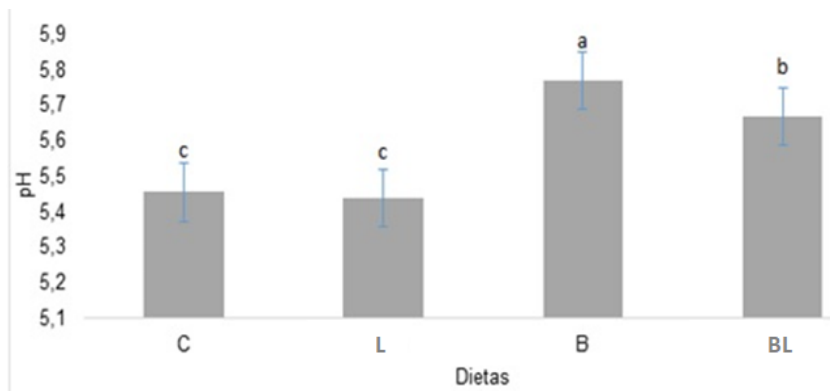


Figura 1: Valores do pH das dietas C: controle; B: suplementada com 0,5% butirato de sódio; L: suplementada com 0,125% de óleo essencial de *Lippia origanoides* e BL: suplementada com 0,5% butirato de sódio e 0,125% óleo essencial.

*Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Análise do pH do Trato Intestinal

Não foram verificadas diferenças significativas no pH entre os grupos para as diferentes porções do trato intestinal e conteúdo estomacal.

Tabela 5: Análise do pH (média \pm desvio padrão) do conteúdo estomacal, intestino anterior, médio e posterior do trato intestinal de tilápias-do-nilo *O. niloticus* alimentadas, durante 30 dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia organoides* (L), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial de *L. organoides* (BL).

Grupos	Conteúdo estomacal	Intestino anterior	Intestino médio	Intestino posterior	Valor-p
C	5,44 \pm 0,35	6,54 \pm 0,37	6,91 \pm 0,1	7,28 \pm 0,30	0,762
L	5,19 \pm 0,81	6,30 \pm 0,03	6,83 \pm 0,2	6,83 \pm 0,35	0,433
B	5,49 \pm 0,33	6,32 \pm 0,04	6,77 \pm 0,1	6,92 \pm 0,28	0,802
BL	5,59 \pm 0,15	6,40 \pm 0,05	6,83 \pm 0,0	6,79 \pm 0,31	0,184

Desempenho zootécnico

Após 30 dias de suplementação dietética de butirato de sódio e/ou *L. organoides*, não foram verificadas diferenças significativas nos parâmetros zootécnico (Tabela 3).

Tabela 6: Parâmetros zootécnicos (media \pm desvio padrão) de juvenis de tilápia-do-nylo *Oreochomis niloticus* alimentados, durante 30 dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia organoides* (L), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial de *Lippia organoides* (BL).

Parâmetros	C	L	B	BL	Valor p
Sobrevivência (%)	80,0 \pm 17,0	96,7 \pm 0,11	90 \pm 0,11	83,3 \pm 0,0	0,31
Ganho em Peso (g)	6,28 \pm 2,2	11,3 \pm 1,92	10,4 \pm 1,9	9,5 \pm 3,0	0,11
Biomassa Final (g)	60,9 \pm 32,2	120,1 \pm 14,77	102,8 \pm 17,33	87,2 \pm 20,4	0,06
Conversão Alimentar	0,64 \pm 0,16	0,62 \pm 0,04	0,66 \pm 0,06	0,6 \pm 0,03	0,87

Análises Microbiológicas

As concentrações de bactérias heterotróficas totais foram significativamente menores nos intestinos dos animais do grupo BL, quando comparados ao grupo L (Figura 2). A suplementação de butirato de sódio (B) promoveu aumento nas concentrações de bactérias ácido-láticas totais em relação aos demais grupos ($p=0,0032$) (Figura 2).

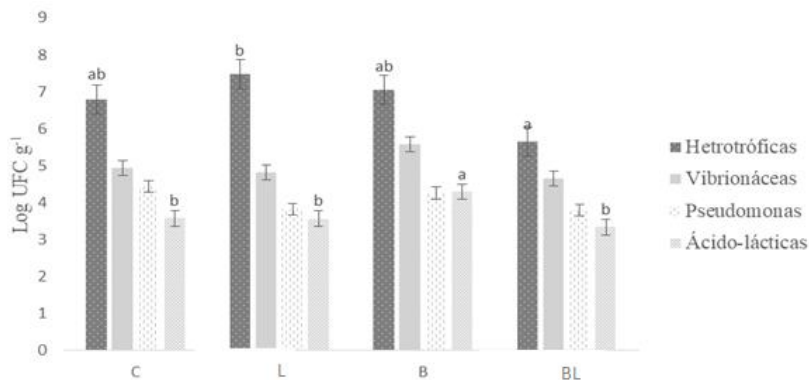


Figura 2: Contagem de bactérias (Log₁₀) por grama do trato intestinal de tilápias-do-nilo *O. niloticus* alimentadas, durante 30 dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia organoides* (L), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial de *L. organoides* (BL). Dados são apresentados em média ± desvio padrão

Parâmetros Hematológicos

Após os 30 dias de suplementação foi possível observar aumento significativa no número de eritrócitos no grupo L em relação aos grupos C e BL, além da redução da hemoglobina corpuscular média quando comparado ao C (Tabela 4).

Tabela 7: Parâmetros hematológicos (média \pm desvio padrão) de tilápias-do-nylo *Oreochromis niloticus* alimentadas, durante 30 dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia origanoides* (L), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial de *L. origanoides* (BL).

Parâmetros	C	L	B	BL	Valor p
Eritrócito (x 10 ⁶ μ L ⁻¹)	1,6 \pm 0,3 ^b	2,3 \pm 12,9 ^a	1,8 \pm 0,2 ^{ab}	1,4 \pm 0,7 ^b	0,007
Hematócrito (%)	23,0 \pm 9,3	28,1 \pm 3,9	25,9 \pm 5,3	24,6 \pm 0,3	0,739
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	8,7 \pm 2,3	7,8 \pm 1,5	7,7 \pm 0,8	5,2 \pm 0,4	0,093
Glicose (g dL ⁻¹)	50,8 \pm 8,9	62,0 \pm 2,0	57,5 \pm 15,2	65,3 \pm 4,6	0,310
VCM (fL)	136,2 \pm 4,43	119,9 \pm 18	144,8 \pm 26,6	166,9 \pm 3,3	0,316
CHCM (g dL ⁻¹)	44,3 \pm 24,45	27,7 \pm 1,8	30,1 \pm 3,2	21,3 \pm 1,9	0,182
HCM (pg)	52,7 \pm 12,0 ^a	33,4 \pm 6,8 ^b	43,0 \pm 4,3 ^{ab}	35,6 \pm 2,5 ^{ab}	0,046

Parâmetros imunológicos

Os parâmetros imunológicos analisados não foram afetados pela suplementação de butirato de sódio e/ou *L. origanoides* (Figura 3A e B).

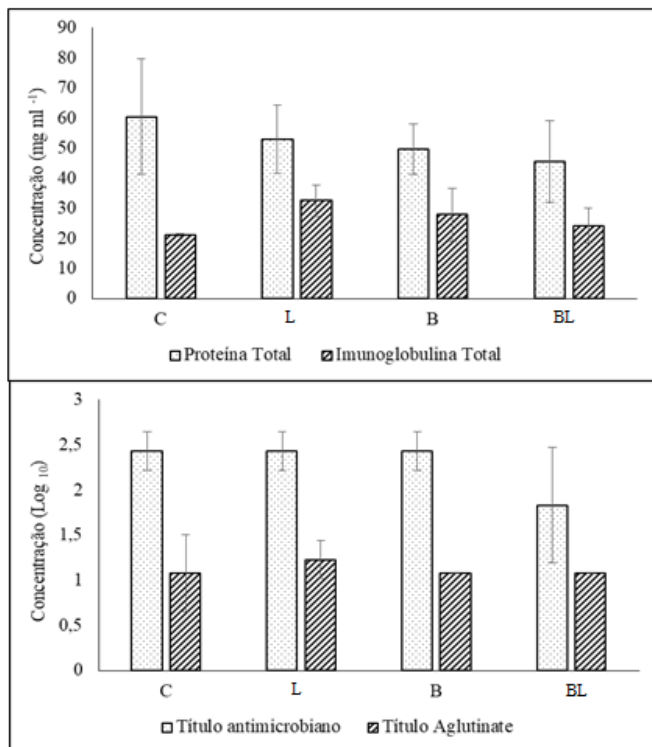


Figura 3: Parâmetros imunológicos de tilápias-do-nylo *Oreochromis niloticus* alimentadas, durante 30 dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia origanoides* (L), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial (BL). **A-** representa a concentração de proteína total plasmática (mg mL⁻¹) e a concentração de imunoglobulina total (mg mL⁻¹), . **B-** título antimicrobiano do plasma contra *Streptococcus agalactiae* e título aglutinação do plasma contra *Streptococcus agalactiae*.

Análises Histológicas

Os animais do grupo BL apresentaram aumento do número de vilos intestinais em comparação ao grupo controle (Tabela 5). Já para a região posterior, o grupo L promoveu aumento do perímetro dos vilos quando comparado com os demais grupos (Tabela 5).

Tabela 8: Histomorfometria intestinal anterior e posterior de juvenis de tilápias-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentadas, durante 30 dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia origanoides* (L), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial (BL). Dados são apresentados em média \pm desvio padrão.

Parâmetros	C	L	B	BL	Valor p
Região Anterior					
Nº de vilos	14,39 \pm 03,58 ^b	16,67 \pm 01,53 ^{ab}	17,78 \pm 27,39 ^{ab}	25,78 \pm 05,18 ^a	0,02
Comprimento (μ m)	147,45 \pm 55,43	114,27 \pm 16,89	145,46 \pm 27,39	96,83 \pm 61,53	0,25
Largura (μ m)	63,86 \pm 8,53	79,33 \pm 11,06	144,02 \pm 133,27	59,97 \pm 16,35	0,43
Células Caliciformes	106,17 \pm 56,1	99,00 \pm 12,53	140,97 \pm 20,38	84,33 \pm 01,15	0,21
Perímetro total (μ m)	12035 \pm 111613	12690 \pm 1436,24	10514 \pm 1937,37	10294 \pm 197,67	0,15
Região Posterior					
Nº de vilos	15,83 \pm 02,93	18,33 \pm 02,08	20,44 \pm 07,13	26,00 \pm 0	0,06
Comprimento(μ m)	130,85 \pm 34,46	120,00 \pm 15,72	115,94 \pm 10,04	99,43 \pm 4,23	0,33
Largura(μ m)	75,82 \pm 8,80	86,67 \pm 09,71	71,22 \pm 06,92	88,04 \pm 40,50	0,07
Células Caliciformes	102,33 \pm 23,76	99,67 \pm 13,58	71,22 \pm 51,11	116,50 \pm 40,50	0,49
Perímetro Total (μ m)	11185 \pm 111613 ^b	19000 \pm 1436,2 ^a	6593 \pm 1937,3 ^b	8861 \pm 197,67 ^b	0,01

*Diferentes letras na linha indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (p<0,05).

As análises de integridade do fígado demonstraram que grupo BL acarretou na diminuição de infiltrados linfocitários em comparação ao grupo C (Tabela 6). Além disso, a suplementação apenas de butirato de sódio (B) proporcionou aumento da macroesteatose no fígado (Tabela 6) e diminuição de melanomacrófagos soltos no baço, quando comparado ao grupo controle (Tabela 7).

Tabela 9: Intensidade de alteração histológica no fígado de juvenis de tilápia-do-nilo *O. niloticus* sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia origanoides* (CO), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial (BO) por 30 dias. Dados são apresentados em média \pm desvio padrão.

Alterações	C	B	CO	BO	Valor p
Aspecto cordonal	1,44 \pm 0,51	0,89 \pm 0,19	1,00 \pm 0,00	0,83 \pm 0,17	0,105
Congestão dos grandes vasos	1,78 \pm 0,38	1,89 \pm 0,51	1,67 \pm 0,33	1,33 \pm 0,33	0,404
Congestão no pâncreas	1,25 \pm 1,09	0,31 \pm 0,30	0,67 \pm 0,33	0,33 \pm 0,00	0,252
Congestão nos sinusóides	2,17 \pm 0,29	1,67 \pm 0,58	1,44 \pm 0,51	1,17 \pm 0,17	0,091
Dilatação dos sinusóides	1,81 \pm 0,64	1,02 \pm 0,37	1,00 \pm 0,33	0,67 \pm 0,33	0,062
Hipertrofia dos hepatócitos	1,44 \pm 1,26	0,71 \pm 0,08	0,67 \pm 0,33	0,50 \pm 0,17	0,365
Infiltrado eosinofílico	0,44 \pm 0,77	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,441
Infiltrado linfocitário	1,44 \pm 0,92 ^a	1,00 \pm 0,00 ^{ab}	0,22 \pm 0,19 ^{ab}	0,17 \pm 0,17 ^b	0,029
Macrosteatose	0,00 \pm 0,00 ^b	0,53 \pm 0,18 ^a	0,11 \pm 0,19 ^b	0,00 \pm 0,00 ^b	0,002
Microsteatose	1,03 \pm 1,06	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,107
Necrose	0,42 \pm 0,52	0,18 \pm 0,17	0,22 \pm 0,19	0,17 \pm 0,17	0,726
Uniformidade no tamanho das células	0,44 \pm 0,51	0,00 \pm 0,00	0,22 \pm 0,19	0,17 \pm 0,17	0,355
Pâncreas com ácinos íntegros	0,67 \pm 0,58	0,00 \pm 0,00	0,11 \pm 0,19	0,17 \pm 0,17	0,122

*Diferentes letras na linha indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Tabela 10: Intensidade de alteração histológica no baço de juvenis de tilápias-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentadas, durante 30 dias, com dieta sem suplementação (C), suplementadas com óleo essencial de *Lippia origanoides* (CO), suplementadas com butirato de sódio (B) e suplementadas com mistura de butirato de sódio e óleo essencial (BO). Dados são apresentados em média \pm desvio padrão.

Alterações	C	B	CO	BO	Valor p
Centros de melanomacrófagos	1,56 \pm 0,51	2,00 \pm 0,00	1,33 \pm 0,33	1,17 \pm 0,17	0,053
Congestão	0,51 \pm 0,89	0,19 \pm 2,00	0,19 \pm 1,56	0,17 \pm 1,17	0,223
Infiltrado eosinofílico	0,11 \pm 0,19	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,441
Infiltrado linfocitário	0,19 \pm 0,33	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,525
Melanomacrófagos soltos	1,44 \pm 0,51 ^b	0,11 \pm 0,19 ^a	1,11 \pm 0,19 ^b	0,83 \pm 0,00 ^{ab}	0,003

*Diferentes letras na linha indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Discussão

Os efeitos benéficos da utilização de sais orgânicos e óleos essenciais na aquicultura já foram demonstrados através de uma série de estudos, contudo existe ainda uma grande lacuna de informações sobre a eficiência e os efeitos da utilização de sais orgânicos em conjunto aos óleos essenciais em organismos aquáticos.

O óleo essencial de *L. organoides* utilizado no presente estudo, apresentou em sua composição química uma maior quantidade de terpenóides (49,7% carvacrol; 9,9% timol), compostos importantes para a aquicultura, os quais apresentam atividade antibacteriana, mediado pelo seu grupo funcional, o qual atua na membrana das bactérias, alterando sua permeabilidade e fluidez, assim como afetando proteínas de membrana e enzimas periplasmáticas (da Cunha et al., 2018).

A dieta suplementada com butirato de sódio apresentou o maior valor de pH, uma vez que o butirato de sódio é um sal, estando protegido por uma solução tampão (*buffer*), a qual apresenta o pH elevado, sendo esse o possível motivo da elevação do pH da dieta do grupo B e BL. Agora, a diminuição do pH da dieta BL em relação a B, está possivelmente na composição do óleo essencial, os quais são constituídos por uma vasta mistura de substâncias voláteis, em geral lipofílicas, cujos componentes incluem álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, hidrocarbonetos, epóxidos terpênicos, em diferentes concentrações. Tal diversidade de compostos pode causar alterações no pH do meio, como uma pequena redução (Hood et al., 2004). Contudo, mesmo existindo essa variação no pH das dietas, não houve alterações no pH do conteúdo estomacal e no trato intestinal dos animais.

Para as alterações de microbiota intestinal, no presente estudo, foi verificado a redução de bactérias heterotróficas totais no grupo BL em relação ao Controle, o que possivelmente pode ter ocorrido pela ação sinérgica do efeito de permeabilização de membranas causado pelo óleo essencial, potencializando o efeito antibacteriano do butirato. Segundo alguns autores, em frangos, o efeito sinérgico entre os ácidos/ sais orgânicos e óleos essenciais pode estar relacionado a três hipóteses: (a) o dano causado pelos óleos essenciais às membranas das bactérias as tornaria mais suscetíveis ao ambiente ácido ou a ação dos ácidos/sais orgânicos, facilitando sua entrada na célula; (b) em pH mais baixos a hidrofobicidade e/ou atividade antibacteriana do óleos essenciais aumenta, pois dissolvem-se mais facilmente nos lipídeos da membrana celular da bactéria alvo; e por fim (c) os ácidos orgânicos atuam mais

ativamente na alimentação e moela, enquanto os óleos essenciais atuam mais nos segmentos inferiores do trato intestinal (Basmacioğlu-Malayoğlu et al., 2016; Karatzas et al., 2001; Langhout, 2000; Helander et al., 1998). Contudo, para a hipótese (c), no presente trabalho, a utilização de uma forma protegida de butirato foi escolhida a fim de garantir a liberação do composto ativo ao longo de todo o trato intestinal do animal, evitando a sua absorção nas primeiras porções do intestino (Jesus et al., 2019). Além desse resultado, foi verificado o aumento na contagem de bactérias ácido-láticas no grupo B, quando comparado aos demais grupos. Tal efeito pode estar relacionado a capacidade do butirato de sódio em alterar a microbiota endógena, inibindo diversas bactérias patogênicas e favorecendo, principalmente, o crescimento de bactérias benéficas, como as ácido-láticas (Jesus et al., 2019; Silva et al., 2013; Dibner e Buttin, 2002). Elala e Ragaa (2015), afirmam que o aumento da concentração de bactérias ácido-láticas é capaz de incrementar as respostas humorais e a imunidade celular não-específica do animal, demonstrando assim um efeito probiótico indireto causada pela suplementação do butirato de sódio. Por outro lado, He et al. 2017 observaram que ao suplementarem o camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* com uma mistura de ácidos orgânicos e óleos essenciais (25% ácido cítrico, 16,7% ácido sórbico, 1,7% timol e 1,0% vanilina), durante oito semanas, houve aumento das bactérias do filo Firmicutes, principalmente *Lactobacillus* no grupo suplementado na concentração de 1,2% e redução da abundância de Proteobacteria, no intestino dos camarões. Tal aumento no número de *Lactobacillus* observado pelos autores, não foi verificado no grupo BL no presente estudo, talvez por ter utilizado técnicas microbiológicas clássicas, menos sensíveis quando comparada a técnica molecular utilizada pelos autores.

Ainda pouco se conhece sobre a influência dos óleos essenciais sobre os parâmetros sanguíneos em organismos aquáticos. No presente trabalho foi verificado aumento na contagem de eritrócitos totais, além da redução nos valores de HCM. Esse aumento no número de eritrócitos pode estar relacionado a uma compensação fisiológica relacionada à diminuição da quantidade de hemoglobina (HCM) na célula. A principal função da hemoglobina é se ligar ao oxigênio para que este seja transportado para as células do corpo, dessa forma, devido a menor quantidade de hemoglobina nos eritrócitos, o organismo buscou compensar essa alteração com o aumento no número de eritrócitos. Tal alteração foi observado por Oyesina et al. 2012, os quais verificaram que ratos suplementados com óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

apresentaram aumento de eritrócitos totais e hemoglobina, porém uma diminuição no volume corpuscular médio e na concentração de hemoglobina corpuscular média. Os autores sugerem que alguns constituintes dos óleos essenciais podem estimular a produção de células sanguíneas; podendo ser imaturas, com formas e tamanhos irregulares, porém os mecanismos pelos quais isso é realizado ainda não é bem conhecido. Existem outros estudos com humanos e camundongos, os quais apontam que óleos essenciais podem causar alterações nos parâmetros hematológicos, assim como alterações na morfologia e estrutura dos eritrócitos (Liaqat et al., 2018; Suwalsky et al., 2006).

Nas análises de morfometria intestinal da região anterior, verificou-se um maior número de vilos por trato intestinal dos peixes do grupo BL, quando comparado ao grupo C. Tal aumento pode estar associado a diminuição no número de bactérias heterotróficas totais, o que pode ter trazido benefícios a mucosa intestinal. Esse efeito se dá pela redução das perdas por descamação, causadas pelas toxinas produzidas por bactérias patogênicas que agredem a mucosa intestinal, podendo resultar no aumento do tamanho e número de vilosidades intestinais, proporcionando maior área de absorção de nutrientes e saúde intestinal (Viola e Vieira, 2007). Além disso, o aumento do número de vilos também pode estar relacionado ao sinergismo entre o butirato e o óleo essencial, onde o efeito butirato foi potencializado pelo óleo, sendo capaz de fornecer energia para as células entéricas se multiplicarem (Robles et al., 2013). Para a região posterior, o aumento do perímetro das vilosidades no grupo L, quando comparado aos demais grupos, pode estar associado ao efeito do óleo essencial estar atuando na inibição de bactérias nos segmentos posteriores do trato intestinal, como discutido anteriormente, região do intestino onde o butirato de sódio possivelmente não apresentou influência.

O grupo suplementado com BL promoveu a diminuição de infiltrados linfocitários, quando comparados ao grupo C. Tal achado sugere uma maior eficácia no mecanismo de defesa do organismo e sinergismo entre os compostos, uma vez que os fígados do grupo BL estavam com maior integridade e menos sítios de inflamação no tecido. O mesmo pode ser atribuído para a diminuição de melanomacrófagos soltos no baço dos animais do grupo B, em relação aos animais do grupo C e L, indicando melhoria na atividade de defesa dos animais e quadro geral de saúde. Contudo, o aumento da presença de macroesteatose no grupo B em relação aos demais grupos pode ser explicado, possivelmente, pela rápida absorção do butirato no trato intestinal, uma vez que o óleo essencial estava ausente para retardar sua absorção. Dessa

forma, possivelmente o butirato foi absorvido por completo, e consequentemente acumulado na forma de gordura no fígado. O butirato é um ácido graxo de cadeia curta, degradado na mitocôndria pela via de degradação de ácidos graxos (β -oxidação de ácidos graxos) em 2 acetil-CoA, onde estes quando estão em demasia e não são utilizados para a produção de energia, serão utilizados para a produção de ácidos graxos mais longos, e quando esterificados com o glicerol, formarão os triacilgliceróis, os quais serão armazenados na forma de gordura, inicialmente no fígado e posteriormente transportados também para o tecido adiposo dos peixes (Lee, 2015). De uma maneira geral, a utilização do butirato com a *L. organoides*, combinadamente ou isoladamente, não causou lesões severas aos órgãos analisados, garantindo a sua inocuidade aos peixes. Apesar de todas as melhorias citadas acima, os dados deste estudo não possibilitaram observar diferenças entre os parâmetros zootécnicos. Sugere-se a realização de novos trabalhos em diferentes fases de cultivo, por um período de suplementação maior e com diferentes concentrações de inclusão dos dois produtos, já que os resultados do presente estudo demonstraram haver sinergismo entre os dois compostos, oferecendo diversos benefícios aos animais.

Conclusão

A ação sinérgica do butirato de sódio e o óleo essencial de *L. organoides* apresentou efeitos positivos na microbiota intestinal, na estrutura intestinal, na integridade do fígado e baço, sugerindo uma maior eficiência dos compostos quando utilizados conjuntamente na nutrição de juvenis de tilápia-do-nilo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e (CNPq) pelo suporte financeiro e pelas bolsas de pesquisa de M.L. Martins (CNPq 305869/2014-0) e J.L.P. (CNPq 301524/2017-3), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado do aluno G.F.A. Jesus, a empresa Novation pela doação do produto ButirexC4. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

- Adams, R.P., Sparkman, O.D., 2007. Review of Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 18, 803-806.
- Amar, E. C., Kiron, V., Okamoto, N., Watanabe, T., 2000. Effect of dietary β -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Sci.*, 66, 1068-1075.
- Antache, A., Victor, C., Iulia, G., Lorena, D., Mirela, C., Mihai, P. Ş., 2014. The influence of some probiotics on haematological and some biochemical indices at *Oreochromis niloticus*–Linnaeus, 1758. *Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol.*, 47(1), 192-199.
- Bajpai, V. K., Rahman, A., Kang, S. C., 2008. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 125(2), 117-122.
- Bajpai, V. K., Sharma, A., Baek, K. H., 2013. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control*, 32(2), 582-590.
- Basmacioğlu-Malayoğlu, H., Ozdemir, P., Bağrıyanık, H. A., 2016. Influence of an organic acid blend and essential oil blend, individually or in combination, on growth performance, carcass parameters, apparent digestibility, intestinal microflora and intestinal morphology of broilers. *Br Poult Sci.*, 57(2), 227-234.
- Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *J Fish Biol.* 5(6), 771-781.
- Brum, A., Pereira, S. A., Owatari, M. S., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Mouriño, J. L. P., Martins, M. L., 2017. Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, 468, 235-243.
- Chang, M. J., Soel, S. M., Bang, M. H., Park, J. H. M., Kang, N. E. & Kim, W. K., 2006. Interactions of high amylose starch and deoxycholic acid on gut functions in rats. *Nutrition*, 22, 152-159.
- da Cunha, J. A., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B., 2018. The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens-a review. *J Appl Microbiol.*
- Dairiki, J. K., Majolo, C., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., Oliveira, M. R., & Morais, I. S., 2013. Procedure for inclusion of essential oils in fish feed

- <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100643/1/Circ-Tec-42.pdf>.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., Bossier, P., 2009. Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates:(New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. *Biotech adv.*, 27(6), 680-685.
- Dibner, J. J., Buttin, P., 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *J Appl Poultry Res.* 11(4), 453-463.
- Elala, N. M. A., Ragaa, N. M., 2015. Eubiotic effect of a dietary acidifier (potassium diformate) on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *J adv res.*, 6(4), 621-629.
- Goldenfarb, P. B.; Bowyer, F. P., Hall, E., Brosius, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am J Clin Pathol.*, 56, 35-39.
- He, W., Rahimnejad, S., Wang, L., Song, K., Lu, K., & Zhang, C. (2017). Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & shellfish immunol.*, 70, 164-173.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J agric food chem.*, 46(9), 3590-3595.
- Hood, J. R., Cavanagh, H. M. A., & Wilkinson, J. M., 2004. Effect of essential oil concentration on the pH of nutrient and Iso-sensitest broth. *Phytother Res.*, 18(11), 947-949.
- Jesus, G.F., Pereira, S.A., Owatari, M.S., Syracuse, N., Silva, B.C., Silva, A., Mouriño, J.L., Martins, M.L., 2019. Protected forms of sodium butyrate improve the growth and health of Nile tilapia fingerlings during sexual reversion. *Aquaculture*, 499, 119-127.
- Karatzas, A. K., Kets, E. P. W., Smid, E. J., Bennik, M. H. J., 2001. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Appl Microbiol.*, 90(3), 463-469.
- Langhout, P., 2000. New additives for broiler chickens. *World poult.*, 16(3), 22-27.
- Lee, C. S., 2015. *Dietary nutrients, additives and fish health*. John Wiley & Sons.
- Liaqat, I., Riaz, N., Saleem, Q. U. A., Tahir, H. M., Arshad, M., Arshad, N., 2018. Toxicological Evaluation of Essential Oils from Some

- Plants of Rutaceae Family. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018.
- McLafferty, F. W., Stauffer, D. B. Registry of Mass Spectral Data, 6th Electronic Edition; Wiley: New York, 1994
- Ng, W.K., Koh, C.B., Sudesh, K., Siti-Zahrah, A., 2009. Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. *Aquac Res.*, 40(13), 1490-1500.
- Ng, W.K., Koh, C.B., 2017. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Rev Aquac* 9(4), 342-368.
- Owatari, M.S., Jesus, G.F.A., de Melo Filho, M.E.S., Lapa, K.R., Martins, M.L., Mouriño, J.L. P., 2018. Synthetic fibre as biological support in freshwater recirculating aquaculture systems (RAS). *Aquac Eng.*, 82, 56-62.
- Oyesina, T., Salihu, M., Adedayo, D., 2012. Effect of essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* on hematological parameters of wistar rats. *Afr J of Biochem Res.*, 6(4), 46-49.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Methods for haematological analysis in fish. *Eduem, Maringá* (140 pp.)
- Robles, R., Lozano, A. B., Sevilla, A., Márquez, L., Nuez-Ortin, W., Moyano, F. J., 2013. Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). *Fish physiol biochem.*, 39(6), 1567-1580.
- Schwaiger, J., Wande, R.; Adam, S.; Pawert, M.; Honnen, W.; Triebkorn, R., 1997. The use of histopathologic indicators to evaluate contaminant related stress in fish. *J Aquatic Ecosystem Stress Recovery*, 6, 75-86.
- Silva, B. C., Martins, M. L., Jatobá, A., Buglione Neto, C. C., Vieira, F. N., Pereira, G. V., Mouriño, J.L.P., 2009. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. *Pesqui Vet Bras.*, 29(11), 874-880.
- Silva, B.C., Vieira, F.N., Mouriño, J.L.P., Ferreira, G.S., Seiffert, W.Q., 2013. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. *Aquaculture* 384, 104-110.
- Suwalsky, M., Orellana, P., Avello, M., Villena, F., Sotomayor, C. P., 2006. Human erythrocytes are affected in vitro by extracts of *Ugni molinae* leaves. *Food Chem Toxicol.*, 44(8), 1393-1398.

- Talpur, A. D., Ikhwanuddin, M., 2013. *Azadirachta indica* (neem) leaf dietary effects on the immunity response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish & shellfish immunol.*, 34(1), 254-264.
- Viola, E.S., Vieira, S.L., 2007. Supplementation of organic and inorganic acidifiers in diets for broiler chickens: performance and intestinal morphology. *Rev Bras Zootec.*, 36, 1097-1104.
- Yang, X., Long, F., Xin, H., Yang, C., Yang, X., 2018. Impact of essential oils and organic acids on the growth performance, digestive functions and immunity of broiler chickens. *Anim nutr.*

CONCLUSÃO GERAL

O butirato de sódio na forma protegida e na concentração de 0,5% de inclusão na dieta, foi capaz de incrementar o desempenho zootécnico dos animais, beneficiar a estrutura, saúde e microbiota intestinal, além de apresentar efeito sinérgico quando utilizado em conjunto com o óleo essencial de *L. origanoides*

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

BAJPAI, V. K., RAHMAN, A., KANG, S. C., 2008. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 125, n. 2, p. 117-122.

BAJPAI, V. K., SHARMA, A., BAEK, K. H., 2013. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. **Food Control**, v. 32, n.2, p. 582-590.

CANANI, R.B., 2011. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. **World J Gastroenterol.**, v.17 n.12, p.1519-1528.

CHIQUEIRI, J., SOARES, R. T. R. N., LYRA, M. S., NERY, V. H., FONSECA, J. B., 2009. Ácidos orgânicos na alimentação de leitões desmamados. **Archivos de Zootecnia**, v. 58, n. 1, p. 609-612.

CHUCHIRD, N., RORKWIREE, P., RAIKAT, T., 2015. Effect of dietary formic acid and astaxanthin on the survival and growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 440.

DA CUNHA, J. A., HEINZMANN, B. M., BALDISSEROTTO, B., 2018. The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens-a review. **J. Appl. Microbiol.**

DEFOIRDT, T., BOON, N., SORGELOOS, P., VERSTRAETE, W., BOSSIER, P., 2009. Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. **Biotechnol adv**, v.27, n.6, p. 680-685.

ELALA, N.M.A., RAGAA, N.M., 2015. Eubiotic effect of a dietary acidifier (potassium diformate) on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. **J Adv Res.**, v. 6, n. 4, p. 621-629.

ELER, M.N., MILLANI, T.J., 2007. Métodos de estudos de sustentabilidade aplicados a aquicultura. **RevBr Zootec.**, v. 36.

FANG, C. L., SUN, H., WU, J., NIU, H.H., FENG, J., 2014. Effects of sodium butyrate on growth performance, haematological and immunological characteristics of weanling piglets. **J animal physiol animal nutr**, v. 98, n.4, p. 680-685.

GALFI, P.; BOKORI, J., 1990. Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. **Acta Vet.Hungarica**, v. 38, n. 1-2, p. 3-17.

GAO, Y., STOREBAKKEN, T., SHEARER, K.D., PENN, M., ØVERLAND, M., 2011. Supplementation of fishmeal and plant protein-based diets for rainbow trout with a mixture of sodium formate and butyrate. **Aquaculture**, v. 311, n. 1-4, p. 233-240.

GOOSEN, N. J., GÖRGENS, J. F., DE WET, L. F., CHENIA, H., 2011. Organic acids as potential growth promoters in the South African abalone *Haliotis midae*. **Aquaculture**, v. 321, n. 3-4, p. 245-251.

GUILLOTEAU, P., MARTIN, L., EECKHAUT, V., DUCATELLE, R., ZABIELSKI, R., VAN IMMERSEEL, F., 2010. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. **Nutr res rev.**, v. 23, n. 2, p. 366-384.

HASSAAN, M.S., WAFI, M.A., SOLTAN, M.A., GODA, A.S., MOGHETH, N.M.A., 2014. Effect of dietary organic salts on growth, nutrient digestibility, mineral absorption and some biochemical indices of Nile tilapia; *Oreochromis niloticus* L. fingerlings. *Oreochromis niloticus*, p. 47-55.

HUICAB-PECH, Z. G.; CASTANEDA-CHAVEZ, M. R.; LANGO-REYNOSO, F. Pathogenic Bacteria in *Oreochromis Niloticus* Var. Stirling Tilapia Culture. *Fisheries and Aquaculture Journal*, v. 8, n. 2, p. 11-11, 2017.

JAAFAR, R.M., KANIA, P.W., LARSEN, A.H., NIELSEN, D.S., FOUZ, B., BROWDY, C.,BUCHMANN, K., 2013. Gut microbiota changes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), during organic acid feed supplementation and *Yersinia ruckeri* infection. *J fish dis.* v. 36, n. 6, p. 599-606.

JESUS, G.F., PEREIRA, S.A., OWATARI, M.S., SYRACUSE, N., SILVA, B.C., SILVA, A., MOURIÑO, J.L., MARTINS, M.L., 2019a.

Protected forms of sodium butyrate improve the growth and health of Nile tilapia fingerlings during sexual reversion. **Aquaculture**, v. 499, p. 119-127.

JESUS, G. F., PEREIRA, S. A., OWATARI, M. S., ADDAM, K., SILVA, B. C., STERZELECKI, F. C., SUGAI, J.K., CARDOSO, L., JATOBÁ, A., MOURÑO, J.L.P., MARTINS, M. L., 2019b. Use of protected forms of sodium butyrate benefit the development and intestinal health of Nile tilapia during the sexual reversion period. **Aquaculture**, v. 504, p. 326-333.

LIM, C., LÜCKSTÄDTS, C., KLESIUS, P.H., 2010. Review: Use of organic acids, salts in fish diets. **Global Aquac Adv.**, v. 5, n. 9-10, p. 45-46.

LIZAMA, M. D. L. A. P., TAKEMOTO, R. M., RANZANI-PAIVA, M. J. T., DA SILVA AYROZA, L. M., PAVANELLI, G. C., 2007. Relação parasito-hospedeiro em peixes de pisciculturas da região de Assis, Estado de São Paulo, Brasil. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). **Acta Sci Bio Sci**, v.29, n.2, p. 223-231.

LÜCKSTÄDT, C. The use of acidifiers in fish nutrition. **Cab Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 3, n. 44, p. 1-8.

NG, W. K., KOH, C.B., SUDESH, K., SITI-ZAHRAH, A., 2009. Organic acids potential replacement for antibiotic treatments of tilapia. **Global aquac adv.**

NG, W.K., KOH, C.B., 2017. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. **Rev Aquac.**, v. 9, n. 4, p. 342-368.

PANDEY, A.; FERNANDES, M.; LARROCHE, C. (Ed.), 2008. **Current developments in solid-state fermentation**. Springer Science & Business Media, v. 81, p. 146-161.

PARTANEN, K.H., MROZ, Z., 1999. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutr Res Rev.**, v. 12, n. 1, p. 117-145.

PEIXEBR- ANUÁRIO PEIXE BR DA PISCICULTURA 2018, disponível em: www.peixebr.com.br, acessado em abril de 2019.

PEREIRA, S.A., OLIVEIRA, H.M., JESUS, G.F.A., ADDAM, K.G.S., SILVA, B.C., YAMASHITA, M.M., MOURIÑO, J.L.P., 2018. Can the minerals calcium and sodium, chelated to propionic acid, influence the health and zootechnical parameters of native silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 496, p. 88-95.

PIVA, A., ANFOSSI, P., MEOLA, E., PIETRI, A., PANCIROLI, A., BERTUZZI, T., FORMIGONI, A., 1997. Effect of microcapsulation on absorption processes in the pig. **Livestock Prod Sci**, v. 51, n.1, p. 53-61.

RAMLI, N., HEINDL, U., SUNANTO, S., 2005. Effect of potassium-diformate on growth performance of tilapia challenged with *Vibrio anguillarum*. **World Aquac Soc.**, p. 9-13.

ROBLES, R., LOZANO, A. B., SEVILLA, A., MÁRQUEZ, L., NUEZ-ORTIN, W., MOYANO, F. J., 2013. Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). **Fish physiol biochem.**, v. 39, n. 6, p. 1567-1580.

ROMANO, N., KOH, C., NG, W., 2015. Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 435, p. 228-236.

SILVA, B.C., NOLASCO-SORIA, H., MAGALLÓN-BARAJAS, F., CIVERA-CERECEDO, R., CASILLAS-HERNÁNDEZ, R., SEIFFERT, W., 2016. Improved digestion and initial performance of whiteleg shrimp using organic salt supplements. **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n.5, p. 997-1005.

SILVA, B.C., VIEIRA, F.D.N., MOURIÑO, J.L.P., BOLIVAR, N., SEIFFERT, W.Q., 2016. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. **Aquac res.**, v. 47, n. 2, p. 612-623.

SILVA, B.C., VIEIRA, F.N., MOURIÑO, J.L.P., FERREIRA, G.S., SEIFFERT, W.Q., 2013. Salts of organic acids selection by multiple

characteristics for marine shrimp nutrition. **Aquaculture**, v. 384, p. 104-110.

SITUMORANG, M.L., DE SCHRYVER, P., DIERCKENS, K., BOSSIER, P., 2016. Effect of poly- β -hydroxybutyrate on growth and disease resistance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles. **Vet Microbiol.**, v.182, p. 44-49.

SNYDER, C.H., 1995. **The extraordinary chemistry of ordinary things**. 2^a ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons, p. 242-245.

SUGIURA, S.H., ROY, P.K., FERRARIS, R.P., 2006. Dietary acidification enhances phosphorus digestibility but decreases H⁺/K⁺ ATPase expression in rainbow trout. **J Exp Bio.**, v. 209, n. 19, p. 3719-3728.

SUNKARA, L. T., ACHANTA, M., SCHREIBER, N. B., BOMMINENI, Y. R., DAI, G., JIANG, W., ZHANG, G., 2011. Butyrate enhances disease resistance of chickens by inducing antimicrobial host defense peptide gene expression. **PLoS one**, v. 6, n. 11, e27225.

THOMAS, L., LARROCHE, C., PANDEY., 2013. A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochem Eng J**, v. 81, p. 146-161.

VIOLA, E.S., VIEIRA, S.L., 2007. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. **Rev Bras Zoot.**, v.36, n. 4, p. 1097-1104.

ZHANG, W.H., JIANG, Y., ZHU, Q.F., GAO, F., DAI, S.F., CHEN, J., ZHOU, G.H., 2011. Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens. **Br poultry sci.**, v. 52, n. 3, p. 292-301.