



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

Renata Oselame Nobrega

**Farinha de *Aurantiochytrium* sp., fonte do ácido graxo docosaheptaenoico (22:6 n-3),
como suplemento dietético para tilápia-do-nilo em temperatura subótima: desempenho,
composição corporal e defesas oxidativas**

Florianópolis

2020

Renata Oselame Nobrega

**Farinha de *Aurantiochytrium* sp., fonte do ácido graxo docosaheptaenoico (22:6 n-3),
como suplemento dietético para tilápia-do-nylo em temperatura subótima: desempenho,
composição corporal e defesas oxidativas**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de doutorado em 2020.

Orientadora: Dra. Débora Machado Fracalossi
Coorientadora: Dra. Camila Fernandes Corrêa

Florianópolis

2020

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

NOBREGA, RENATA

Farinha de *Aurantiochytrium* sp., fonte do ácido graxo docosahexaenoico (22:6 n-3), como suplemento dietético para tilápia-do-nylo em temperatura subótima: desempenho, composição corporal e defesas oxidativas / RENATA NOBREGA ; orientador, Débora Machado Fracalossi, coorientador, Camila Fernandes Corrêa, 2020.

91 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Dietas de inverno . 3. Ácido graxo docosahexaenoico . 4. Variação térmica . 5. Danos oxidativos . I. Machado Fracalossi, Débora . II. Fernandes Corrêa, Camila . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Renata Oselame Nobrega

Farinha de *Aurantiochytrium* sp., fonte do ácido graxo docosaheptaenoico (22:6 n-3), como suplemento dietético para tilápia-do-nylo em temperatura subótima: desempenho, composição corporal e defesas oxidativas.

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

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

Profa. Ligia Uribe Gonçalves, Dra.
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Prof. Vinicius Ronzani Cerqueira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Robson Andrade Rodrigues, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Dra. Débora Machado Fracalossi
Orientadora

Florianópolis, 2020

Este trabalho é dedicado aos meus professores, pois eles me deram a devida sabedoria para ser quem sou hoje

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Mara Rubia Oselame e Écio Neri da Rosa e as minhas irmãs Lais Oselame Nobrega e Isaura da Rosa, por estarem sempre juntos me apoiando, dando força e investindo nos meus sonhos;

Agradeço ao meu marido Vitor Mendes Lehmkuhl, por sempre me apoiar e estar ao meu lado incentivando e me dando força para vencer todas as etapas no trabalho e também por adicionar amor e equilíbrio para minha vida;

Agradeço especialmente, a minha orientadora Prof.a Débora Machado Fracalossi, uma mãe para mim. Além de ser a principal contribuinte para a minha formação de me tornar uma pesquisadora e por até hoje me inspira com sua “fortaleza”, ela também me incentivou a ser uma mulher guerreira e vencedora;

À minha amiga e coorientadora Camila Fernandes Côrreia, pela amizade, convívio, por me ajudar neste trabalho e ser tão atenciosa, pelos ensinamentos, incentivo e contribuição ao meu crescimento profissional e também pessoal;

À minha amiga e comadre Bruna Mattioni, pela amizade, apoio, incentivo e paciência em me ensinar tudo o que sei sobre laboratório e análises químicas;

Ao meu eterno amigo Vitor Giatti Fernandes, uma pessoa muito importante para a minha formação acadêmica, para mim sempre será uma fonte de inspiração e saudade;

Agradecimentos também ao professor Alcir Luiz Dafre e sua equipe do Laboratório de Defesas Celulares do Departamento de Bioquímica da UFSC, pela colaboração com o planejamento, com as análises e auxílio da confecção do artigo de danos oxidativos.

Aos amigos e companheiros do LABNUTRI: Fernando Brignol, Luiz Eduardo Lima de Freitas, Jorge Filipe Banza, Bruno da Silva Pierri, Lucas Laurini de Oliveira, Allan David da Silva, Michele Cristina Vieira, Vitória Daitx, Jhonis Pessini, Delano Dias Schedler, Bianca Richter, Rafael Romaneli, Rosana Oliveira Batista e Marieta Fittipaldi Marangoni; sem os quais a vida e este trabalho não seriam o mesmo;

Às todas as colaboradoras do LABNUTRI, Maria Fernanda Oliveira, Sônia Rejane Silva, Janice de Souza, Katharinne Ingrid Moreaes de Carvalho e Amarilis Paulino Scremin, pela amizade, ajuda e convívio no laboratório;

Agradeço a todos os integrantes do Departamento de Aquicultura, que se dedicam para manter o programa ao patamar de excelência que está hoje;

Aos colegas do LAPAD, pelo apoio em todos os momentos e por estarem sempre presentes;

Aos meus amigos do “Bloco B” Luciano Weiss, Jana Pedron e o Vinicius Buratto, pelo convívio e por estarem sempre prontos para ajudar;

A empresa Alltech[®] pelo financiamento deste estudo e ao Luiz Fernando Silva pelo auxílio e ajuda;

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação durante todos estes anos de estudo.

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

“Unir-se é um bom começo, manter a união é um progresso, e trabalhar em conjunto é a vitória”

Henry Ford

RESUMO

A suplementação dietética de ácido graxo poli-insaturado da série n-3 (PUFA n-3) para a tilápia-do-nilo melhora o desempenho zootécnico em temperatura subótima fria. Com isso, o presente estudo avaliou a inclusão dietética de farinha de *Aurantiochytrium* sp. como fonte de ácido docosaexaenoico (22:6 n-3, DHA) e seu efeito sobre índices de desempenho zootécnico, composição corporal e muscular, acúmulo de ácidos graxos no músculo e potencial dano oxidativo às biomoléculas sob variação térmica. Um ensaio alimentar de 87 dias com juvenis ($8,47 \pm 0,19$ g) mantidos a uma temperatura subótima de 22°C, avaliou quatro níveis de inclusão de farinha de *Aurantiochytrium* sp. (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 g 100 g⁻¹ dieta seca), além de uma dieta sem a inclusão do aditivo. Também incluímos uma dieta controle positivo com óleo de fígado de bacalhau (OFB), contendo uma concentração de DHA semelhante à dieta suplementada com 1,0 g 100 g⁻¹ de farinha de *Aurantiochytrium* sp., para permitir a comparação de duas fontes dietéticas ricas em DHA. A suplementação de farinha de *Aurantiochytrium* sp. em 0,45 a 1,42 g 100⁻¹ da dieta seca para tilápia-do-nilo, mantida a 22°C, resultou em melhor crescimento, eficiência alimentar, composição lipídica corporal e adequada relação de ácidos graxos poli-insaturados das séries n-3 / n-6 no músculo para o consumo humano. Peixes alimentados com níveis crescentes de farinha de *Aurantiochytrium* sp. apresentaram significativamente maior ganho em peso quando comparados a peixes alimentados com a dieta CLO. Também foi conduzido um ensaio de digestibilidade sobre a utilização de nutrientes da farinha de *Aurantiochytrium* sp. Utilizou-se óxido de ítrio como marcador (1,00 mg g⁻¹ da dieta referência), coleta de fezes por sedimentação e peixes com peso médio de $16,01 \pm 0,68$ g, mantidos a 22°C. O DHA apresentou alta digestibilidade (96,05%) para a tilápia-do-nilo, mesmo em temperatura subótima fria, mas a digestibilidade das proteínas (68,64%), lipídios (68,38%) e ácidos graxos saturados (50,77%) foram baixas. Adicionalmente, foram comparados dois níveis de inclusão dietética da farinha de *Aurantiochytrium* sp. (1,0 e 4,0 g 100 g⁻¹ da dieta seca) e uma dieta controle com OFB, para avaliar se altas concentrações de DHA e a exposição prolongada à temperatura subótima fria, seguida da elevação da temperatura, causaria danos oxidativos às biomoléculas. A suplementação dietética de 1,0 g 100 g⁻¹ da farinha de *Aurantiochytrium* sp. durante 87 dias a 22°C causou pouco dano ao DNA da tilápia-do-nilo. No entanto, a elevação da temperatura aumentou significativamente a concentração da hemoglobina e a atividade das enzimas antioxidantes. A HSP70 foi maior na tilápia-do-nilo mantida a 22°C (temperatura subótima), do que após o aumento da temperatura para 28°C (temperatura ótima de crescimento) ou para 33°C (temperatura acima da ótima). A tilápia-do-nilo mantida a 22°C responde ao aumento das inclusões dietéticas da farinha de *Aurantiochytrium* sp., melhorando o desempenho produtivo. Portanto, sugere-se que temperaturas baixas podem levar a um maior estresse térmico do que altas temperaturas para a tilápia-do-nilo, já que estimulam o aumento da HSP70 para melhorar as defesas contra o estresse térmico. Estudos adicionais são necessários para melhor compreender o mecanismo de adaptação da tilápia-do-nilo sob estresse térmico, evidente durante as oscilações térmicas, típicas das regiões subtropicais, onde há produção expressiva desta espécie. Ainda, o aditivo não causou danos oxidativos importantes às biomoléculas, em temperatura subótima, se mostrando seguro para utilização em dietas de inverno, apesar da sua alta concentração de DHA.

Palavras-chave: Aquicultura, dietas de inverno, ácido graxo ácido docosaexaenoico, variação térmica, danos oxidativos.

ABSTRACT

The dietary supplementation of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) for Nile tilapia improve the growth performance at cold-suboptimal temperature. Thus, this study evaluated the dietary inclusion of *Aurantiochytrium* sp. meal, as source of docosahexaenoic acid (22:6 n-3, DHA), and its effect on growth, feed conversion, body and muscle composition, muscle accumulation of fatty acids, and potential oxidative damage to biomolecules under thermal variation. A feeding trial of 87 days with juvenile fish (8.47 ± 0.19 g) kept at a cold suboptimal temperature of 22°C, evaluated four level inclusion of *Aurantiochytrium* sp. meal (0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 g 100 g⁻¹ dry diet), in addition to a diet without the inclusion of the additive. We also included a positive control diet with cod liver oil (CLO), containing a DHA concentration similar to the diet supplemented with 1.0 g 100 g⁻¹ *Aurantiochytrium* sp. meal, to allow for a comparison of two DHA-rich feed sources. The dietary supplementation of *Aurantiochytrium* sp. meal at 0.45 to 1.42 g 100⁻¹ dry diet for Nile tilapia kept at 22°C resulted in best growth, feed efficiency, body lipid composition, and adequate n-3/n-6 polyunsaturated-fatty-acid ratio in the muscle for human consumption. Fish fed *Aurantiochytrium* sp. meal had significantly higher weight gains when compared to fish fed the CLO diet. A digestibility trial was conducted to evaluate the utilization of *Aurantiochytrium* sp. meal nutrients, using yttrium oxide as an inert marker (0.1% reference diet), collection of feces by sedimentation, and fish with 16.01 ± 0.68 g, kept at 22°C. Nile tilapia presented high digestibility (96.05%) for DHA, even at the suboptimal temperature, but the digestibility of proteins (68.64%), lipids (68.38%), and saturated fatty acids (50.77%), were low. In addition, it was tested two inclusion levels of *Aurantiochytrium* sp. meal (1.0 and 4.0 g 100 g⁻¹ dry diet) and one control diet with inclusion of cod liver oil (CLO), to evaluate if high concentration of DHA could cause oxidative damage to biomolecules in juvenile Nile tilapia. Fish were subjected to a long-term exposure to suboptimal-cold temperature followed by temperature elevation. The dietary supplementation of *Aurantiochytrium* sp. meal during 87 days at 22°C caused only little DNA damage in Nile tilapia. However, the rise in temperature significantly increased the concentration of hemoglobin and the activity of antioxidant enzymes. HSP70 was higher in Nile tilapia kept at 22°C (cold-suboptimal temperature) than after temperature increase to 28°C (optimal-growth temperature) or 33°C (hot-suboptimal temperature). Therefore, it is suggested that low temperatures can lead to greater thermal stress than high temperatures for Nile tilapia, since they stimulate the increase of HSP70 to improve the defenses against thermal stress. Additional studies are needed to better understand the mechanism of adaptation of Nile tilapia under thermal stress, evident during thermal oscillations, typical of subtropical regions, where there is significant production of this species. Nile tilapia maintained at 22°C respond to increasing dietary inclusions of *Aurantiochytrium* sp. meal by improving productive performance without showing important oxidative damage to biomolecules, despite its high DHA content. Therefore, *Aurantiochytrium* sp. meal is a safe additive to be included in Nile tilapia winter diets.

Keywords: Aquaculture, winter diets, docosahexaenoic fatty acid, thermal variation, oxidative damage.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Os dez países maiores produtores de tilápias e seu respectivo clima. Dados de produção adaptados do FAO-FishStatJ (2019) e do WorldClim (2019). Fonte: Nobrega et al., 2020..... 17
- Figura 2.** Regressões polinomiais do ganho de peso, retenção proteica aparente e eficiência alimentar de juvenis de tilápia-do-nilo alimentadas com inclusões crescentes de farinha de *Aurantiochytrium* sp. por 87 dias, a 22°C.42
- Figura 3.** Concentração de PUFA das séries n-3 e n-6 no músculo (média ± erro padrão) de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com inclusões crescentes de farinha de *Aurantiochytrium* sp. por 87 dias, a 22°C. 50
- Figura 4.** Linha do tempo do ensaio experimental, considerando os três períodos de coleta de amostra, com as respectivas temperaturas. 63
- Figura 5.** Médias e erro padrão das médias dos teores de dano ao DNA, catalase (CAT) e glutatíno total (GSH-t), em juvenis de tilápia-do-nilo, após a alimentação com três níveis de inclusão de farinha de *Aurantiochytrium* sp. ou óleo de fígado de bacalhau, por 87 dias a 22°C, seguidos por sete dias com aumento de temperatura de 22°C a 28°C, além de outros sete dias com aumento de temperatura de 28°C a 33°C. Ambos os dados apresentaram interação entre as dietas e as temperaturas. D0: dieta sem farinha de *Aurantiochytrium* sp. (0 g 100 g⁻¹ da dieta seca); D1: dieta com suplementação de 1,0 g 100 g⁻¹ da dieta seca farinha de *Aurantiochytrium* sp.; D4: dieta com suplementação de 4,0 g 100 g⁻¹ da dieta seca farinha de *Aurantiochytrium* sp. e OFB: dieta controle com óleo de fígado de bacalhau. 70
- Figura 6.** Proteínas de choque térmico (HSP70) no fígado de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com óleo de fígado de bacalhau por 87 dias a 22°C, seguido por sete dias com aumento da temperatura da água de 22°C para 28°C, além de outros sete dias com aumento de temperatura de 28°C a 33°C. Os resultados estão expressos como a média de dez repetições. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos estudos em exigências de ácidos graxos essenciais para a tilápia-do- nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) em temperatura subótima.	21
Tabela 2. Composição da farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp. (All-G-Rich®), analisado no laboratório de nutrição de espécies aquícolas (LABNUTRI) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).	28
Tabela 3. Formulação, composição próxima e perfil de ácidos graxos das dietas experimentais.	34
Tabela 4. Composição proximal e perfil de ácidos graxos da dieta de referência usada no ensaio de digestibilidade.	38
Tabela 5. Desempenho de crescimento, eficiência alimentar e retenção proteica aparente em juvenis de tilápia-do-nilo após a alimentação com cinco níveis de inclusão dietética de farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp. por 87 dias, à 22° C. ^a	41
Tabela 6. Desempenho em crescimento, eficiência alimentar e retenção proteica aparente em juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com duas fontes de DHA, farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp. ou óleo de fígado de bacalhau, por 87 dias, a 22°C. ^a	43
Tabela 7. Composição e coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes selecionados contidos na farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp. para a tilápia-do-nilo mantida a 22°C.	44
Tabela 8. Composição centesimal corporal e muscular de juvenis de tilápia-do-nilo quando alimentados com inclusão dietética crescente de farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp. por 87 dias, a 22 ° C.	45
Tabela 9. Composição centesimal corporal e muscular (g 100 g ⁻¹ do peso úmido) de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com duas fontes de DHA, farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp. ou óleo de fígado de bacalhau, por 87 dias, a 22°C. ^a	46
Tabela 10. Perfil de ácidos graxos musculares de juvenis de tilápia-do-nilo quando alimentados com inclusão dietética crescente de farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp. por 87 dias, a 22°C. ^a	48
Tabela 11. Perfil de ácidos graxos muscular (g 100 g ⁻¹ do peso úmido) de juvenis de tilápia- do-nilo alimentados com duas fontes de DHA, farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp. ou óleo de fígado de bacalhau (CLO), por 87 dias, a 22°C. ^a	49
Tabela 12. Formulação das dietas experimentais.	60
Tabela 13. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos das dietas experimentais.	61

Tabela 14. Valores médios, seguidos dos erros padrões, dos teores de hemoglobina, das atividades das enzimas antioxidantes e dos marcadores de estresse oxidativo, em juvenis de tilápia-do-nilo, após a alimentação com três níveis de inclusão de farinha de *Aurantiochytrium* sp. ou óleo de fígado de bacalhau, por 87 dias a 22°C, seguidos por sete dias de aumento de temperatura, de 22°C a 28°C, além de outros sete dias com aumento de temperatura de 28°C a 33°C. ¹ 68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	Associação de Químicos Analíticos Oficiais
ARA	Ácido graxo araquidônico (20:4n-6)
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CP	Proteínas carboniladas
DHA	Ácido graxo docosaenoico (22:6n-3)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPA	Ácido docosapentaenoico (22:5 n-3)
DT	Death temperature
EPA	Ácido graxo eicosapentaenoico (20:5n-3)
FAO	Food and Agriculture Organization of United Nations
G	Gram
GIFT	Genetically Improved Farmed Tilapia
GPx	Glutathione peroxidase
GH	Glutathione reductase
GSH-t	Glutathione total
GSSG.	Dissulfeto de glutathione, ou glutathione oxidada
H	Hora
HSP70	Proteína de choque térmico
L	Litro
LC-PUFA	PUFA de cadeia longa (≥ 20 carbonos)
LOA	Ácido graxo linoleico (18:2n-6)
Mg	Miligramma
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
n-3	Série n-3
n-6	Série n-6
nm	Nanômetro
NPSH	Tióis não proteicos
NRC	National Research Council
OFB	Óleo de fígado de bacalhau
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
RAS	Sistema aquícola de recirculação
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFA	Ácidos graxos saturados
SOD	Superóxido dismutase
SREBP-1	Proteínas de ligação do elemento regulador do esteroide
α -LNA	Ácido graxo alfa-linolênico (18:3n-3)
$\Delta 4$	Delta 4 desaturase
$\Delta 6$	Delta 6 desaturase
$\Delta 9$	Delta 9 desaturase

LISTA DE SÍMBOLOS

A	letra grega alfa
Δ	letra grega delta
β	letra grega beta
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
\pm	mais ou menos
%	percentagem

SUMÁRIO

1.	Introdução Geral.....	16
1.1	DIETAS DE INVERNO	18
1.1.1	Ácidos graxos poli-insaturados em dietas de inverno.....	18
1.2	EFEITO DA TEMPERATURA NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DA TILÁPIA-DO-NILO	22
1.3	DANOS OXIDATIVOS E VARIAÇÃO TÉRMICA.....	24
1.4	DANOS OXIDATIVOS E A SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE PUFA.....	25
1.5	<i>Aurantiochytrium</i> sp. COMO ADITIVO PARA RAÇÕES AQUÍCOLAS	26
1.6	OBJETIVO	29
1.6.1	Objetivo Geral.....	29
1.6.2	Objetivos Específicos	29
2.	Artigo 1	30
2.1	INTRODUÇÃO	31
2.2	MATERIAL E MÉTODO	32
2.2.1	Desenho e dietas experimentais	33
2.2.2	Procedimento experimental	35
2.2.3	Biometria e coleta amostral.....	36
2.2.4	Análises químicas	36
2.2.5	Dietas e ensaio de digestibilidade.....	37
2.2.6	Análises estatísticas	40
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
2.3.1	Crescimento, sobrevivência e retenção proteica	40
2.3.2	Digestibilidade de nutrientes.....	42
2.3.3	Composição corporal e muscular	45
2.3.4	Perfil de ácidos graxos muscular	47
2.4	CONCLUSÃO	51
2.5	REFERÊNCIAS.....	52
3.	ARTIGO 2	56
3.1	INTRODUÇÃO	57
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.2.1	Dietas experimentais	59
3.2.2	Desenho e procedimentos experimentais	61
3.2.3	Análise centesimal e perfil de ácidos graxos.....	63
3.2.4	Hemoglobina (Hb).....	64
3.2.5	Análises de marcadores de estresse oxidativo	64
3.2.5.1	<i>Dano ao DNA.....</i>	64
3.2.5.2	<i>Dot blot para proteína carbonil.....</i>	65
3.2.6	Análise enzimática	65
3.2.6.1	<i>Catalase (CAT)</i>	65
3.2.6.2	<i>Glutathione peroxidase (GPx)</i>	65
3.2.6.3	<i>Glutathione total (GPH-t), tióis não proteicos (NPSH)</i>	66
3.2.7	Proteína de choque térmico (HSP70)	66
3.2.8	Análises estatísticas	67
3.3	RESULTADOS.....	67
3.3.1	Hemoglobina (Hb).....	67
3.3.2	Marcadores de estresse oxidativo	69
3.3.3	Enzimas antioxidantes	69
3.3.4	Proteína de choque térmico (HSP70)	70

3.4	DISCUSSÃO	71
3.5	CONCLUSÃO	76
3.6	REFERÊNCIAS.....	76
4.	Conclusão Geral	84
	Referências Da Introdução Geral.....	85

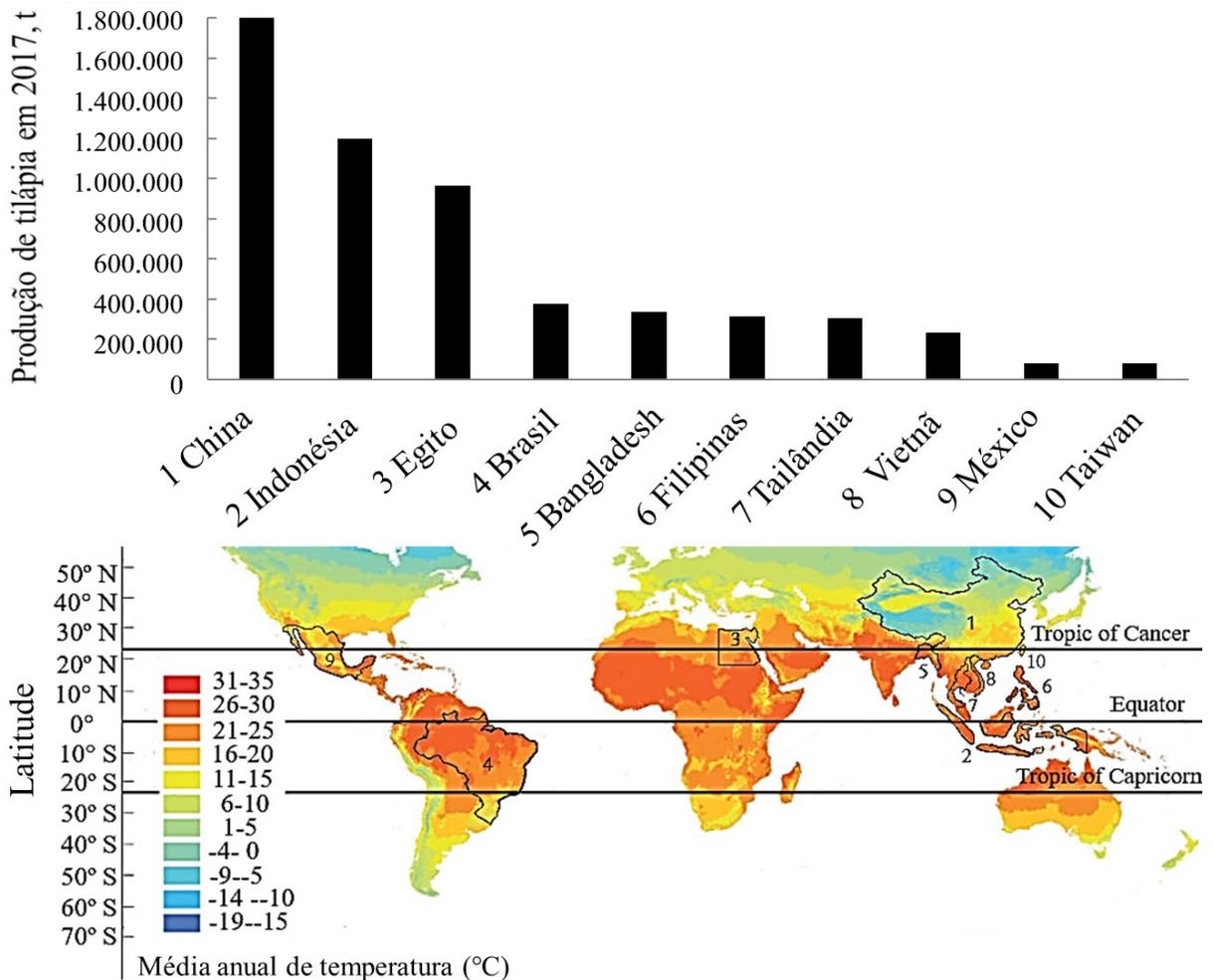
1. INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura é um setor da economia que fornece uma valiosa e essencial fonte de proteínas para o consumo humano. Considerando o aumento da população humana e consumo de pescado, o crescimento da piscicultura é de extrema importância para a economia mundial. Em 2018, a produção mundial de peixes e crustáceos alcançou 82,1 milhões de toneladas (FAO, 2020), com aumento exponencial na última década. Neste contexto, a aquicultura contribuiu cada vez mais para o abastecimento de pescado, superando a pesca extrativista no suprimento para o consumo humano. O aumento de 70% na produção de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, nos últimos oito anos afetou positivamente a aquicultura mundial de água doce (FAO, 2020). Em 2018, a tilápia-do-nilo foi a terceira espécie de peixe mais cultivada no mundo, superando a produção de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (FAO, 2020). Essa expansão da produção resultou em um aumento constante nas taxas de consumo per capita de tilápia nos últimos anos (FAO, 2020).

Apesar de ser uma espécie tropical, a tilápia é cultivada em muitas regiões subtropicais do mundo, onde há grandes variações de temperatura entre o verão e inverno. A faixa ideal de temperatura para a produção de tilápia-do-nilo é de 26 a 30°C. No Brasil, que é um importante país produtor de tilápia, esta produção se concentra em estados do sul e sudeste, Paraná, São Paulo e Santa Catarina, regiões que possuem clima subtropical (PEIXE-BR, 2020). Essa tendência também é observada em outros importantes países produtores de tilápia no mundo, como China, Egito, Bangladesh, Filipinas, o Norte do Vietnã e Tailândia (**Figura 1**) (CHENG et al., 2017; DAN; LITTLE, 2000; NOBREGA et al., 2020; SIFA et al., 2002). Temperaturas subótimas frias têm sido relatadas como causadoras de impactos negativos na produção da tilápia-do-nilo em todo o mundo (DAN; LITTLE, 2000; MA et al., 2015; NOBREGA et al., 2019; SHI et al., 2015; SUN et al., 1992). Quando a tilápia-do-nilo é mantida a uma temperatura subótima fria, há redução no consumo de ração, o que afeta negativamente o crescimento, as taxas metabólicas desta espécie, o que leva ao aumento de enfermidades e mortalidades (AZAZA et al., 2008; CHANG et al., 2006; CORRÊA et al., 2017, 2018; MA et al., 2015). Este efeito no metabolismo, pode promover a mortalidade ou levar a uma variedade de consequências sub-letais devido a recursos energéticos limitados para o funcionamento adequado dos órgãos. Entretanto, a genética e estado nutricional dos peixes irão influenciar na faixa de temperatura em que a alimentação e o movimento voluntário vão cessar, bem como a temperatura letal (ABDEL-GHANY et al., 2019; MA et al., 2015).

Mudanças na temperatura ambiente têm uma influência crucial em animais ectotérmicos, como os peixes. Para manter a homeostase fisiológica em temperaturas baixas desfavoráveis, os peixes aumentam os níveis de insaturação dos ácidos graxos nos fosfolípidios que compõem as membranas celulares, o que mantém a fluidez e a permeabilidade das células (TURCHINI et al., 2009; WEBER; BOSWORTH, 2005).

Figura 1. Os dez países maiores produtores de tilápias e seu respectivo clima. Dados de produção adaptados do FAO-FishStatJ (2019) e do WorldClim (2019).



Fonte: Nobrega et al., 2020.

Esse processo é conhecido como “adaptação homeoviscosa” e foi relatado para várias espécies de peixes (ATWOOD et al., 2003; CRAIG et al., 1995; FRACALOSSO; LOVELL, 1995; WALLAERT; BABIN, 1994). Entender como a nutrição pode modular positivamente a funcionalidade da membrana celular na tilápia-do-nilo pode ser uma ferramenta valiosa para aumentar a resistência dos peixes ao estresse pelo frio, não apenas para aumentar a

produtividade, mas também para melhorar a saúde dos peixes, uma vez que a funcionalidade das membranas celulares afeta as defesas (CHARO-KARISA et al., 2005; NG et al., 2013).

O rápido crescimento levou a uma necessidade urgente de desenvolver novas tecnologias para melhorar a produção de tilápias nas regiões subtropicais. Pesquisas sobre a formulação de dietas de inverno pode melhorar a produção nessas regiões, em conjunto com a produção de linhagens mais tolerantes à baixas temperaturas, bem como a adoção de práticas sustentáveis de manejo. O aprimoramento da tolerância da tilápia-do-nilo ao frio prolongará o crescimento e reduzirá a mortalidade, diminuindo os custos de produção e melhorando a qualidade da carne. Portanto, esta revisão foca em três aspectos que afetam a tolerância ao frio na tilápia-do-nilo: dieta e seus aditivos, danos oxidativos causados pela temperatura e pelos ácidos graxos e genética.

1.1 DIETAS DE INVERNO

Embora existam vários estudos sobre as exigências nutricionais para a tilápia-do-nilo, são limitadas as pesquisas focadas em exigências nutricionais para mitigar o estresse por baixa temperatura. A nutrição pode melhorar a tolerância térmica dos peixes, como relatado para muitas outras espécies comerciais, como o catfish, *Ictalurus punctatus* (MURRAY et al., 1977), a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (MÉDALE et al., 1995), a carpa-comum (YAMAMOTO et al., 2003) e o salmão do Atlântico, *Salmo salar* (JOBBLING, 1994).

A temperatura da água desempenha um papel particularmente importante no metabolismo lipídico em peixes (GLENCROSS, 2009). Quando os peixes são mantidos em temperaturas subótimas frias, o lipídio tem função crucial na construção das membranas celulares, para manter a fluidez e a permeabilidade das células (WEBER; BOSWORTH, 2005). A suplementação dietética de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) (CORRÊA et al., 2017, 2018; NOBREGA et al., 2017, 2019) pode melhorar a tolerância térmica dos peixes contra à baixa temperatura da água (NOBREGA et al., 2020).

1.1.1 Ácidos graxos poli-insaturados em dietas de inverno

A temperatura afeta as exigências alimentares de ácidos graxos em animais ectotérmicos, como peixes. No entanto, estudos com foco em nutrição de ácidos graxos para a tilápia-do-nilo produzidos em temperatura subótima são escassos e com pouco resultados significativos (**Tabela 1**). As dificuldades comuns incluem o estabelecimento de uma temperatura adequada de estudo, a duração do período de alimentação e a proporção de ácidos graxos na dieta que permitirá o crescimento dos peixes (BOZAOGLU; BILGUVEN, 2012;

TAKEUCHI et al., 1983; TESHIMA et al., 1982). Estudos realizados nos últimos anos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI-UFSC) mostram que o crescimento e a eficiência alimentar da tilápia-do-nilo produzida em temperatura subótima fria melhora quando os peixes são alimentados com dietas contendo PUFA da série n-3 (CORRÊA et al., 2017, 2018; NOBREGA et al., 2017, 2019).

Tradicionalmente, é considerado que a tilápia-do-nilo criada em temperatura ideal de crescimento de 28°C tem exigência alimentar em ácido alfa-linolênico (18: 3 n-3, α -LNA) e / ou ácido linoleico (18: 2 n-6, LOA) (CHEN et al., 2013; TAKEUCHI et al., 1983). Por exemplo, uma relação de ácidos graxos das séries n-3 / n-6 na dieta entre 0,2 e 2,9, com um total de PUFA em 1,30% da dieta seca, não afetou o crescimento de juvenis de tilápia-do-nilo quando mantidos em temperatura ideal (MUFATTO et al., 2019). No entanto, o crescimento e a eficiência alimentar foram melhorados quando a tilápia foi alimentada com dietas contendo óleo de peixe, rico em PUFA da série n-3 de cadeia longa (LC-PUFA n-3, ≥ 20 carbonos), a 22°C (CORRÊA et al., 2017, 2018) ou mesmo a 25°C (ABDEL-GHANY et al., 2019), se comparados aos peixes alimentados com dietas com outras fontes de lipídios ricos em LOA ou α -LNA. Em tilápia-do-nilo da linhagem egípcia foi avaliada com a suplementação dietética de 7 g kg⁻¹ de óleo de linhaça, óleo de peixe, óleo de milho ou óleo de girassol, mas com com uma dieta prática contendo 40 g kg⁻¹ de farinha de peixe (fonte de LC-PUFA da série n-3) para todos os tratamentos. Após 14 dias de alimentação, os peixes mantidos à 21,5 \pm 1,5°C e alimentados com óleo de linhaça (rico em α -LNA) ou óleo de milho (rico em LOA), apresentaram melhor crescimento (EL ASELY et al., 2020). No entanto, no mesmo estudo em baixa temperatura, a tilápia alimentada com óleo de peixe ou óleo de linhaça teve maior atividade da amilase intestinal comparado aos alimentados com óleo de girassol, o que sugere que PUFAs da série n-3 podem melhorar a digestibilidade do amido quando os peixes são mantidos em temperatura subótima fria. Da mesma forma, a exigência alimentar de α -LNA para um crescimento ótimo da tilápia-do-nilo foi maior (0,68 a 0,70 g 100 g⁻¹ do peso seco da dieta) em temperatura subótima fria de 22°C (NOBREGA et al., 2017), quando comparada à exigência em temperatura ótima de 28°C (0,45 a 0,64 g 100 g⁻¹ do peso seco da dieta) (CHEN et al., 2013). Ressalta-se ainda que, em ambos os estudos, o conteúdo total de PUFA na dieta foi semelhante, entre 1,23 e 1,25 g 100 g⁻¹ de peso seco. Assim, em temperaturas abaixo do ideal, a tilápia-do-nilo exige proporções alimentares mais elevadas de ácidos graxos n-3 / n-6. Uma fonte alternativa para a suplementação dietética de LC-PUFA da série n-3 para as tilápias é a farinha de *Aurantiochytrium* sp, rico em de ácido docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA), ingrediente que

na faixa de 0,45 a 1,42 g 100 g⁻¹ da dieta seca promoveu maior crescimento e eficiência alimentar, da tilápia-do-nylo produzida a 22°C (NOBREGA et al., 2019).

Vários estudos mostram claramente que uma dieta rica em ácidos graxos saturados (SFA) dificulta o crescimento da tilápia-do-nylo a uma temperatura abaixo do ideal de crescimento, assim como ocorre para outras espécies de peixes (ABDEL-GHANY et al., 2019; CORRÊA et al., 2017; NG et al., 2004; NOBREGA et al., 2020; TAKEUCHI et al., 1983; TURCHINI et al., 2009). Estas pesquisas demonstram a importância de incluir fontes de PUFA em formulações comerciais para as tilápias, quando mantidas em temperaturas subótimas frias. Segundo Turchini et al. (2009), os lipídios exercem pouca influência na palatabilidade da dieta para a tilápia, mas, em geral, os SFA apresentam menor digestibilidade que os PUFAs. Um alto teor de SFA nas dietas pode afetar negativamente a digestibilidade dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), dos PUFA, do total de lipídios bem como das proteínas da dieta. Esse efeito negativo é ainda mais forte em temperaturas subótimas frias, conforme relatado por Nobrega et al. (2019). Nos SFAs, a digestibilidade do ácido palmítico (16:00) diminuiu de 70,81% a 28°C (FERNANDES et al., 2019) para 52,25% a 22°C (NOBREGA et al., 2019). Por outro lado, a baixa digestibilidade das dietas com alto percentual de SFA pode explicar o baixo desempenho de crescimento da tilápia-do-nylo a 22°C quando alimentado com uma dieta com 5% de óleo de coco (CORRÊA et al., 2017). Segundo Turchini et al. (2009), dietas ricas em SFA perdem menos gordura na água devido ao seu alto ponto de fusão, mas isso também pode diminuir a digestão e absorção dos lipídios pelos peixes. Ao avaliar a digestibilidade dos grupos de ácidos graxos MUFA e SFA da farinha de *Aurantiochytrium* sp. para tilápia-do-nylo a 22°C, registramos digestibilidade tão baixa quanto 15% e 52%, respectivamente (NOBREGA et al., 2019). Em geral, dietas com altos níveis de SFA tem óleos com menor fluidez e maior viscosidade, o que afeta negativamente a digestibilidade e o metabolismo lipídico em peixes (NOBREGA et al., 2019). Além disso, a digestibilidade proteica e lipídica da farinha de *Aurantiochytrium* sp. para a tilápia-do-nylo a 22°C (Nobrega et al., 2019) diminuiu cerca de 20% quando comparada aos peixes alimentados a 28°C (FERNANDES et al., 2019). Por outro lado, todos os PUFA apresentaram alto coeficiente de digestibilidade, não apenas na temperatura ideal, mas também na temperatura subótima. A 22°C, todos os PUFAs da farinha de *Aurantiochytrium* sp. apresentaram alta digestibilidade para a tilápia-do-nylo, variando de 96 a 100% (NOBREGA et al., 2019). Resultados semelhantes também foram relatados no salmão-do-atlântico (*Salmo salar*), quando mantido a 8,8°C, temperatura abaixo do ideal para a espécie (KOUSOULAKI et al., 2016).

Tabela 1. Resumo dos estudos em exigências de ácidos graxos essenciais para a tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) em temperatura subótima.

Ácidos graxos ¹	Fonte lipídica na dieta	Temperatura °C	Período semanas	Principais resultados	Referência
LOA, α -LNA, ARA, LC-PUFA n-3	4% MUFA como base lipídica + 1% PUFA testado. Ambas fontes purificadas	20	4	Baixo ganho de peso, sem diferenças significativas nos dados de crescimento	Teshima et al., 1982
LOA, α -LNA, ARA	4% SFA como base lipídica + 1% PUFA testado. Ambas fontes purificadas	20	9	Baixo consumo de ração, baixo ganho de peso, excesso de SFA na dieta	Takeuchi et al., 1983
LOA, α -LNA, LC-PUFA n-3, SFA	6,40% óleo de peixe ou 8,2% óleo de soja ou 8,2% óleo de linhaça ou 8,2% sebo bovino	22	14	Não há diferenças significativas no crescimento. Óleo de peixe com concentração baixa de n-3 LC-PUFA	Bozaoglu; Bilguven, 2012
LOA e α -LNA	Mix de 0,19% óleo de palmiste, 3,09% óleo de oliva, 0,32% óleo de girassol e 1,40% óleo de linhaça	22	14	Melhorou significativamente o ganho de peso, retenção aparente de proteínas e eficiência alimentar	Nobrega et al., 2017
PUFA n-3	5% óleo de fígado de bacalhau	22	12	Melhorou significativamente o ganho de peso, retenção aparente de proteínas e eficiência alimentar	Corrêa et al., 2018
LOA e DHA	1,65% banha suína e 1% farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp.	22	13	Melhorou significativamente o ganho de peso, retenção aparente de proteínas e eficiência alimentar	Nobrega et al., 2019
LC-PUFA n-3, mix de LC-PUFA n-3 e LOA	4% óleo de peixe ou mix de 2% óleo de peixe com 2% óleo de milho	25	8	Melhorou significativamente o ganho de peso	Abdel-Ghany et al., 2019
PUFA n-3 e LOA	40 g kg ⁻¹ farinha de peixe e 7 g kg ⁻¹ óleo de linhaça	21,5	2	Melhorou significativamente o desempenho zootécnico, atividade intestinal da amilase e hormônio do crescimento	El Asely et al., 2020
PUFA n-3 e LOA	40 g kg ⁻¹ farinha de peixe e 7 g kg ⁻¹ óleo de milho	21,5	2	Melhorou significativamente o desempenho zootécnico	El Asely et al., 2020

¹ LOA (18:2 n-6) = ácido linoleico, α -LNA (18:3 n-3) = ácido alpha-linolênico, ARA (20:4 n-6) = ácido araquidônico, DHA (22: 6 n-3) = ácido docosaexaenoico, grupo dos ácidos graxos: SFA = ácidos graxos saturados, MUFA = ácidos graxos monoinsaturados, PUFA = ácidos graxos poli-insaturados, LC-PUFA = PUFA de cadeia longa (com 20 a 22 carbono).

Muitos autores relataram que os PUFAs da série n-3 na dieta podem aumentar a produtividade e melhorar a saúde dos peixes criados em temperaturas abaixo do ideal (ABDELGHANY et al., 2019; CORRÊA et al., 2018; LIMA DE ALMEIDA et al., 2019; NOBREGA et al., 2019). No entanto, foi relatado que o excesso de α -LNA na dieta, presente no óleo de linhaça, influencia negativamente o crescimento, a eficiência alimentar e a as defesas antioxidante da tilápia-do-nylo mantida em temperatura ideal e subótima fria (CHEN et al., 2013; NOBREGA et al. 2017). Da mesma forma, o excesso de PUFA da série n-3 ou LC-PUFA n-3 reduziu a resistência à infecção contra *Edwardsiella ictaluri* em catfish alimentado com óleo de linhaça ou óleo de menhaden, respectivamente, a 28°C, talvez devido à inibição competitiva do metabolismo do ácido araquidônico (20:4 n-6, ARA) pelo ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA), como ocorre em animais de sangue quente (FRACALOSSO; LOVELL, 1994). No entanto, a 17°C, não houve diferença na sobrevivência quando os peixes foram alimentados com as diferentes fontes lipídicas. Além disso, um excesso de LC-PUFA da série n-3 na dieta teve pouca influência na tolerância da tilápia a uma rápida redução na temperatura (0,6°C dia⁻¹), mas, neste estudo, os peixes foram alimentados com as dietas experimentais por apenas 14 dias (ATWOOD et al., 2003).

Atualmente, há uma escassez de ingredientes ricos em PUFA da série n-3 em rações de espécies onívoras de água-doce, como a tilápia-do-nylo, devido às restrições de custos. No entanto, tal prática deve ser revisada, especialmente em temperaturas baixas, pois nessas condições a tilápia-do-nylo tem uma maior exigência dietética de PUFA da série n-3.

As pesquisas de ácidos graxos dietéticos em espécies de peixes tropicais produzidos em temperatura subótima fria devem levar em consideração: 1) usar uma temperatura baixa que ainda permita ingestão alimentar e o crescimento adequados para permitir comparações entre as dietas experimentais; 2) a duração do teste de alimentação deve ser tal que permita o crescimento de cerca de dez vezes o peso inicial, principalmente para os peixes juvenis; e 3) escolher cuidadosamente o tipo e a proporção de fontes lipídicas da dieta para permitir uma faixa adequada de perfis de ácidos graxos dietéticos. Além disso, trabalhos à campo devem ser realizados para validar os custos e os benefícios da suplementação de ingredientes ricos em PUFA da série n-3 em dietas de inverno para tilápia-do-nylo, considerando a obtenção de um produto de maior valor nutricional e valor agregado, rico em ácidos graxos da série n-3, para atender à demanda do mercado.

1.2 EFEITO DA TEMPERATURA NO DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DA TILÁPIA-DO-NILO

A mortalidade no inverno é um importante impacto econômico negativo quando espécies tropicais, como a tilápia-do-nylo, são criadas em regiões temperadas ou subtropicais (DAN; LITTLE, 2000; FAWZIA et al., 2016; MA et al., 2015; SHI et al., 2015; SIFA et al., 2002; SUN et al., 1992). A faixa ideal de temperatura para a produção de tilápia-do-nylo é de 26 a 30°C (AZAZA et al., 2008; MA et al., 2015). No entanto, existem discrepâncias em relação aos efeitos relatados da temperatura subótima fria para essa espécie. Estudos relataram que a tilápia-do-nylo cessou a alimentação entre 16 e 13°C (ABDEL-GHANY et al., 2019) ou entre 18 e 13°C (ATWOOD et al., 2003) ou abaixo de 20°C (WOHLFARTH; HULATA, 1983). Além disso, o movimento voluntário cessou a 9°C, e a faixa de temperatura letal foi de 10 a 6°C (ABDEL-GHANY et al., 2019) ou 9,8 a 7,4°C (SIFA et al., 2002). Outros estudos relataram que a tilápia-do-nylo não sobreviveu por mais de alguns dias quando submetida a temperaturas de 10 a 12°C (CHARO-KARISA et al., 2005). Também é relatado que a reprodução parou a 22°C (WOHLFARTH; HULATA, 1983) ou em temperaturas menores que 20°C (ABDEL-AAL, 2008). Estudos com a tilápia-do-nylo da linhagem GIFT, obtidos em fazendas localizadas na região de Santa Catarina e submetidos a uma temperatura subótima fria de 22°C, tiveram uma redução de 40 a 50% no consumo de ração, o que levou a uma significativa redução no crescimento, quando comparado aos peixes mantidos a uma temperatura ideal de 28°C (CORRÊA et al., 2017, 2018; MA et al., 2015). No entanto, a mortalidade aumentou significativamente em temperaturas em torno de 10°C para a tilápia-do-nylo. Tais discrepâncias nos efeitos da temperatura são esperadas, pois vários estudos demonstraram que o grau de tolerância térmica na tilápia-do-nylo depende de fatores nutricionais, genéticos, ambientais e de práticas de manejo, tais como criação em sistemas salinizados ou tecnologia de bio-flocos (ABDEL-GHANY et al., 2019; AZAZA et al., 2008; CHARO-KARISA et al., 2005; HASSAN et al., 2013; MA et al., 2015; MABDEL-AAL, 2008; NOBREGA et al., 2020; SIFA et al., 2002; SOLTAN et al., 2015).

Como relatado para muitas espécies ectotérmicas, a aclimação e a nutrição podem estender suas faixas de tolerância térmica (ABDEL-GHANY et al., 2019; CHARO-KARISA et al., 2005). Por exemplo, as temperaturas letais mais baixas de 8,75°C para a tilápia-do-nylo relatadas por Abdel-Ghany et al. (2019) foram influenciadas por uma maior inclusão alimentar de LC-PUFA da série n-3 e PUFA da série n-6. Porém, mais pesquisas são necessárias para verificar com maior precisão a relação entre a nutrição e outros fatores como a genética, efeitos ambientais, bem como o imunológicos, e como estas relações interferem no grau de tolerância ao frio para tilápia-do-nylo.

1.3 DANOS OXIDATIVOS E VARIAÇÃO TÉRMICA

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes a ser considerado na aquicultura. Qualquer variação na temperatura da água, acima ou abaixo da temperatura de conforto para a espécie, pode afetar negativamente o metabolismo e enfraquecer o sistema de defesa imune inespecífico, comprometendo o comportamento alimentar, o crescimento e causando aumento nas taxas de mortalidade (IBRAHIM, 2019; QUI et al., 2011; MA et al., 2015; MURATORI et al., 2001; SHI et al., 2015; SUN et al., 1992). Para a tilápia, o estresse térmico é maior durante o inverno, onde há um período prolongado de frio e, na primavera e outono, quando há grande amplitude térmica diária (JERÔNIMO et al., 2011; IBRAHIM, 2019).

O estresse causado pela variação na temperatura da água pode aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BAGNYUKOVA et al., 2007; QUI et al., 2011). As ROS são consideradas como parte do metabolismo normal das células, desempenhando um papel vital em vários eventos celulares, como crescimento celular, apoptose e sinalizações (LUO et al., 2014). Altos níveis de produção de ROS podem sobrecarregar as defesas antioxidantes, levando a danos oxidativos importantes em biomoléculas, como DNA, lipídios e proteínas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; MOLDOGAZIEVA et al., 2019). As ROS são instáveis e altamente reativas, incluindo ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íons de hidroxila (OH^-), os quais estão relacionados ao consumo de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O sistema de defesa antioxidante responsável pela proteção celular contra a ação de ROS é formado por um conjunto de enzimas, tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), além daquelas associadas ao ciclo catalítico da glutatona: glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR), além das defesas antioxidantes não enzimáticas, como a própria glutatona e as vitaminas A, E e C, entre outros (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Portanto, a ocorrência de um estresse oxidativo, geralmente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, uma vez que a alta produção de ROS pode causar danos moleculares e celulares significativos (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Consequentemente, os níveis das enzimas antioxidantes citadas acima têm sido amplamente utilizados como indicadores de alerta de danos oxidativos (DAWOOD et al., 2020). Porém, a ausência de dano oxidativo nas biomoléculas, não indica a ausência de enzimas antioxidantes. Quando as células estão em estado de equilíbrio, produzindo ROS dentro da faixa fisiológica normal, as proteínas e os lipídios danificados por oxidação não se acumulam. Somente a produção excessiva de ROS pode modificar e provocar o acúmulo das biomoléculas oxidadas (SIES, 1997).

A adaptação dos peixes ao frio afeta vários processos bioquímicos e fisiológicos, tais como o acúmulo de gordura corporal e a mobilização dos PUFAs das vísceras para outros tecidos do corpo (DAN; LITTLE, 2000; VIOLA et al., 1988). Os peixes, sendo ectotérmicos, aumentam os níveis de insaturação de ácidos graxos nos fosfolipídios para manter a fluidez e a permeabilidade das membranas celulares em temperatura subótima fria (WEBER; BOSWORTH, 2005; TURCHINI et al., 2009), os quais, conseqüentemente, se tornam alvo para a ação de ROS. De acordo com Rady et al. (1993), Tocher (2003) e Ma et al. (2015), o acúmulo corporal de PUFA (principalmente n-3 PUFA) e MUFA em peixes é típico em baixas temperaturas, enquanto a síntese de SFA aumenta e o acúmulo de PUFA diminui, em temperaturas altas. Tais adaptações garantem a funcionalidade das membranas (TURCHINI et al., 2009). Portanto, os PUFAs são alvos principais dos ataques de ROS, peixes mantidos em temperatura subótima fria podem apresentar um aumento nos danos oxidativos e conseqüentemente maior demanda para defesas contra a peroxidação lipídica (BAGNYUKOVA et al., 2007; QIU et al., 2011).

Contudo, em ectotérmicos, quando há um aumento na temperatura ambiente, também há um aumento nos danos oxidativos (BAGNYUKOVA et al., 2007; HEISE et al., 2006), os quais estão relacionados a maior taxa metabólica e ao maior consumo de oxigênio (SOLLID; NILSSON, 2006). Portanto, a intensificação da respiração em temperaturas altas, quando os peixes apresentam condições fisiológicas ativas e maior consumo alimentar, resulta em maior produção de ROS, aumento dos níveis de oxidação proteica e a peroxidação lipídica (BAGNYUKOVA et al., 2007).

Por fim, para um melhor gerenciamento da aquicultura, é crucial entender como o organismo dos peixes reagem ao estresse oxidativo elevado, avaliando as alterações fisiológicas e metabólicas dos peixes quando expostos a condições de inverno e transição térmica, típica no período entre primavera e verão.

1.4 DANOS OXIDATIVOS E A SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE PUFA

Há relatos sugerindo que a inclusão alimentar de óleo de peixe oxidado (HUANG; HUANG, 2004; Gao et al., 2012) ou mesmo de óleos não oxidados (RADY et al., 1990; HUANG et al., 1998) pode induzir a danos oxidativo nos tecidos de peixes.

O dano oxidativo às biomoléculas é provocado quando há aumento na produção de ROS, que supera mecanismos antioxidantes e resulta em danos nas células e nos tecidos (BIANCHI; ANTUNES, 1999). É sabido que LC-PUFA da série n-3 como o DHA, são mais suscetíveis à

peroxidação, sendo que um maior aporte deste nutriente na dieta pode ocasionar aumento nos danos oxidativos aos tecidos (OLSEN et al., 1999). As moléculas que mais sofrem peroxidação lipídica são os fosfolipídios de membrana contendo PUFAs, sendo os principais alvos do ataque de ROS (GEÇOTEK; SKRZYDLEWSKA, 2019). A formação de produtos relacionados à peroxidação lipídica pode afetar diretamente o funcionamento e a estrutura das membranas celulares onde são formados. Estes produtos são moléculas quimicamente reativas que podem facilmente comprometer o DNA, lipídios, peptídeos e proteínas, levando a distúrbios no metabolismo celular, que promovem mais danos oxidativos no organismo (GEÇOTEK; SKRZYDLEWSKA, 2019).

A suplementação dietética de PUFA, principalmente da série n-3, em dietas para espécies aquícolas, levará a um aumento nas exigências em vitaminas com propriedades antioxidantes (E, A, C), além de demandar a inclusão de compostos antioxidantes para evitar danos oxidativos bem como a um maior cuidado no armazenamento das dietas.

1.5 *Aurantiochytrium* sp. COMO ADITIVO PARA RAÇÕES AQUÍCOLAS

As duas principais fontes de DHA utilizadas na formulação de dietas para peixes provêm da farinha e do óleo de peixe (TURCHINI, 2009). Entretanto, atualmente se busca a substituição destes ingredientes, visto que são produzidos muitas vezes de forma insustentável, por meio da pesca extrativa (FAO, 2016). Diversos estudos buscam substituir tais ingredientes, mas poucos geraram resultados satisfatórios, principalmente pela ausência ou baixos níveis de LC-PUFA da série n-3 em ingredientes normalmente utilizados na elaboração de rações para peixes. Um ingrediente rico em DHA, não oriundo da pesca extrativista, é a farinha de *Aurantiochytrium* sp., que se encontra disponível comercialmente. Ainda há discussão entre os taxonomistas se *Aurantiochytrium* sp. é uma alga, pois originalmente foi classificada como um fungo primitivo, já que apresenta características de ambos (LEWIS et al., 1999; MARCHAN et al., 2018). No entanto, sabe-se que é um microrganismo heterotrófico encontrado no ambiente marinho, que compõe o grupo dos Thraustochytrids (GUPTA et al., 2012). *Schizochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp., *Thraustochytrium* sp. e *Ulkenia* sp. são microrganismos da família Thraustochytridiaceae, que têm sido estudados durante as últimas três décadas devido a sua alta produção de ácidos graxos da série n-3, em particular o DHA, além de uma pequena quantidade de LC-PUFA da série n-6 (GUPTA et al., 2012; MARCHAN et al., 2018). *Aurantiochytrium* sp. contém alto conteúdo lipídico, variando entre 55 a 75% na matéria seca, sendo que até 48% do total de ácidos graxos é DHA, o que o torna um produto

interessante para ser utilizado como fonte alternativa de LC-PUFA n-3 na indústria de rações aquícolas (GUPTA et al., 2012; MARCHAN et al., 2018). Entre as várias cepas destes microrganismos heterotróficos, a cepa de *Aurantiochytrium* sp. TC022 é a que apresenta maior conteúdo lipídico e DHA já relatado (MARCHAN et al., 2018). Os microrganismos *Schizochytrium* sp. e *Aurantiochytrium* sp. liberam zoósporos de formato parecido e as células vegetativas são geralmente dispersas como células únicas (MARCHAN et al., 2018). Tais semelhanças causam dificuldade para a adequada identificação destes microrganismos, sendo comum a classificação errônea dos mesmos.

A cultura em grande escala destes microrganismos parece ser apropriada para produção de aditivos para rações comercial, pois apresentam rápido crescimento e processamento relativamente simples (MILLER et al., 2007; GUPTA et al., 2012; SPRAGUE et al., 2015). A biomassa seca de *Aurantiochytrium* sp. é utilizada para a produção de uma farinha comercial (aditivo), a qual é obtida por meio de um processo de fermentação heterotrófico, resultando em um ingrediente lipídico (**Tabela 2**). O processo de extração é baseado na hidrólise celular e não utiliza solventes orgânicos (RATLEDGE; LIPPMEIER, 2017). A empresa Alltech[®] Inc. (Nicholsville, KY, EUA) produzia um produto comercial chamado ALL-G-RICH[®]; porém, em 2018, sua produção foi interrompida. Entretanto, há relatos que um consórcio entre as empresas Royal DSM[®] (Heerlen, Países Baixos) e Evonik[®] (Essen, Alemanha) produz um ingrediente rico em PUFAs da série n-3, oriundo de microrganismos do grupo dos Thraustochytrids, o qual é empregado na formulação de rações da empresa Skretting[®] (Sjöhagen, Stavanger, Noruega) (RATLEDGE; LIPPMEIER, 2017; SKRETTING, 2016). Ainda, o grupo Cargill[®] (Minneapolis, MN, EUA) está investindo nos mesmos microrganismos na produção de aditivo para rações aquícolas (RATLEDGE; LIPPMEIER, 2017).

A farinha de *Aurantiochytrium* sp. já foi testada com sucesso em dietas para tilápia-do-nylo (BRIGNOL et al., 2018; FERNANDES et al., 2018), bem como para salmão-do-atlântico (SPRAGUE et al., 2015), truta-arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (FILER, 2013), garoupa, *Epinephelus lanceolatus* (GARCÍA-ORTEGA et al., 2016), totoaba, *Totoaba macdonaldi* (MATA-SOTRES et al., 2018) e para a garoupa alaranjada, *Pinephelus coioides* (LEE et al., 2018), sem prejudicar o crescimento dos peixes, quando produzidos em temperaturas ótimas de criação para cada espécie. Do mesmo modo, a substituição de 100% do óleo de peixe pela farinha de *Aurantiochytrium* sp. na dieta do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei*, proporcionou excelentes resultados de desempenho em crescimento e acúmulo corporal de ácidos graxos da série n-3, quando criados em temperatura ótima de crescimento

(GUIMARÃES et al., 2019). Assim, a farinha de *Aurantiochytrium* sp. tem se mostrado uma alternativa eficaz e sustentável ao óleo de peixe como ingrediente para ração de espécies aquícolas.

Recentemente, foi realizado um estudo, a 22°C, onde diferentes inclusões dietéticas da farinha de *Aurantiochytrium* sp. afetaram positivamente o desempenho de crescimento da tilápia-do-nilo (NOBREGA et al., 2019 – primeiro artigo desta tese). A suplementação dietética da farinha de *Aurantiochytrium* sp. na faixa de 0,45 a 1,42 g 100 g⁻¹ da dieta seca foi suficiente para promover maior crescimento, bem como melhorar a composição lipídica corporal, com aumento de DHA e razão PUFA n-3/n-6 no músculo (NOBREGA et al., 2019) e no corpo (BATISTA, 2019) dos peixes. Além disso, a tilápia-do-nilo alimentada com farinha de *Aurantiochytrium* sp. apresentou melhoria nas características morfofisiológicas no intestino e hepatopâncreas (BATISTA, 2019), resultados que corroboram o maior crescimento relatado por Nobrega et al. (2019).

Tabela 2. Composição da farinha de *Aurantiochytrium* sp. (All-G-Rich[®]), analisado no laboratório de nutrição de espécies aquícolas (LABNUTRI) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Composição¹	g 100 g⁻¹ do peso seco
Matéria seca	96,85
Proteína bruta	70,36
Extrato etéreo	11,72
Cinzas	3,35
16:0 PAL	33,67
22:4 n-6	2,86
20:5 n-3 EPA	0,22
22:6 n-3 DHA	15,81
∑SFA	38,93
∑MUFA	0,75
∑PUFA	19,60
∑PUFA n-6	3,07
∑PUFA n-3	16,49

¹ PAL = ácido palmitoleico, EPA = eicosapentaenoico, DHA = ácido docosaenoico, grupo dos ácidos graxos: SFA = ácidos graxos saturados, MUFA = ácidos graxos monoinsaturados, PUFA = ácidos graxos poli-insaturados.

Peixes alimentados com 1 g 100 g⁻¹ da dieta seca de farinha de *Aurantiochytrium* sp. apresentaram maior crescimento, eficiência alimentar e retenção de proteína do que peixes alimentados com dieta suplementada com quantidade semelhante de DHA, mas oriundo de OFB. A suplementação alimentar de 1 g de AM 100 g⁻¹ da dieta seca promoveu 5% a mais de crescimento do que a inclusão de 2 g 100 g⁻¹ de OFB, além de promover 16% mais crescimento em comparação com a tilápia alimentada com a dieta sem suplementação de DHA (NOBREGA et al., 2019). Em estudo anterior da equipe do LABNUTRI, também a 22°C, a tilápia-do-nilo já apresentava um ganho de peso 18% superior quando alimentada com dietas contendo óleo de peixe, rico em LC-PUFA da série n-3, se comparada com o ganho em peso de tilápia alimentada com dietas contendo misturas de óleos vegetais, ricos em LOA ou α -LNA (CORRÊA et al., 2018).

1.6 OBJETIVO

1.6.1 Objetivo Geral

Determinar o melhor nível de suplementação de farinha comercial de *Aurantiochytrium* sp. na dieta de tilápia-do-nilo, que aprimore o desempenho zootécnico, sem promover estresse oxidativo, durante e após o inverno.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o desempenho zootécnico de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dieta suplementada com farinha de *Aurantiochytrium* sp., em temperatura subótima de 22°C.
- Analisar a digestibilidade da matéria seca, da fração proteica e lipídica e dos ácidos graxos da farinha de *Aurantiochytrium* sp., em temperatura subótima de 22 °C.
- Medir o acúmulo corporal de DHA, após alimentação com dietas suplementadas com farinha de *Aurantiochytrium* sp., em temperatura subótima de 22 °C.
- Investigar os danos oxidativos celulares em tilápia-do-nilo, após alimentação com dietas suplementadas com farinha de *Aurantiochytrium* sp., em temperatura subótima fria seguida de aumento de temperatura, simulando a chegada da primavera.

2. ARTIGO 1

Este artigo foi publicado no periódico *Aquaculture*, em abril de 2019 (<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.030>).

Dietary supplementation of *Aurantiochytrium* sp. meal, a docosahexaenoic-acid source, promotes growth of Nile tilapia at suboptimal low temperature

Renata Oselame Nobrega ¹, Rosana Oliveira Batista ¹, Camila Fernandes Corrêa ², Bruna Mattioni ¹, Keith Filler ³, James Pettigrew ⁴, Débora Machado Fracalossi ^{1*}

¹ Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil.

² Polo Regional Vale do Ribeira, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Pariquera-Açu, SP, Brasil.

³ Alltech, Inc., 3031 Catnip Hill Road, Nicholasville, KY, USA.

⁴ Pettigrew Research Services, Inc., Champaign, IL, USA.

* Autor correspondente: Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346. CEP: 88034-001 Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: debora.fracalossi@ufsc.br. Telefone/Fax: +55 48 3721 6300.

RESUMO

As informações sobre as exigências de ácidos graxos para a tilápia-do-nylo, criadas em temperaturas subótima fria são escassas. Animais ectotérmicos, como a tilápia, tendem a aumentar o grau de insaturação nos ácidos graxos da membrana em baixas temperaturas para manter a função da membrana celular. Portanto, juvenis de tilápia tilápia-do-nylo ($8,47 \pm 0,19$ g) foram alimentados, a uma temperatura subótima fria de 22°C, com quatro concentrações diferentes de farinha de *Aurantiochytrium* sp. (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 g 100 g⁻¹ dieta seca), uma fonte de ácido docosahexaenoico (22: 6 n-3, DHA), além de uma dieta sem a inclusão do aditivo, para avaliar o seu efeito no crescimento, retenção de nutrientes e digestibilidade. Também incluímos uma dieta de controle positivo com óleo de fígado de bacalhau (OFB), contendo uma concentração de DHA semelhante à dieta suplementada com 1,0 g 100 g⁻¹ de farinha de *Aurantiochytrium* sp., para permitir a comparação de duas fontes dietéticas ricas em DHA. Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais duas vezes ao dia até a saciedade aparente por 87 dias. O aumento da suplementação dietética de farinha de *Aurantiochytrium* sp. afetou positivamente o crescimento, a eficiência alimentar, a retenção de proteínas e o conteúdo de DHA no músculo. Peixes alimentados com farinha de *Aurantiochytrium* sp. apresentaram maior ganho de peso significativo quando comparados aos peixes alimentados com a dieta OFB. A suplementação dietética de farinha de *Aurantiochytrium* sp. também influenciou positivamente o perfil de ácidos graxos da série n-3 no músculo da tilápia-do-nylo, resultando em maiores concentrações de DHA. Os peixes alimentados com a dieta OFB acumularam significativamente mais DHA, em comparação com as tilápias alimentadas com 1,0 g 100 g⁻¹ de farinha de *Aurantiochytrium* sp. A digestibilidade dos nutrientes da farinha de *Aurantiochytrium* sp. foi determinada em peixes de peso inicial de $16,01 \pm 0,68$ g, a 22 ° C. O

DHA apresentou alta digestibilidade (96,05%) para tilápia-do-nilo, mesmo em temperaturas subótima fria, mas a digestibilidade das proteínas, lipídios e ácidos graxos saturados foram baixas. Neste estudo, descobrimos que a suplementação de farinha de *Aurantiochytrium* sp. em 0,43 a 1,00 g de dieta seca 100⁻¹ para tilápia-do-nilo mantida a 22°C resultou em melhor crescimento, eficiência alimentar, composição lipídica corporal e adequada relação de ácidos graxos poli-insaturados das séries n-3 / n-6 no músculo para o consumo humano.

Palavras-chaves: DHA, digestibilidade de ácidos graxos, *Oreochromis niloticus*, suplementação dietética, temperatura baixas.

2.1 INTRODUÇÃO

A tilápia-do-nilo é o quarto peixe mais cultivado no mundo e produzido em todos os continentes (FAO, 2018). A produção de tilápia-do-nilo aumentou 65,55% entre 2010 e 2016, o que afetou positivamente a aquicultura global de água doce, promovendo o consumo de peixes e a criação de empregos (FAO, 2018). Apesar de ser uma espécie tropical, a tilápia-do-nilo é cultivada em muitas regiões subtropicais ao redor do mundo, onde há grandes variações de temperatura ao longo do ano (FAO, 2018). A faixa ideal de temperatura para a tilápia-do-nilo é de 26 a 30°C; abaixo de 16 – 13°C a alimentação cessa e, abaixo de 9°C o movimento voluntário cessa (Ma et al., 2015). Recentemente, verificou-se que a temperatura letal para a tilápia-do-nilo está entre a faixa 10 a 6°C, esse resultado é influenciado pelo perfil de ácidos graxos dietético (Abdel-Ghany et al., 2019). Assim, dietas preparatórias devem ser uma ferramenta valiosa para melhorar o crescimento e o bem-estar da tilápia-do-nilo antes do inverno.

Temperaturas subótima frias foram relatadas em todo o mundo como causadoras de impactos negativos na produção da tilápias (Pimolrat et al., 2013; Ma et al., 2015; Shi et al., 2015). Quando a tilápia-do-nilo é submetida a uma temperatura subótima fria de 22°C, ocorre uma redução no consumo de ração, o que leva a redução significativa no crescimento, quando comparado aos peixes mantidos a uma temperatura ideal de 28°C (Azaza et al, 2008; Ma et al., 2015; Corrêa et al., 2017; Corrêa et al., 2018).

Mudanças na temperatura ambiente têm uma influência crucial em animais ectotérmicos, como os peixes. Para manter sua função fisiológica em temperaturas desfavoráveis frias, os peixes aumentam os níveis de insaturação dos ácidos graxos dos fosfolipídios que compõem suas membranas celulares (Weber e Bosworth, 2005; Turchini et al., 2010). Estudos sobre a nutrição de ácidos graxos para a tilápia-do-nilo que enfrentam períodos de frio prolongado são fundamentais não apenas para aumentar a produtividade, mas

também para manter e melhorar a saúde dos peixes, uma vez que os ácidos graxos são responsáveis pela funcionalidade de todas as membranas celulares.

Embora existam numerosos estudos sobre nutrição para a tilápia-do-nilo, é necessário um melhor entendimento de suas exigências em ácidos graxos e do metabolismo (Tocher, 2010). Até o momento, os ácidos graxos considerados essenciais para a tilápia-do-nilo, criados à temperatura ótima de crescimento, são o ácido alfa-linolênico (18: 3 n-3, α -LNA) e o ácido linoleico (18: 2 n-6, LOA) (Takeuchi et al., 1983; Chen et al., 2013). Entretanto, em temperaturas subótimas frias, o crescimento e a eficiência alimentar foram melhorados quando a tilápia-do-nilo alimentadas com dietas contendo óleo de peixe, ricos em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA), como principal fonte lipídica, em comparação a peixes alimentados com dietas suplementadas com outras fontes de lipídios, ricas em LOA ou α -LNA (Corrêa et al., 2017; Corrêa et al., 2018). Da mesma forma, a exigência dietética de α -LNA em tilápia-do-nilo foi maior quando criados em temperaturas subótima frias (Chen et al., 2013; Nobrega et al., 2017).

A estagnação da pesca, que conseqüentemente afeta a disponibilidade de farinha e óleo de peixe para as indústrias de ração animal, está criando uma demanda por fontes alternativas de LC-PUFA série n-3. *Schizochytrium* sp., *Aurantiochytrium* sp. e outros microrganismos da família Thraustochytriidae foram estudados nas últimas três décadas (Gupta et al., 2012; Marchan et al., 2018) devido à sua alta produção de ácidos graxos da série n-3 de 20 e 22 carbonos. *Aurantiochytrium* sp. é um microrganismo heterotrófico encontrado no habitat marinho, que cresce rapidamente, é facilmente processada e fabricada, tornando-o adequado para ser usado como fonte de ácido docosahexaenoico (22: 6 n-3, DHA) na indústria de rações (Gupta et al., 2012; Marchan et al., 2018). Entre as várias linhagens de *Aurantiochytrium* sp., a TC022 é a que apresenta o maior desempenho (Marchan et al., 2018). A farinha de *Aurantiochytrium* sp. foi testada com sucesso nas dietas da tilápia-do-nilo (Fernandes et al., 2018; Brignol et al., 2018) e para a garoupa alaranjada, *Pinephelus coioides* (Lee et al., 2018), sem prejudicar o crescimento de peixes criados a temperaturas ótimas.

Portanto, o presente estudo foi realizado para avaliar se diferentes inclusões dietéticas de farinha de *Aurantiochytrium* sp., como uma fonte de DHA, afetarão o crescimento e a composição muscular dos ácidos graxos da tilápia-do-nilo, a uma temperatura subótima fria. Também vamos avaliar a digestibilidade dos nutrientes da farinha de *Aurantiochytrium* sp. pela tilápia-do-nilo a temperatura subótima fria.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Desenho e dietas experimentais

A biomassa da farinha de *Aurantiochytrium* sp. seca é usada para produzir o ALL-G-RICH® (Alltech, Nicholasville, KY, EUA), um aditivo alimentar que é uma fonte de DHA (16 g 100 g⁻¹ do peso seco). Dietas isonitrogenadas e isoenergéticas com concentrações crescentes de farinha de *Aurantiochytrium* sp. ou óleo de fígado de bacalhau (OFB) foram formuladas para atender às exigências nutricionais de juvenis de tilápia-do-nilo (NRC, 2011) (**Tabela 3**). As quatro concentrações de farinha de *Aurantiochytrium* sp. utilizadas foram 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 g 100 g⁻¹ da dieta seca; uma dieta sem farinha de *Aurantiochytrium* sp. (0 g 100 g⁻¹ da dieta seca) foi incluída como controle negativo. As dietas foram distribuídas aleatoriamente nas unidades experimentais, resultando em cinco tratamentos dietéticos com cinco repetições por tratamento. Em adicional, uma dieta de controle positivo foi formulada com OFB, contendo uma concentração de DHA semelhante ao da farinha de *Aurantiochytrium* sp. com 1,0 g 100 g⁻¹ da dieta seca, para comparar as duas fontes lipídicas ricas em DHA, em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos e cinco repetições por tratamento.

Banha suína e óleo de milho foram utilizados para obter uma proporção semelhante de ácidos graxos saturados (SFA) e ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) da série n-6, nas dietas experimentais. Conseguimos manter as proporções semelhantes de alfa-linolênico (α -LNA) e o total de PUFA n-6 entre as dietas, mas a proporção entre SFA e ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) (**Tabela 3**) variou um pouco devido às características dos ingredientes. Para manter a composições próximas semelhantes entre as dietas, a farinha de *Aurantiochytrium* sp. foi substituída por banha suína, milho moído e farelo de soja.

Os ingredientes secos foram triturados (tela de 1 mm, moinho de martelos), peneirados (0,6 mm, peneira manual), pesados e homogeneizados em um misturador horizontal (Inbramaq, Ribeirão Preto, Brasil). Os óleos foram então incorporados e homogeneizados à mistura. A umidade foi ajustada para 21% com adição de água destilada para a extrusão em uma extrusora de parafuso simples Modelo MX40 (Inbramaq, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Os parâmetros de extrusão foram: temperatura 85°C, vazão a 20% da capacidade nominal, velocidade do parafuso 220 rpm, relação largura / diâmetro de 2,3 / 1, diâmetro do parafuso 92,5 mm, comprimento do cilindro 210 mm. Após a extrusão, os sedimentos foram secos em estufa de circulação de ar forçada (50°C) por 4 h. Pelletes de 1,5 a 2 mm foram obtidos no final do processo. Depois de secas, as dietas foram embaladas e armazenadas em recipientes hermeticamente fechados, protegidos da luz e mantidos em ambiente seco a 20°C para evitar a oxidação dos ácidos graxos.

Antes da preparação da dieta, todos os ingredientes foram analisados para determinar sua composição proximal, perfil de ácidos graxos e conteúdo energético. Os perfis de ácidos graxos nas dietas experimentais foram determinados no início e no final do experimento para garantir que não houvesse perdas devido à oxidação durante o período experimental.

Tabela 3. Formulação, composição próxima e perfil de ácidos graxos das dietas experimentais.

	Inclusão de farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp.					Óleo de fígado de bacalhau
	g 100 g ⁻¹					
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0	
<i>Ingrediente^a, g kg⁻¹ da dieta seca</i>						
Farelo de soja	473,8	471,6	472,0	469,9	465,9	477,4
Milho	321,7	320,0	316,0	315,6	305,0	314,1
Farinha de vísceras de aves	157,2	157,2	157,2	157,2	157,2	157,2
Outros ^b	28,3	28,3	28,3	28,3	28,3	28,3
Banha Suína	19,0	17,9	16,5	9,0	-	-
Óleo de milho	-	-	-	-	3,60	3,00
ALL-G-RICH [®]	-	5,0	10,0	20,0	40,0	-
Óleo de fígado de bacalhau	-	-	-	-	-	20,0
<i>Composição, g 100 g⁻¹ peso da dieta seca</i>						
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	4168	4251	4216	4257	4297	4168
Matéria seca	89,47	90,32	89,22	89,74	90,66	90,32
Proteína bruta	36,40	36,30	36,08	35,93	35,85	36,20
Lipídios	8,64	8,93	8,99	9,13	9,90	9,20
Cinzas	7,11	7,17	7,18	7,20	7,61	7,20
16:0 PAL	1,55	1,63	1,77	2,03	2,43	1,16
18:1 n-9 OLA	2,56	2,31	1,93	1,89	1,49	1,89
18:2 n-6 LOA	1,92	1,81	1,75	1,76	1,71	1,81
20:4 n-6 ARA	ND ^d	ND	ND	ND	ND	0,05
18:3 n-3 α-LNA	0,04	0,03	0,03	0,02	0,02	0,23
20:5 n-3 EPA	ND	ND	ND	0,01	0,02	0,17
22:5 n-3 DPA	ND	ND	ND	0,01	0,02	0,04
22:6 n-3 DHA	ND	0,09	0,20	0,38	0,75	0,23
SFA ^c	2,14	2,17	2,24	2,57	2,98	1,29
MUFA	3,02	2,72	2,28	2,26	1,80	2,65
PUFA	1,98	2,00	2,04	2,37	2,70	2,79
PUFA n-6	1,94	1,86	1,83	1,89	1,87	1,89
LC-PUFA n-6	0,02	0,06	0,08	0,13	0,16	0,08
PUFA n-3	0,04	0,13	0,21	0,47	0,84	0,83
LC-PUFA n-3	ND	0,09	0,20	0,45	0,82	0,54
n-3/n-6	0,02	0,07	0,12	0,25	0,45	0,44

^a Farelo de soja e milho fornecido pela Nicoluzzi Rações Ltda (Penha, Santa Catarina, Brasil). Farinha de vísceras de aves produzida pela Kabsa S.A. (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). Banha suína produzida pela Seara Alimentos S.A. (Itajaí, Santa Catarina, Brasil). ALL-G-RICH[®] produzido e fornecido pela Alltech Inc. (Nicholasville, Kentucky, USA) e importado pela Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda (Araucária, Paraná, Brasil). Óleo de milho “Suavit” produzido pela Cocamar Ltda (Maringá, Paraná, Brasil). Óleo de fígado de bacalhau “Möllers Tran”, produzido pela Orkla Health (Oslo, Østlandet, Norway).

^b Fosfato bicálcico (13,5 g kg⁻¹), Premix vitamínico-micromineral (10,0 g kg⁻¹), Bitartarato de colina (3,0 g kg⁻¹), Butil-hidroxitolueno (BHT) (1,0 g kg⁻¹), Treonina (0,80 g kg⁻¹); e o Premix vitamínico-micromineral (produzida pela Cargill, Campinas, São Paulo), composição por kg: ácido fólico 420 mg, ácido pantotênico 8.333 mg, BHT 25.000 mg, biotina 134 mg, sulfato de cobalto 27 mg, sulfato de cobre 1.833 mg, sulfato de ferro 8.000 mg, iodato de cálcio 92 mg, sulfato de manganês 3.500 mg, niacina 8,333 mg, selênio 100 mg, vitamina (vit.) A 1.666.670 UI, vit. B1 2.083 mg, vit. B12 5.000 mcg, vit. B2 4.166 mg vit. B6 3.166 mg, equivalente a ácido ascórbico 66.670 mg, vit. D3 666,670 UI, vit. E 16.666 UI, vit. K3 833 mg, sulfato de zinco 23.330 mg, inositol 50.000 mg, propionato de cálcio 250.000 mg.

^c Ácidos graxos: PAL = ácido palmitoleico, OLA = ácido oleico, LOA = ácido linoleico, ARA= ácido araquidônico, α -LNA = ácido alfa-linolênico, EPA = ácido eicosapentaenoico, DPA = ácido docosapentaenóico, DHA = ácido docosaenoico. Grupo dos ácidos graxos: SFA = ácidos graxos saturados, MUFA = ácidos graxos monoinsaturados, PUFA = ácidos graxos poli-insaturados, LC-PUFA = PUFA de cadeia longa (com 20 a 22 carbono).

^d Não detectados (<0.05% do total dos ácidos graxos).

2.2.2 Procedimento experimental

Juvenis de tilápia-do-nilo da linhagem GIFT, sexualmente invertidos para machos, com peso corporal inicial $8,47 \pm 0,19$ g (média \pm erro padrão), foram obtidos de uma piscicultura experimental da “Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina” (EPAGRI, Camboriú, SC, Brasil). O manejo dos peixes seguiu o protocolo n^o 5665210917, aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC). Os peixes foram inicialmente estocados em três tanques de 1000 L, todos conectados a um sistema aquícola de recirculação (RAS) de água doce, equipado com filtros mecânicos e biológicos, compressor de ar e trocador de calor. O fotoperíodo foi ajustado para 12 h.

Após cinco semanas, grupos de 25 peixes foram estocados aleatoriamente em 30 tanques (cada tanque é uma unidade experimental) de 100 L e aclimatados às condições de laboratório a 28°C na primeira semana. Na segunda semana, a temperatura da água foi reduzida gradualmente de 28°C para 22°C (1°C por dia) e, na terceira semana de aclimação, a temperatura da água foi mantida em 22°C. Durante o período de aclimação de três semanas, os peixes foram alimentados com dieta de controle negativo, sem suplementação de farinha de *Aurantiochytrium* sp.

Durante o período experimental de 87 dias, os peixes foram alimentados com suas respectivas dietas experimentais duas vezes ao dia (10:00 e 18:00 h) até a saciedade aparente. O fluxo da entrada de água nas unidades experimentais foi de 25 mL s⁻¹, proporcionando uma taxa de troca de água de oito vezes o volume total das unidades experimentais por dia. A ingestão de alimentos e a mortalidade foram registradas diariamente. Os parâmetros de qualidade da água foram medidos semanalmente, exceto a temperatura e o oxigênio dissolvido, monitorados diariamente. Os valores médios (\pm desvio padrão) foram os seguintes: temperatura $22,07 \pm 0,19$ °C; oxigênio dissolvido $7,74 \pm 0,48$ mg L⁻¹; pH $7,25 \pm 0,08$; salinidade $0,98 \pm 0,09$

g L⁻¹; alcalinidade 41,97 ± 6,03 CaCO₃ mg L⁻¹; dureza 1908,33 ± 90,64 CaCO₃ mg L⁻¹; amônia total 0,13, ± 0,10 mg L⁻¹; nitrito 0,06 ± 0,01 mg L⁻¹; nitrato 3,68 ± 0,33 mg L⁻¹. Os indicadores de qualidade da água estavam dentro dos níveis de conforto conhecidos para a tilápia-do-nylo (Popma e Lovshin, 1995), exceto a temperatura da água, que foi mantida a 22°C para simular as condições de inverno em regiões subtropicais.

2.2.3 Biometria e coleta amostral

No início e no final do teste de alimentação, que durou 87 dias, os peixes foram medidos individualmente quanto ao comprimento e ao peso corporal (precisão de 0,01 g). Eles também foram pesados a cada 30 dias para monitorar o crescimento. Antes das biometrias, todos os peixes foram submetidos a jejum de 24 horas e anestesiados com 100 mg L⁻¹ Eugenol® (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda, Ibiporã, PR, Brasil). As seguintes variáveis foram calculadas com os dados biométricos e do consumo de ração: ganho de peso (GP, g = peso final - peso inicial), ganho de peso diário (GPD, g dia⁻¹ = ganho de peso × dia⁻¹), taxa de crescimento específica (SGR, % dia⁻¹ = [\ln peso final - \ln peso inicial] × dias⁻¹) × 100), eficiência alimentar (FE = [ganho de peso] × [ingestão total de ração]⁻¹), ingestão diária de ração (DFI, % de peso vivo dia⁻¹ = 100 × [ingestão de alimentar × dias⁻¹] × [{peso final + peso inicial} × 2]⁻¹) e retenção proteica aparente (ANPR, % = 100 × [composição corporal final de proteína - composição corporal inicial de proteína] × [ingestão de proteínas]⁻¹).

Para a análise centesimal e perfil de ácidos graxos corporal, três grupos de 30 peixes foram amostrados no início do experimento e três peixes por unidade experimental foram amostrados no final do experimento. Para composição muscular centesimal e perfil análise de ácidos graxos, foram amostrados 40 peixes no início e cinco peixes por unidade experimental no final do teste de alimentação. Antes de todas as amostragens, os peixes foram mantidos em jejum por 24 h, sacrificados por overdose (200 mg L⁻¹) do anestésico Eugenol®, seguido de corte da coluna vertebral. As amostras coletadas foram liofilizadas, homogeneizadas e armazenadas a -20°C até as análises.

2.2.4 Análises químicas

As análises da composição centesimal e dos perfis de ácidos graxos foram realizadas no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI, UFSC). A análise de composição centesimal seguiu procedimentos padronizados pela "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC, 1999): umidade (secagem a 105°C até peso constante, método 950.01), proteína bruta (Kjeldahl, método 945.01), lipídio total (Soxhlet, método 920.39C) e

cinzas (incineração a 550°C, método 942.05). A energia bruta foi determinada em uma bomba calorimétrica (PARR, modelo ASSY 6200), de acordo com as instruções do fabricante.

As medições de ácidos graxos foram realizadas por cromatografia gasosa. Resumidamente, os lipídios das amostras foram extraídos a frio e quantificados pelo método de Folch et al. (1957), modificado por Ways e Hanahan (1964), e posteriormente modificado como descrito por Corrêa et al. (2018). Os ácidos graxos foram então esterificados usando o método de O'Fallon et al. (2007) e separados por um cromatógrafo gasoso (Agilent 7890B, Santa Clara, Califórnia, EUA) com um detector FID, usando uma coluna capilar CP7487 (CP-Sil 88 para FAME - 60 m, 0,25 mm, 0,20 µm, 7-in. cage). As condições cromatográficas foram: temperatura do detector 300°C; temperatura do injetor 240°C; temperatura inicial da coluna 120°C por 10 min, programada para aumentar a uma taxa de 3°C min⁻¹ até 186°C mantida por 5 min e depois aumentada novamente a 3°C min⁻¹ até a temperatura final de 231°C. O hélio era o gás portador, com um fluxo de coluna de 2,5 mL min⁻¹ e a injeção foi realizada no modo "Split" (1:40). Os ácidos graxos foram identificados com base no tempo de retenção de dois padrões, MIX 37 (37 Component FAME Mix e PUFA nº 3) e óleo menhaden (SUPELCO, Bellefont, Pensilvânia, EUA). As concentrações de ácidos graxos nas amostras foram calculadas de acordo com Joseph e Ackman (1992), utilizando como padrão interno 23:0 (ácido tricosanoico, Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA).

2.2.5 Dietas e ensaio de digestibilidade

O ensaio de digestibilidade foi conduzido para avaliar a utilização dos nutrientes da farinha de *Aurantiochytrium* sp. (ALL-G-RICH[®]) pela tilápia-do-nilo em temperatura subótima fria de 22°C. Avaliou-se a digestibilidade da proteína bruta, matéria seca, lipídios e ácidos graxos. Conforme descrito na Seção 2.2.1, uma dieta referência foi formulada com ingredientes semi-purificados, com base nos requisitos nutricionais da tilápia-do-nilo (NRC, 2011), além da adição de 1,00 mg g⁻¹ da dieta seca de óxido de ítrio como marcador inerte (**Tabela 4**). Os peixes foram alimentados com a dieta de referência ou a dieta de teste. A dieta teste consistiu em 900 mg g⁻¹ do peso seco da dieta referência e 100 mg g⁻¹ do peso seco de farinha de *Aurantiochytrium* sp. Os processos de preparação e extrusão da dieta foram realizados conforme descrito na Seção 2.2.1.

Tabela 4. Composição proximal e perfil de ácidos graxos da dieta de referência usada no ensaio de digestibilidade.

Ingrediente^a	mg g⁻¹ da dieta seca
Amido de milho	443,00
Caseína	283,00
Gelatina	88,00
Celulose microfina	73,00
Premix macromineral	40,00
Banha suína	29,00
Óleo de milho	20,00
Carboximetilcelulose	10,00
Premix vitamínico-micromineral	10,00
Bitartarato de colina	2,50
Óxido de ítrio	1,00
BHT	0,50
<i>Composição, g 100 g⁻¹ peso da dieta seca</i>	
Matéria seca	89,84
Proteína bruta	38,80
Lipídios	5,56
Cinzas	3,92
SFA ^b	1,50
MUFA	1,94
PUFA	1,28
PUFA n-6	1,24
LC-PUFA n-6	0,04
PUFA n-3	0,04
LC-PUFA n-3	ND ³
n-3/n-6	0,03

^a Amido de milho, caseína, gelatina, celulose microfina, carboximetilcelulose, Bitartarato de colina Bitartarato de colina e BHT distribuídos pela Rhoster (Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brasil). Banha suína produzida pela Seara Alimentos S.A. (Itajaí, Santa Catarina, Brasil). ALL-G-RICH[®] produzido e fornecido pela Alltech Inc. (Nicholasville, Kentucky, USA) e importado pela Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda (Araucária, Paraná, Brasil). Óleo de milho “Suavit” produzido pela Cocamar Ltda (Maringá, Paraná, Brasil). Óxido de ítrio produzida pela Sigma (Louis, USA). Premix vitamínico-micromineral (produzida pela Cargill, Campinas, São Paulo), composição por kg: ácido fólico 420 mg, ácido pantotênico 8.333 mg, BHT 25.000 mg, biotina 134 mg, sulfato de cobalto 27 mg, sulfato de cobre 1.833 mg, sulfato de ferro 8.000 mg, iodato de cálcio 92 mg, sulfato de manganês 3.500 mg, niacina 8.333 mg, selênio 100 mg, vitamina (vit.) A 1.666.670 UI, vit. B1 2.083 mg, vit. B12 5.000 mcg, vit. B2 4.166 mg vit. B6 3.166 mg, equivalente a ácido ascórbico 66.670 mg, vit. D3 666,670 UI, vit. E 16.666 UI, vit. K3 833 mg, sulfato de zinco 23.330 mg, inositol 50.000 mg, propionato de cálcio 250.000 mg. Premix macromineral, composição por kg: fosfato bicálcico 565 g, cloreto de potássio 60 g, cloreto de sódio 65 g, sulfato de magnésio 310 g.

^b Grupo dos ácidos graxos: SFA = ácidos graxos saturados, MUFA = ácidos graxos monoinsaturados, PUFA = ácidos graxos poli-insaturados, LC-PUFA = PUFA de cadeia longa (com 20 a 22 carbono).

Peixes do mesmo lote utilizados no ensaio de alimentação foram utilizados no teste de digestibilidade. Juvenis de tilápia-do-nilo estocados em tanques de 1000 L foram transferidos para oito unidades experimentais (duas dietas × quatro repetições), que consistiam em tanques cilíndricos-cônicos de 200 L, conectados ao mesmo RAS. Cada tanque foi estocado com 125 juvenis (peso médio $16,01 \pm 0,68$ g), que foram alimentados com a dieta teste ou a dieta de referência. A aclimação antes da coleta de fezes ocorreu durante as três primeiras semanas na unidade experimental. Durante a primeira semana, a temperatura da água das unidades experimentais foi mantida a 28°C ; durante a segunda semana, a temperatura da água diminuiu gradualmente de 28°C para 22°C (1°C por dia) e na terceira semana de aclimação, a temperatura da água foi mantida em 22°C . As fezes foram coletadas durante 21 dias após o período de aclimação. Os tanques cilíndricos-cônicos foram equipados com tubo de 50 mL no fundo para coleta das fezes por decantação. Esses tubos foram imersos em recipientes isotérmicos com gelo para evitar a degradação microbiana. Os tubos e o gelo foram trocados a cada 2 horas. Os tubos removidos foram centrifugados por 1 min a $1077 \times g$ e amostras de fezes foram armazenadas a -20°C . Os procedimentos foram descritos anteriormente por Rodrigues et al. (2011).

O coeficiente de digestibilidade aparente (ADC) foi calculado com as seguintes equações:

$$(1) \text{ ADC \%} = 100 - \left[100 \times \left(\frac{\text{Marcador}_{\text{Dieta}}}{\text{Marcador}_{\text{Fezes}}} \times \frac{\text{Nutriente}_{\text{Fezes}}}{\text{Nutriente}_{\text{Dieta}}} \right) \right]$$

$$(2) \text{ ADC}_{\text{ing}} \% = \text{ADC}_{\text{td}} + \left[(\text{ADC}_{\text{td}} - \text{ADC}_{\text{ref}}) \times \left[\frac{0,9 \times \text{Nutriente}_{\text{ref}}}{0,1 \times \text{Nutriente}_{\text{ing}}} \right] \right]$$

Onde ing = ingrediente, td = dieta de teste e ref = dieta de referência.

Os indicadores de qualidade da água (média ± desvio padrão) foram: temperatura $21,97 \pm 0,30^{\circ}\text{C}$; oxigênio dissolvido $8,18 \pm 0,31 \text{ mg L}^{-1}$; pH $7,26 \pm 0,07$; salinidade $0,99 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$; alcalinidade $32,13 \pm 4,01 \text{ CaCO}_3 \text{ mg L}^{-1}$; dureza $1947,00 \pm 89,50 \text{ CaCO}_3 \text{ mg L}^{-1}$; amônia total $0,06 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$; nitrito $0,09 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$; nitrato $2,64 \pm 0,70 \text{ mg L}^{-1}$. O fluxo de entrada de água em cada tanque foi de 50 mL s^{-1} .

A alimentação dos peixes foi realizada duas vezes ao dia (11:00 e 19:00 h) até a saciedade aparente. Uma hora após a alimentação, as paredes do tanque foram vigorosamente limpas e aproximadamente 70% da água foi renovada. Este procedimento foi realizado para evitar a contaminação das fezes com a ração, remover qualquer ração regurgitadas pelos peixes e remover qualquer produção de biofilme bacteriano. Os períodos de coleta das fezes ocorreram

após a limpeza dos tanques. As amostras de fezes foram coletadas diariamente das 5:00 às 10:00 h e das 13:00 às 17:00 h, com duas coletas por período. No final de cada período de coleta, as amostras de fezes foram liofilizadas, homogeneizadas e armazenadas a -20°C até análises posteriores.

2.2.6 Análises estatísticas

Todos os dados foram testados quanto à normalidade, homocedasticidade e, no caso das análises de regressão linear, também foram testados quanto à independência dos resíduos (Teste de Durbin-Watson). As análises de regressão avaliaram o efeito dos níveis crescentes da farinha de *Aurantiochytrium* sp. nas variáveis de desempenho de crescimento, composição corporal centesimal e perfis de ácidos graxos musculares. Os dados de peixes alimentados com a dieta CLO foram comparados apenas com os dados dos peixes alimentados com 1,00 g 100 g⁻¹ da dieta seca da farinha de *Aurantiochytrium* sp., usando o teste t de Student's. Para todos os testes, o nível de significância adotado foi de 5%.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Crescimento, sobrevivência e retenção proteica

Variáveis de desempenho de crescimento da tilápia-do-nilo, incluindo ganho em peso, ganho em peso diário, taxa de crescimento específico, eficiência alimentar, ingestão diária de ração e retenção proteica aparente foram ajustadas a um modelo de regressão cúbica (**Tabela 5, Figura 2**). As taxas de sobrevivência foram semelhantes entre os peixes que receberam as diferentes dietas, variando entre 100,00 e 99,20%.

Os juvenis de tilápia-do-nilo, mantidos a uma temperatura subótima fria de 22°C , tiveram crescimento e eficiência alimentar afetados positivamente quando alimentados com suplementação dietética de farinha de *Aurantiochytrium* sp., de 1,4 e 0,65, respectivamente (**Figura 2**). Esses achados coincidem com os estudos anteriores realizados em nosso laboratório (Corrêa et al., 2017; Nóbrega et al., 2017; Corrêa et al., 2018) mostrando que DHA dietético ou outros PUFAs da série n-3 são necessários para um melhor desempenho da tilápia-do-nilo em uma temperatura subótima fria. A tilápia-do-nilo mantida a 25°C e alimentada com PUFAs da série n-3 também apresentou a melhor taxa de crescimento (Abdel-ghany et al., 2019). Entretanto, quando juvenis de tilápia-do-nilo foram criados à temperatura ótima de crescimento de 28°C e alimentados com diferentes inclusões de farinha de *Aurantiochytrium* sp., não foram encontrados efeitos positivos no crescimento (Fernandes et al., 2018). Além disso, a relação n-

3 / n-6 não afetou o crescimento da tilápia-do-nylo, independentemente da temperatura da água (28°C ou 22°C), quando as dietas continham no mínimo 1,3 g 100 g⁻¹ da dieta seca do total de PUFA (Mufatto et al., 2019).

Apesar dos peixes apresentarem alto ganho em peso quando alimentados com as dietas suplementadas com 4,00 g 100 g⁻¹ de farinha de *Aurantiochytrium* sp., a eficiência alimentar e a ingestão diária de alimentos foram piores nos dois níveis mais altos (2,00 ou 4,00 g 100 g⁻¹) de suplementação com farinha de *Aurantiochytrium* sp. A utilização de proteína foi maior em tilápias alimentadas com 1,00 g 100 g⁻¹ da dieta seca, seguida de 4,00 g 100 g⁻¹ de farinha de *Aurantiochytrium* sp. Surpreendentemente, os peixes alimentados com farinha de *Aurantiochytrium* sp. apresentaram desempenho de crescimento, eficiência alimentar e retenção proteica aparente significativamente maior do que os peixes alimentados com a dieta CLO, apesar de terem conteúdo semelhante de DHA (**Tabela 6**). Em um estudo anterior em temperatura ótima, a tilápia-do-nylo alimentada com farinha de *Aurantiochytrium* sp. apresentou desempenho de crescimento semelhante aos peixes alimentados com CLO (Fernandes et al., 2018).

A suplementação de 1,42 g 100 g⁻¹ da dieta seca de farinha de *Aurantiochytrium* sp. promoveu maior ganho em peso, estimada pela equação de regressão. No entanto, as concentrações de farinha de *Aurantiochytrium* sp. que promoveram maior eficiência alimentar e retenção de proteínas foram de 0,45 e 0,65 g 100 g⁻¹ da dieta seca, respectivamente (**Figura 2**).

Tabela 5. Desempenho de crescimento, eficiência alimentar e retenção proteica aparente em juvenis de tilápia-do-nylo após a alimentação com cinco níveis de inclusão dietética de farinha de *Aurantiochytrium* sp. por 87 dias, à 22° C. ^a

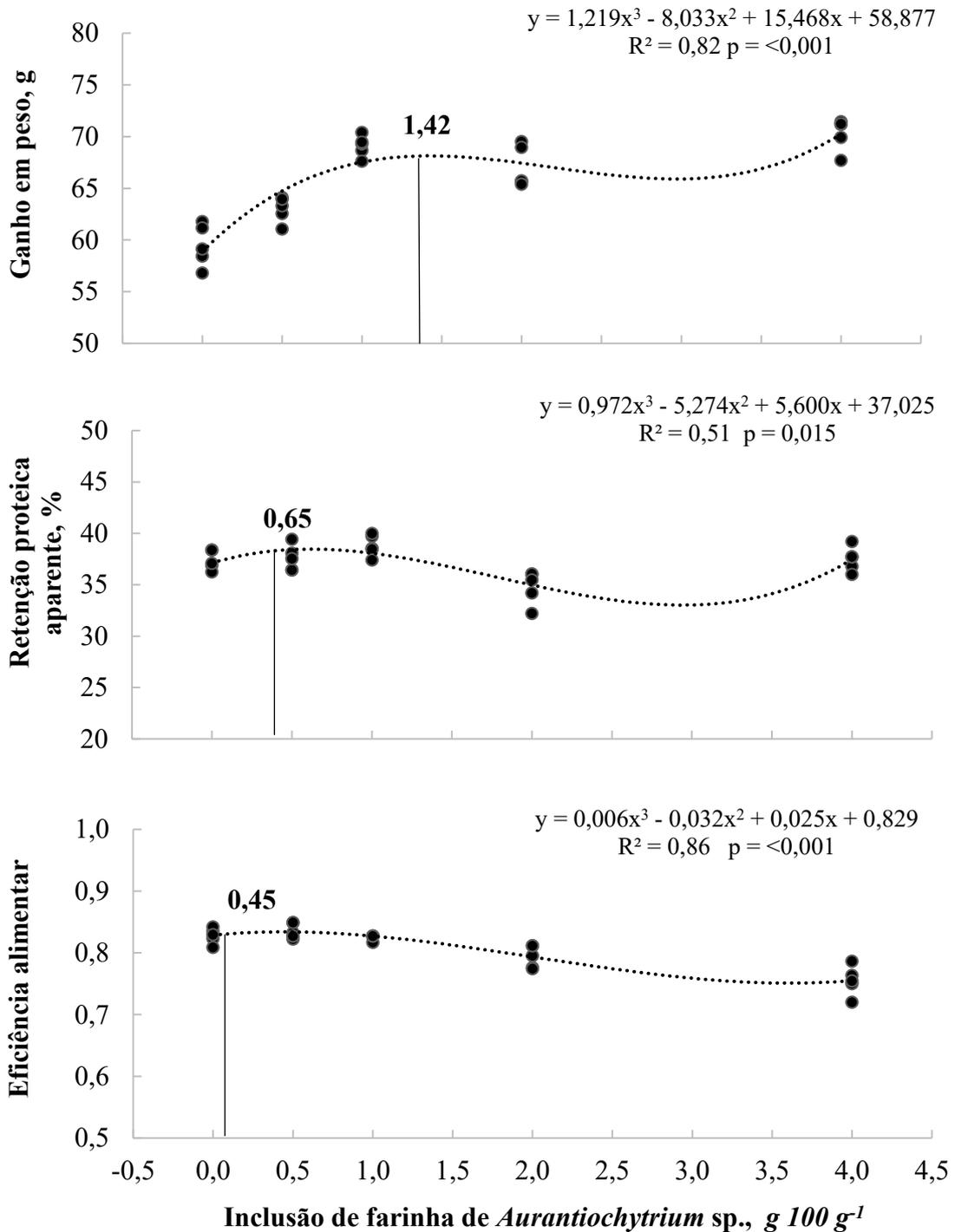
Variáveis	Inclusão de farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp.					Pooled SEM ^b	Valor p ^c
	g 100 g ⁻¹						
	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0		
Ganho em peso, g	59,46	62,98	69,08	67,05	70,29	0,02	<0,001
Ganho em peso diário, g dia ⁻¹	0,68	0,72	0,79	0,77	0,81	0,02	<0,001
Taxa de crescimento específico, % dia ⁻¹	2,39	2,45	2,56	2,55	2,53	0,03	<0,001
Eficiência alimentar	0,83	0,84	0,83	0,79	0,76	0,02	<0,001
Ingestão diária de ração, % do peso vivo diário ⁻¹	2,76	2,74	2,75	2,82	2,98	0,14	0,006
Retenção proteica aparente, %	37,38	37,55	38,61	34,78	37,49	1,60	0,015

^a Os resultados são expressos como a média de cinco repetições (n = 25 peixes por repetição).

^b Erro padrão da média.

^c Quando a regressão polinomial foi significativa, foram obtidas as seguintes equações: Ganho em peso, $y = 1,219x^3 - 8,033x^2 + 15,468x + 58,877$, $R^2 = 0,82$. Ganho em peso diário, $y = 0,014x^3 - 0,092x^2 + 0,178x + 0,677$, $R^2 = 0,82$. Taxa de crescimento específico, $y = 0,014x^3 - 0,1082x^2 + 0,247x + 2,381$, $R^2 = 0,82$. Eficiência alimentar, $y = 0,006x^3 - 0,032x^2 + 0,025x + 0,829$, $R^2 = 0,86$. Ingestão diária de ração, $y = -0,009x^3 + 0,069x^2 - 0,071x + 2,759$, $R^2 = 0,51$. Retenção proteica aparente, $y = 0,972x^3 - 5,274x^2 + 5,600x + 37,025$, $R^2 = 0,51$.

Figura 2. Regressões polinomiais do ganho de peso, retenção proteica aparente e eficiência alimentar de juvenis de tilápia-do-nylo alimentadas com inclusões crescentes de farinha de *Aurantiochytrium* sp. por 87 dias, a 22°C.



2.3.2 Digestibilidade de nutrientes

A 22°C, todos os PUFAs da farinha de *Aurantiochytrium* sp. apresentou um alto coeficiente de digestibilidade aparente (ADC) para tilápia-do-nylo (96 a 100%) (**Tabela 7**). Também foram relatados altos ADC para o DHA, PUFA da série n-3 e PUFA da série n-6 para

tilápia-do-nilo mantida em temperatura ótima de crescimento (Sarker et al., 2016; Fernandes et al., 2018) e para o salmão-do-atlântico, mesmo quando mantida a 8,8°C, em temperatura subótima fria para essa espécie (Kousoulaki et al., 2016).

Por outro lado, a uma temperatura subótima, os ADCs do SFA e do MUFA forma baixos (52% e 15%, respectivamente), representando a menor digestibilidade dos ácidos graxos encontrados (**Tabela 7**). Em geral, os SFAs apresentaram menor digestibilidade que os PUFAs, como encontrado anteriormente em outros estudos, mesmo quando as tilápias foram alimentadas em temperatura ótima de crescimento com farinha de *Aurantiochytrium* sp. (Fernandes et al., 2018) ou farinha de *Schizochytrium* sp. (Sarker et al., 2016) um microrganismo heterotrófico (Marchan et al., 2018). O ADC dos SFAs foi alto somente quando a tilápia-do-nilo foi alimentada com ácidos graxos purificados, sendo semelhante à digestibilidade dos PUFAs (Chen et al., 2018).

Foi relatado anteriormente para a tilápias e outros peixes, que dietas com altos níveis de SFA podem afetar negativamente a digestibilidade lipídica e metabolismo (Turchini et al., 2009; Corrêa et al., 2017; Salini et al., 2017). A relação de ácidos graxos saturados para insaturados nas cadeias acila dos lipídios da membrana é um fator importante na determinação do empacotamento lipídico, viscosidade da membrana e permeabilidade à água (Ernst et al., 2016).

Tabela 6. Desempenho em crescimento, eficiência alimentar e retenção proteica aparente em juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com duas fontes de DHA, farinha de *Aurantiochytrium* sp. ou óleo de fígado de bacalhau, por 87 dias, a 22°C.^a

Variáveis	Diets ^b		Valor de p
	Farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp.	Óleo de fígado de bacalhau	
Ganho em peso, g	69,08 ± 0,01	65,60 ± 0,01	0,009
Ganho em peso diário, g dia ⁻¹	0,79 ± 0,01	0,75 ± 0,01	0,009
Taxa de crescimento específico, % dia ⁻¹	2,56 ± 0,01	2,50 ± 0,01	0,007
Eficiência alimentar	0,83 ± 0,01	0,79 ± 0,02	0,008
Ingestão diária de ração, % do peso vivo diário ⁻¹	2,75 ± 0,06	2,90 ± 0,03	0,034
Retenção proteica aparente, %	38,61 ± 0,60	36,84 ± 0,77	0,031

^a Os resultados são expressos como a média de cinco repetições (n = 25 peixes por repetição), seguidas pelo erro padrão.

^b Dietas com conteúdo semelhante de DHA: A dieta com farinha de *Aurantiochytrium* sp. = inclusão de farinha de *Aurantiochytrium* sp. em 10,0 mg g⁻¹ da dieta seca e óleo de fígado de bacalhau = inclusão de óleo de fígado de bacalhau em 20,0 mg de g⁻¹ da dieta seca.

É sabido que a fluidez do óleo está relacionada às características combinadas de seus ácidos graxos; altos níveis de SFA podem contribuir para uma diminuição da fluidez e aumento da viscosidade dos óleos (Turquini et al., 2009), afetando, assim, a absorção e a digestibilidade dos SFAs, conforme observado no presente estudo.

Os ADC de matéria seca, lipídios e proteínas estavam entre 68% e 76% (**Tabela 7**). A digestibilidade da proteína e do lipídio da farinha de *Aurantiochytrium* sp. teve uma diminuição de cerca de 20% quando comparado à tilápia alimentada a uma temperatura ótima de crescimento (Fernandes et al., 2018). Isso pode explicar parcialmente a redução no crescimento dos peixes mantidos em temperatura subótima fria. Houve uma redução de cerca de 30% na digestibilidade lipídica no presente estudo, quando comparado à tilápia-do-nilo (Sarker et al., 2015) e salmão-do-atlântico (Kousoulaki et al., 2016) alimentados com farinha de microrganismos heterotróficos a temperaturas ótimas ou subótimas, respectivamente.

Tabela 7. Composição e coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes selecionados contidos na farinha de *Aurantiochytrium* sp. para a tilápia-do-nilo mantida a 22°C.

Nutriente	Composição	Coefficiente de digestibilidade
	g 100 g ⁻¹ peso seco da dieta	aparente, % ^a
Matéria seca	96,85	76,72 ± 0,75
Proteína	11,72	68,64 ± 0,35
Lipídio	70,36	68,38 ± 0,53
14:0	2,95	51,07 ± 1,32
16:0 PAL ^b	33,67	52,25 ± 2,34
18:0 STA	0,99	15,53 ± 2,06
22:4 n-6	2,86	97,05 ± 0,10
20:5 n-3 EPA	0,22	100,00 ± 0,00
22:5 n-3 DPA	0,17	100,00 ± 0,00
22:6 n-3 DHA	15,81	96,05 ± 0,10
SFA	38,93	50,77 ± 1,29
MUFA	0,75	19,44 ± 4,28
PUFA	19,60	95,41 ± 0,26
PUFA n-6	3,07	91,30 ± 1,45
PUFA n-3	16,49	98,38 ± 0,10

^a Os valores são expressos como a média de quatro repetições, seguida pelo erro padrão (n = 125 peixes por repetição, com peso inicial de 16,01 ± 0,68 g).

^b PAL = ácido palmitoleico, EPA = ácido eicosapentaenoico, DPA = ácido docosapentaenoico, DHA = ácido docosaenoico. Grupo dos ácidos graxos: SFA = ácidos graxos saturados, MUFA = ácidos graxos monoinsaturados, PUFA = ácidos graxos poli-insaturados, LC-PUFA = PUFA de cadeia longa (com 20 a 22 carbono).

2.3.3 Composição corporal e muscular

A composição corporal de juvenis de tilápia-do-nylo foi influenciada pelos tratamentos dietéticos. O lipídio corporal e a matéria seca aumentaram linearmente com a inclusão dietética crescente de farinha de *Aurantiochytrium* sp. (Tabela 8). Houve diferenças significativas nas composições centesimal corporal entre os peixes alimentados com a dieta CLO e peixes alimentados com farinha de *Aurantiochytrium* sp. (Tabela 9). Peixes alimentados com farinha de *Aurantiochytrium* sp. tiveram acúmulo lipídico significativamente maior.

Semelhante às nossas descobertas com a tilápia-do-nylo alimentada com a dieta CLO, muitos estudos em peixes relataram que os PUFAs da série n-3 na dieta reduzem a porcentagem de gordura no tecido adiposo branco e aumentam a β -oxidação dos ácidos graxos (Todorčević et al., 2009), independentemente da temperatura da água (Ng et al., 2001; Ribeiro et al., 2008; Chen et al., 2013; Nobrega et al., 2017). Os ácidos graxos afetam as vias metabólicas e podem ter um efeito alostérico nas atividades de algumas enzimas (Glencross, 2009). Por exemplo, o DHA controla negativamente a abundância nuclear de SREBP-1 (proteínas de ligação do elemento regulador do estero), responsável pela transcrição e expressão de enzimas lipogênicas, como a ácidos graxos sintase e a Δ 9-dessaturase (Sekiya et al., 2003; Jump, 2002).

Tabela 8. Composição centesimal corporal e muscular de juvenis de tilápia-do-nylo quando alimentados com inclusão dietética crescente de farinha de *Aurantiochytrium* sp. por 87 dias, a 22 ° C.

Fração	Peixe Inicial	Inclusão de farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp. g 100 g ⁻¹ ^a					Pooled SEM ^b	Valor de p ^c
		0,0	0,5	1,0	2,0	4,0		
<i>Composição corporal, g 100 g⁻¹ peso úmido</i>								
Matéria seca	22,90	30,90	31,31	31,35	31,77	31,84	0,76	0,042
Proteína	13,56	15,94	15,80	16,46	16,00	16,11	0,58	0,680
Lipídio	3,15	11,25	11,77	11,80	12,03	12,19	0,48	0,002
Cinzas	3,70	3,67	3,67	3,57	3,68	3,68	0,24	0,740
<i>Composição muscular, g 100 g⁻¹ peso úmido</i>								
Matéria seca	19,62	23,47	23,53	23,67	23,87	23,90	0,41	0,030
Proteína	17,06	19,60	19,81	20,11	20,55	19,89	0,35	0,002
Lipídio	0,81	2,50	2,33	2,28	2,27	2,61	0,32	0,072

^a Os resultados são expressos como a média de cinco repetições (n = 3 peixes por repetição).

^b Erro padrão da média.

^c Quando a regressão polinomial foi significativa, foram obtidas as seguintes equações para a composição corporal: matéria seca $y = 0,214x + 31,119$, $R^2 = 0,30$; lipídio $y = 0,194x + 11,518$, $R^2 = 0,35$; e para composição muscular: matéria seca $y = 0,180x + 12,400$, $R^2 = 0,30$; proteína $y = -0,173x^2 + 0,769x + 19,588$, $R^2 = 0,57$.

A suplementação dietética crescente da farinha de *Aurantiochytrium* sp. aumentou a composição lipídica do corporal na tilápia-do-nilo mantida a 22°C. No entanto, esses aumentos nos lipídios corporais podem ser explicados pela diferença na composição lipídica das dietas experimentais, que variaram de 8,64 a 9,90 g 100 g⁻¹ da dieta seca, como a inclusão crescente da farinha de *Aurantiochytrium* sp. Nossos resultados diferem daqueles obtidos com a tilápia foi mantida a 28°C (Fernandes et al., 2018), onde a suplementação dietética crescente da farinha de *Aurantiochytrium* sp. não influenciou a composição lipídica corporal, apesar do teor lipídico total das dietas experimentais ter variado de 7,08 a 8,01 g 100 g⁻¹ da dieta seca.

No entanto, a composição corporal de proteína e de cinzas não foram significativamente afetadas pela suplementação dietética da farinha de *Aurantiochytrium* sp. (Tabela 6). Além disso, a inclusão dietética da farinha de *Aurantiochytrium* sp. na dieta influenciou a composição centesimal muscular. O conteúdo de matéria seca do músculo aumentou com a inclusão dietética da farinha de *Aurantiochytrium* sp. A proteína bruta no músculo foi maior com a inclusão de 2,0 g 100 g⁻¹ da dieta seca de farinha de *Aurantiochytrium* sp. Os peixes alimentados com farinha de *Aurantiochytrium* sp. apresentaram maior retenção proteica quando comparados aos peixes alimentados com a dieta CLO (Tabela 9), que continha quantidades semelhantes de DHA, mas maior quantidade total de PUFA série n-3. Isso sugere uma possível superioridade da farinha de *Aurantiochytrium* como promotor de desempenho de crescimento para a tilápia-do-nilo.

Tabela 9. Composição centesimal corporal e muscular (g 100 g⁻¹ do peso úmido) de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com duas fontes de DHA, farinha de *Aurantiochytrium* sp. ou óleo de fígado de bacalhau, por 87 dias, a 22°C. ^a

Fração	Dietas ^b		Valor de p
	Farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp.	Óleo de fígado de bacalhau	
<i>Composição corporal, g 100 g⁻¹ do peso úmido</i>			
Matéria seca	31,35 ± 0,31	31,37 ± 0,25	0,946
Proteína	16,46 ± 0,10	16,37 ± 0,16	0,075
Lipídio	11,80 ± 0,17	11,05 ± 0,20	0,024
Cinzas	3,53 ± 0,18	3,66 ± 0,12	0,349
<i>Composição muscular, g 100 g⁻¹ do peso úmido</i>			
Matéria seca	23,67 ± 0,18	23,50 ± 0,06	0,491
Proteína	20,11 ± 0,16	20,46 ± 0,15	0,055
Lipídio	2,27 ± 0,14	2,24 ± 0,19	0,901

^a Os resultados são expressos como a média de cinco repetições (n = 3 peixes por repetição), seguidas pelo erro padrão.

^b Dietas com conteúdo semelhante de DHA: A dieta com farinha de *Aurantiochytrium* sp. = inclusão de farinha de *Aurantiochytrium* sp. em 10,0 mg g⁻¹ da dieta seca e óleo de fígado de bacalhau = inclusão de óleo de fígado de bacalhau em 20,0 mg de g⁻¹ da dieta seca

Embora não tenha havido efeito do aumento da inclusão dietética da farinha de *Aurantiochytrium* sp. na composição proteica corporal, houve um efeito na composição das proteínas musculares e na retenção aparente de proteínas na tilápia-do-nilo. A retenção máxima foi detectada com suplementações de 0,65 g 100 g⁻¹ *Aurantiochytrium* sp. Diversos estudos demonstraram que os PUFAs da série n-3 podem influenciar positivamente na síntese de proteínas (Tocher, 2003; Glencross, 2009), a composição proteica corporal (Chen et al., 2013; Fernandes et al., 2018) e a retenção aparente de proteínas (Person-Le Ruyet et al., 2004; Nobrega et al., 2017; Corrêa et al., 2018). No entanto, no presente estudo, as maiores inclusões da farinha de *Aurantiochytrium* sp. e PUFA da série n-3 não resultaram em maiores retenções de proteínas, talvez devido à maior deposição de lipídios na composição corporal dos peixes alimentados com essas dietas.

2.3.4 Perfil de ácidos graxos muscular

Após 87 dias de alimentação, a suplementação dietética crescente de farinha de *Aurantiochytrium* sp. afetou apenas a composição do PUFA no músculo da tilápia-do-nilo. DHA, ácido eicosapentaenoico (20: 5n-3, EPA) e ácido docosapentaenoico (22: 5n-3, DPA), bem como os grupos PUFA da série n-3 e LC-PUFA da série n-3 aumentaram linearmente no músculo com a inclusão dietética de farinha de *Aurantiochytrium* sp. (**Tabela 10**). Foi relatado que os ácidos graxos da dieta influenciaram diretamente a composição corporal de ácidos graxos em tilápia-do-nilo mantida em diferentes temperaturas experimentais (Justi et al., 2005; Corrêa et al., 2017; Nobrega et al., 2017; Fernandes et al., 2018; Mufatto et al., 2019).

O DHA, entre todos os PUFAs da série n-3, foi o mais afetado, semelhante a outros trabalhos quando a tilápia-do-nilo foi alimentada com farinha de *Aurantiochytrium* sp. a 28°C, considerando a composição corporal (Fernandes et al., 2018) ou composição muscular (Brignol et al., 2018). O aumento do DHA no músculo deveu-se principalmente à sua quantidade crescente nas dietas, mas também à maior retenção desse ácido graxo. O catabolismo do DHA dietético é diferente de outros ácidos graxos, pois é mais conservado nos fosfolipídios das membranas e menos catabolizado para produzir energia (Sargent et al., 2002; Stubhaug et al., 2007; Monroig et al., 2018). Essa conservação pode ser devida à dupla ligação produzida pela $\Delta 4$ dessaturase ao bioconverter o DPA em DHA, que é relativamente resistente à β -oxidação mitocondrial (Madsen et al., 1998; Monroig et al., 2018). De acordo com Oboh et al. (2017), a tilápia-do-nilo expressa a enzima $\Delta 4$ dessaturase e, posteriormente, o EPA pode ser convertido em DHA por duas vias, pelas $\Delta 4$ ou $\Delta 6$ dessaturases.

Não houve diferença na composição centesimal muscular entre os peixes alimentados com a dieta CLO e peixes alimentados com a dieta contendo farinha de *Aurantiochytrium* sp. (Tabela 7). Da mesma forma, o conteúdo de SFA e MUFA no músculo da tilápia-do-nylo foi semelhante entre os peixes alimentados com a dieta CLO ou com a dieta suplementada com farinha de *Aurantiochytrium* sp. (Tabela 11). Entretanto, a concentração de ácido palmítico (16:0, PAL) foi significativamente maior no músculo da tilápia-do-nylo alimentada com a dieta suplementada com farinha de *Aurantiochytrium* sp. Os peixes alimentados com a dieta CLO acumularam significativamente mais EPA, DPA, DHA, PUFA da série n-3, LC-PUFA da série n-3 e menos LC-PUFA da série n-6, ARA e 22: 4 n-6 no músculo do que os peixes alimentados com dietas suplementado com farinha de *Aurantiochytrium* sp.

Tabela 10. Perfil de ácidos graxos musculares de juvenis de tilápia-do-nylo quando alimentados com inclusão dietética crescente de farinha de *Aurantiochytrium* sp. por 87 dias, a 22°C. ^a

Ácidos graxos ^b g 100 g ⁻¹ peso seco	Peixe inicial	Inclusão de farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp. g 100 g ⁻¹					Pooled SEM ^c	Valor de p ^d
		0,0	0,5	1,0	2,0	4,0		
16:0 PAL	1,02	2,07	1,94	2,04	2,05	2,06	0,22	0,754
18:2 n-6 LOA	0,49	1,04	1,00	1,05	1,09	1,06	0,12	0,275
20:4 n-6 ARA	0,19	0,22	0,19	0,20	0,16	0,14	0,01	<0,001
22:4 n-6	0,16	0,37	0,31	0,32	0,27	0,28	0,02	<0,001
18:3 n-3 α-LNA	0,04	0,19	0,18	0,20	0,18	0,16	0,03	0,112
20:5 n-3 EPA	ND ^e	ND	ND	ND	0,02	0,04	0,01	<0,001
22:5 n-3 DPA	0,08	ND	ND	ND	0,03	0,04	0,01	<0,001
22:6 n-3 DHA	0,48	0,10	0,22	0,34	0,57	0,81	0,03	<0,001
SFA	1,54	2,97	2,72	2,88	2,90	2,94	0,30	0,598
MUFA	1,33	3,57	3,61	3,79	3,64	3,37	0,47	0,228
PUFA	1,68	2,25	2,20	2,39	2,63	2,86	0,19	<0,001
PUFA n-6	0,93	1,86	1,71	1,75	1,72	1,69	0,14	0,155
LC-PUFA n-6	0,44	1,11	0,66	0,65	0,57	0,54	0,07	<0,001
PUFA n-3	0,70	0,34	0,45	0,59	0,86	1,13	0,06	<0,001
LC-PUFA n-3	0,66	0,10	0,22	0,34	0,62	0,90	0,03	<0,001
n-3/n-6	0,75	0,18	0,26	0,34	0,50	0,67	0,03	<0,001

^a Os resultados são expressos como a média de cinco repetições (n = 5 peixes por repetição).

^b Ácidos graxos detectados e totalizados, mas não incluídos na tabela: 10: 0, 12: 0, 14: 0, 15: 0, 18: 0, 20: 0, 22: 0, 16: 1n-7, 18: 1n -9; 18: 1n-7, 20: 1 n-9, 22: 1 n-9, 24: 1n-9, 16: 2n-4, 18: 3n-6, 18: 4n-3, 20: 2n-6, 20: 3n-6, 20: 4n-3, 22: 3n-3.

^c Erro padrão da média.

^d Quando a regressão polinomial foi significativa, foram obtidas as seguintes equações: PUFA $y = -0,014x^2 + 0,228x + 2,185$, R² 0,74; LC-PUFA n-6 $y = 0,074x^2 - 0,406x + 1,000$, R² 0,75; ARA $y = 0,003x^2 - 0,031x + 0,217$, R² 0,89; C22: 4 n-6 $y = 0,011x^2 - 0,064x + 0,357$, R² 0,76; PUFA n-3 $y = -0,029x^2 + 0,320x - 0,319$, R² 0,97; LC-PUFA n-3 $y = -0,026x^2 + 0,307x + 0,084$, R² 0,99; EPA $y = +0,002x^2 + 0,003x - 0,002$, R² 0,94; DPA $y = -0,002x^2 + 0,018x - 0,006$, R² 0,81; DHA $y = -0,026x^2 + 0,285x + 0,092$, R² 0,99; n3 / n6 $y = -0,017x^2 + 0,192x + 0,176$, R² 0,98.

^e Não detectado (<0,05% do total dos ácidos graxos).

Embora presente na composição muscular de todos os peixes, o α -LNA não foi influenciado pela inclusão dietética crescente da farinha de *Aurantiochytrium* sp.; o EPA e o DPA foram detectados apenas em peixes alimentados com níveis de inclusão de 2,0 e 4,0 g 100 g⁻¹. Aparentemente, o PUFA da série n-3 presente no músculo das tilápias mantidas a 22°C foi obtido diretamente de suas dietas, com baixa bioconversão. A composição de DHA, PUFAs da série n-3 e a relação de PUFA n-3 / n-6 nos músculos dos peixes alimentados com a dieta CLO foi maior quando comparado com tilápias alimentadas com dieta contendo farinha de *Aurantiochytrium* sp., apesar das dietas conterem quantidades equivalentes de DHA.

Tabela 11. Perfil de ácidos graxos muscular (g 100 g⁻¹ do peso úmido) de juvenis de tilápiado-nilo alimentados com duas fontes de DHA, farinha de *Aurantiochytrium* sp. ou óleo de fígado de bacalhau (CLO), por 87 dias, a 22°C. ^a

Ácidos graxos ^b g 100 g ⁻¹ peso seco	Dietas ^c		Valor de p
	Farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp.	Óleo de fígado de bacalhau	
<i>Composição corporal, g 100 g⁻¹ do peso seco</i>			
16:0 PAL	2,04 ± 0,10	1,83 ± 0,07	0,040
18:2 n-6 LOA	1,05 ± 0,04	1,05 ± 0,04	0,937
20:4 n-6 ARA	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,023
22:4 n-6	0,32 ± 0,02	0,15 ± 0,01	<0,001
18:3 n-3 α -LNA	0,20 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,005
20:5 n-3 EPA	ND ^d	0,08 ± 0,01	-
22:5 n-3 DPA	ND	0,09 ± 0,01	-
22:6 n-3 DHA	0,34 ± 0,01	0,54 ± 0,02	<0,00
SFA ⁵	2,88 ± 0,13	2,74 ± 0,12	0,280
MUFA	3,79 ± 0,13	3,63 ± 0,18	0,365
PUFA	2,39 ± 0,07	2,59 ± 0,08	0,038
PUFA n-6	1,75 ± 0,05	1,51 ± 0,05	<0,001
LC-PUFA n-6	0,65 ± 0,01	0,41 ± 0,02	<0,001
PUFA n-3	0,59 ± 0,02	1,04 ± 0,04	<0,001
LC-PUFA n-3	0,34 ± 0,01	0,72 ± 0,02	<0,001
n-3/n-6	0,34 ± 0,01	0,69 ± 0,02	<0,001

^a Os resultados são expressos como a média de cinco repetições (n = 5 peixes por repetição) e são seguidos pelo erro padrão.

^b Ácidos graxos detectados e totalizados, mas não incluídos na tabela: 10: 0, 12: 0, 14: 0, 15: 0, 18: 0, 20: 0, 22: 0, 16: 1n-7, 18: 1n-9; 18: 1n-7, 20: 1 n-9, 22: 1 n-9, 24: 1n-9, 16: 2n-4, 18: 3n-6, 18: 4n-3, 20: 2n-6, 20: 3n-6, 20: 4n-3, 22: 3n-3.

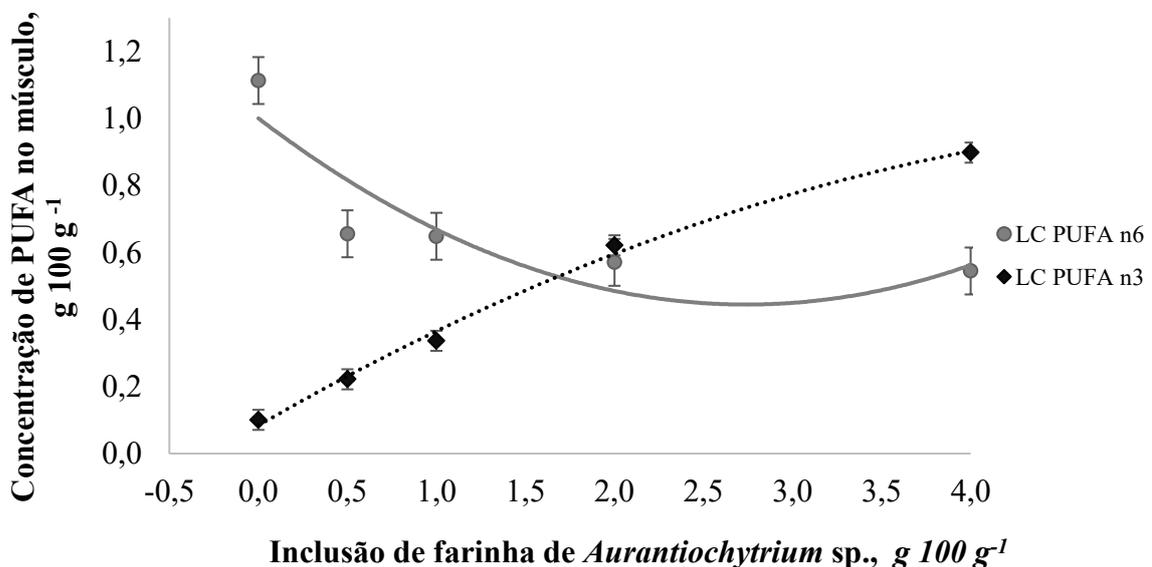
^c Dietas com conteúdo semelhante de DHA: A dieta com farinha de *Aurantiochytrium* sp. = inclusão de farinha de *Aurantiochytrium* sp. em 10,0 mg g⁻¹ da dieta seca e óleo de fígado de bacalhau = inclusão de óleo de fígado de bacalhau em 20,0 mg de g⁻¹ da dieta seca.

^d Não detectado (<0,05% de ácido graxo total).

A composição de LC-PUFA da série n-3 dobrou no músculo da tilápia alimentada com a dieta CLO em relação aos peixes alimentados com farinha de *Aurantiochytrium* sp. Foi relatada alta incorporação de LC-PUFAs da série n-3 em tilápia-do-nilo alimentada com óleo de peixe, independentemente da temperatura da água (Teoh et al., 2011; Ng e Romano, 2013; Corrêa et al., 2017; Brignol et al., 2018; Corrêa et al., 2018; Fernandes et al., 2018). A maior composição de DHA e LC-PUFA da série n-3 no músculo da tilápia alimentada com a dieta CLO provavelmente ocorreu devido à bioconversão de seus precursores, que foram detectados apenas na dieta CLO. Nossos resultados corroboram com os achados de Tocher et al. (2002) que demonstraram a bioconversão de PUFA da série n-3 em tilápia-do-nilo.

Inversamente, LC-PUFA da série n-6, ARA e 22:4 n-6 diminuíram no músculo (Figura 3). Entretanto, o acúmulo de LOA e α -LNA não foi influenciado pelos tratamentos dietéticos. A relação de PUFA n-3 / n-6 no músculo aumentou significativamente com a inclusão dietética da farinha de *Aurantiochytrium* sp.

Figura 3. Concentração de PUFA das séries n-3 e n-6 no músculo (média \pm erro padrão) de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com inclusões crescentes de farinha de *Aurantiochytrium* sp. por 87 dias, a 22°C.



A composição dos LC-PUFAs da série n-3 no músculo das tilápias aumentou com a inclusão dietética crescente da farinha de *Aurantiochytrium* sp.; no entanto, diminuiu o conteúdo muscular LC-PUFA da série n-6, ARA e 22:4 n-6. A quantidade de LOA no músculo não foi afetada, semelhante ao que ocorreu quando a tilápia-do-nilo foi alimentada com farinha

de *Aurantiochytrium* sp. (Brignol et al., 2018; Fernandes et al., 2018) ou com uma fonte de α -LNA (Tonial et al., 2009; Chen et al., 2018), ambas os trabalhos em temperaturas ótimas de crescimento. No presente estudo, a redução no LC-PUFA da série n-6 e o aumento do LC-PUFA da série n-3 no músculo foi maior para as tilápias-do-nylo alimentadas com a dieta CLO, em comparação aos peixes alimentados com a dieta contendo farinha de *Aurantiochytrium* sp., apesar do conteúdo semelhante de DHA. Provavelmente isso ocorreu porque a dieta CLO continha uma quantidade maior de LC-PUFAs da série n-3.

Portanto, pode-se afirmar que a inclusão dietética de DHA ou LC-PUFA da série n-3 diminuiu a bioconversão dos PUFAs da série n-6 de 18 carbonos para os de 20 e 22 carbonos. Em um estudo recente, foi demonstrado que tilápias alimentadas com 2,04 g 100 g⁻¹ α -LNA e mantidas a 28°C, houve um bloqueio ou, pelo menos, um atraso na biossíntese de LC-PUFA da série n-6 (Chen et al., 2018). Isso sugere que existe uma competição direta sob os substratos, LOA e α -LNA, das enzimas Δ -6 dessaturase e elongase (Chen et al., 2018). No entanto, a redução na bioconversão de PUFAs da série n-6 em LC-PUFAs n-6 deveu-se provavelmente à inibição ou redução da atividade enzimática das dessaturases e elongases devido à presença de DHA em excesso, que é o produto final dessas enzimas.

Verificamos que a relação de PUFA n-3 / n-6 aumentou significativamente no músculo da tilápia-do-nylo com o aumento da inclusão dietética da farinha de *Aurantiochytrium* sp. Como esperado, ao comparar a farinha de *Aurantiochytrium* sp. contra CLO, a relação n-3 / n6 foi significativamente maior no músculo de peixes alimentados com a dieta CLO.

A relação de PUFA n-3 / n-6 recomendada para o consumo humano é de 0,25 (Simopoulos, 2002), a qual foi alcançada na musculatura da tilápia-do-nylo mantida a 22°C e alimentada por 87 dias com dietas suplementadas com apenas 0,50 g 100 g⁻¹ da dieta seca de farinha de *Aurantiochytrium* sp.

2.4 CONCLUSÃO

A tilápia-do-nylo mantida a 22°C responde ao aumento das inclusões dietéticas da farinha de *Aurantiochytrium* sp., melhorando o desempenho produtivo. Além disso, a farinha de *Aurantiochytrium* sp. é uma fonte melhor de DHA que o OFB. A suplementação da farinha de *Aurantiochytrium* sp. na faixa de 0,45 a 1,42 g, 100⁻¹ da dieta seca melhora o crescimento, eficiência alimentar, composição lipídica corporal e muscular, bem como a razão PUFA n-3 / n-6 no músculo. A farinha de *Aurantiochytrium* sp. é uma alternativa eficaz ao óleo de peixe como aditivo às dietas de inverno da tilápia-do-nylo.

AGRADECIMENTO

O produto utilizado nesta pesquisa é produzido e vendido pela Alltech Inc. (USA), que financiou o presente estudo, para uso em dietas para aquicultura com o nome comercial ALL-G-RICH®. Este estudo também foi financiado pela CAPES-Brasil (Código Financeiro 001) mediante a concessão de bolsas aos autores Renata O. Nobrega, Rosa O. Batista e Bruna Mattioni e pelo CNPq-Brasil, que concedeu bolsa ao último autor. Agradecemos também à Nicoluzzi Rações Ltda (Penha, Santa Catarina, Brasil) e à Kabsa Exportadora S.A. (Porto Alegre, RS, Brasil) pela doação de ingredientes para a elaboração das dietas experimentais.

2.5 REFERÊNCIAS

- A.O.A.C, 1999. Official Methods of Analysis of the AOAC International, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.
- Abdel-ghany, H.M., El-Sayed, A.M., Ezzat, A.A., Essa, M.A., Helal, A.M., 2019. Dietary lipid sources affect cold tolerance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). J. Therm. Biol. 79, 50–55.
- Azaza, M.S., Dhraief, M.N., Kriem, M.M., 2008. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. J. Therm. Biol. 33, 98–105.
- Brignol, F.D., Fernandes, V.A.G., Nobrega, R.O., Filler, K., Pettigrew, J., Fracalossi, D.M., 2018. *Aurantiochytrium* sp. meal as DHA source in Nile tilapia diet, part II: body fatty acid retention and muscle fatty acid profile. Aquac. Res. 50, 707–716.
- Chen, C., Suna, B., Li, X., Li, P., Guana, W., Bi, Y., Pana, Q., 2013. N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: quantification of optimum requirement of dietary linolenic acid in juvenile fish. Aquaculture 416–417, 99–104.
- Chen, C., Guan, W., Xie, Q., Chen, G., He, X., Zhang, H., Guoa, W., Chena, F., Tan, Y., Pan, Q., 2018. N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: bioconverting LNA to DHA is relatively efficient and the LC-PUFA biosynthetic pathway is substrate limited in juvenile fish. Aquaculture 495, 513–522.
- Corrêa, C.F., Nobrega, R.O., Mattioni, B., Block, J.M., Fracalossi, D.M., 2017. Dietary lipid sources affect the performance of Nile tilapia at optimal and cold, suboptimal temperatures. Aquac. Nutr. 23, 1016–1026.
- Corrêa, C.F., Nobrega, R.O., Mattioni, B., Fracalossi, D.M., 2018. Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. Aquaculture. 497, 82–90.
- Ernst, R., Ejsing, C.S., Antonny, B., 2016. Homeoviscous adaptation and the regulation of membrane lipids. J. Mol. Biol. 428, 4776–4791.

FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Meeting the Sustainable Development Goals. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp. 233.

Fernandes, V.A.G., Brignol, F.D., Filler, K., Pettigrew, J., Fracalossi, D.M., 2018. *Aurantiochytrium* sp. meal as DHA source in Nile tilapia diet, part I: growth performance and body composition. *Aquac. Res.* 50, 390–399.

Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 (1), 497–509.

Glencross, B.D., 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Rev. Aquac.* 1, 71–124.

Gupta, A., Barrow, C.J., Puri, C.J., 2012. Omega-3 biotechnology: Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. *Biotechnol. Adv.* 30, 1746–1747.

Joseph, J.D., Ackman, R.G., 1992. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. *J. AOAC Int.* 75, 488–506.

Jump, D.B., 2002. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr. Opin. Lipidol.* 27, 875–887.

Justi, K.C., Padre, R.G., Hayashi, C., Soares, C.M., Visentainer, J.V., Souza, N.E., Matsushita, M., 2005. Efeito da temperatura da água sobre desempenho e perfil de ácidos graxos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Sci. Anim. Sci.* 27, 529–534.

Kousoulaki, K., Mørkøre, T., Nengas, I., Berge, R.K., Sweetman, J., 2016. Microalgae and organic minerals enhance lipid retention efficiency and fillet quality in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 451, 47–57.

Lee, M.-C., Zhuo, L.-C., Lin, Y.-H., 2018. Effects of dietary docosahexaenoic acid sources, microalgae meal and oil, on growth, fatty acid composition and docosahexaenoic acid retention of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquac. Res.* 49, 30–35.

Ma, X.Y., Qiang, J., He, J., Gabriel, N.N., Xu, P., 2015. Changes in the physiological parameters, fatty acid metabolism, and SCD activity and expression in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at three different temperatures. *Fish Physiol. Biochem.* 41, 937–950.

Madsen, L., Frøyland, L., Dyrøy, E., Helland, K., Berge, R.K., 1998. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids are differently metabolized in rat liver during mitochondria and peroxisome proliferation. *J. Lipid Res.* 39, 583–593.

Marchan, L.F., Chang, K.J.L., Nichols, P.D., Mitchell, W.J., Polglase, J.L., Gutierrez, T., 2018. Taxonomy, ecology and biotechnological applications of thraustochytrids: a review. *Biotechnol. Adv.* 36, 26–46.

Monroig, O., Tocher, D.R., Castro, L.F.C., 2018. Polyunsaturated fatty acid biosynthesis and metabolism in fish. In: Graham, C.B. (Ed.), *Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism*. AOCS Press, Elsevier Inc., pp. 31–60.

Mufatto, L.M., Nobrega, R.O., Luque, D.M., Fracalossi, D.M., 2019. Dietary ratio of n-3/n-6 fatty acids do not affect growth of Nile tilapia at optimal temperature and at a simulation of the onset of winter. *Aquac. Nutr.* 2019, 1–16.

- Ng, W.K., Romano, N., 2013. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Rev. Aquac.* 5, 220–254.
- Ng, W.K., Lim, P.K., Sidek, H., 2001. The influence of a dietary lipid source on growth, muscle fatty acid composition and erythrocyte osmotic fragility of hybrid tilapia. *Fish Physiol. Biochem.* 25, 301–310.
- Nobrega, R.O., Corrêa, C.F., Mattioni, B., Fracalossi, D.M., 2017. Dietary α -linolenic for juvenile Nile tilapia at cold suboptimal temperature. *Aquaculture* 471, 66–71.
- NRC, 2011. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academic Press, Washington (National Research Council).
- Oboh, A., Kabeya, N., Carmona-Antoñanzas, G., Castro, L.F.C., Dick, J.R., Tocher, D.R., Monroig, O., 2017. Two alternative pathways for docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) biosynthesis are widespread among teleost fish. *Nature* 7, 1–10.
- O'Fallon, J.V., Busboom, J.R., Nelson, M.L., Gaskins, C.T., 2007. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *J. Anim. Sci.* 85, 1511–1521.
- Person-Le Ruyet, J., Skalli, A., Dulaua, B., Le Bayona, N., Le Dellioua, H., Robina, J.H., 2004. Does dietary n3 highly unsaturated fatty acids level influence the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) capacity to adapt to a high temperature? *Aquaculture*. 242, 571–588.
- Pimolrat, P., Whangchai, N., Chitmanat, C., Promya, J., Lebel, L., 2013. Survey of climaterelated risks to tilapia pond farms in northern Thailand. *Int. J. Geosci.* 4, 54–59.
- Popma, T.J., Lovshin, L.L., 1995. *Worldwide prospects of commercial production of tilapia*. International Center for Aquaculture and Aquatic Environments. Department of Fisheries and Allied Aquaculture. Auburn University.
- Ribeiro, P.A.P., Logato, P.V.R., Paula, D.A.J., Costa, A.C., Murgas, L.D.S., Freitas, R.T.F., 2008. Effect of different oils in the diet on lipogenesis and the lipid profile of Nile tilapias. *R. Bras. Zootec.* 37, 1331–1337.
- Rodrigues, A.P.O., Gominho-Rosa, M.D.C., Cargnin-Ferreira, E., de Francisco, A., Fracalossi, D.M., 2011. Different utilization of plant sources by the omnivores jundiá (*Rhamdia quelen*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Nutr.* 18, 65–72.
- Salini, M.J., Turchini, G.M., Glencross, B.D., 2017. Effect of dietary saturated and monounsaturated fatty acids in juvenile barramundi Lates calcarifer. *Aquac. Nutr.* 23, (264–175).
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego, pp. 181–257.
- Sarker, P.K., Gamble, M.M., Kelson, S., Kapuscinski, A.R., 2016. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp. and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp. feed ingredients. *Aquac. Nutr.* 22, 109–119.
- Sekiya, M., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Najima, Y., Nakakuki, M., Nagai, R., Ishibashi, S., Osuga, J., Yamada, N., Shimano, H., 2003. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology* 38, 1529–1539.

- Shi, G.C., Dong, X.H., Chen, G., Tan, B.P., Yang, Q.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y., 2015. Physiological responses and HSP70 mRNA expression of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under cold stress. *Aquac. Res.* 46, 658–668.
- Simopoulos, A.P., 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* 56, 365–379.
- Stubhaug, I., Lie, Ø., Torstensen, B.E., 2007. Fatty acid productive value and β -oxidation capacity in Atlantic salmon tissues (*Salmo salar* L.) fed on different lipid sources along the whole growth period. *Aquac. Nutr.* 13, 145–155.
- Takeuchi, T., Satoh, S., Watanabe, T., 1983. Requirement of *Tilapia nilotica* for essential fatty acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 49, 1127–1134.
- Teoh, C.Y., Turchini, G.M., Ng, W.K., 2011. Erratum to “genetically improved farmed Nile tilapia and red hybrid tilapia showed differences in fatty acid metabolism when fed diets with added fish oil or a vegetable oil blend”. *Aquaculture* 316, 144–154.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11, 107–184.
- Tocher, D.R., 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac. Res.* 41, 717–732.
- Tocher, D.R., Agaba, M., Hastings, N., Bell, J.G., Dick, J.R., Teale, A.J., 2002. Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiol. Biochem.* 24, 309–320.
- Todorčević, M., Kjær, M.A., Djaković, N., Vegusdal, A., Torstensen, B.E., Ruyter, B., 2009. N–3 HUFAs affect fat deposition, susceptibility to oxidative stress, and apoptosis in Atlantic salmon visceral adipose tissue. *Comp. Biochem. Physiol. B* 152, 135–143.
- Tonial, I.B., Stevanato, F.B., Matsushita, M., De Souza, N.E., Furuya, W.M., Visentainer, J.V., 2009. Optimization of flaxseed oil feeding time length in adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as a function of muscle omega-3 fatty acids composition. *Aquac. Nutr.* 15, 564–568.
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Ng, W.K., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Rev. Aquac.* 1, 10–59.
- Turchini, G.M., Ng, W.-K., Tocher, D.R., 2010. *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*, 1st ed. Taylor & Francis Group, CRC Press, Boca Raton.
- Ways, P., Hanahan, D.J., 1964. Characterization and quantification of red cell lipids in normal man. *J. Lipid Res.* 5, 318–328.
- Weber, T.E., Bosworth, B.G., 2005. Effects of 28-day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish. *Aquaculture*. 246, 483–492.

3. ARTIGO 2

Este artigo foi formatado de acordo com as normas do periódico *Journal of Thermal Biology*, ao qual será submetido para a publicação.

Dietary supplementation of *Aurantiochytrium* sp. meal for Nile tilapia and suboptimal low temperature followed by temperature elevation induce oxidative damage to biomolecules

Renata Oselame Nobrega¹, Alcir Luiz Dafre², Rosana Oliveira Batista², Camila Fernandes Corrêa³, Bruna Mattioni¹, James Eugene Pettigrew⁴, Débora Machado Fracalossi^{1*}

¹ Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil.

² Departamento de Bioquímica, UFSC.

³ Polo Regional Vale do Ribeira, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Pariquera-Açu, SP, Brasil.

⁴ Pettigrew Research Services, Inc., Champaign, IL, EUA.

* Autor Correspondente: Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346. CEP: 88034-001 Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: debora.fracalossi@ufsc.br. Telefone: +55 48 3721 6300.

RESUMO

A suplementação dietética de ácidos graxos poli-insaturados n-3 (PUFA) para a tilápia-do-nylo melhora significativamente seu desempenho em crescimento em temperatura subótima fria. No entanto, uma possível consequência dessa suplementação é o aumento do dano oxidativo celular devido à alta insaturação destes ácidos graxos. Portanto, foi avaliado se a suplementação dietética da farinha de *Aurantiochytrium* sp., fonte rica em DHA (ácido docosahexaenoico, 22: 6 n-3), somada à exposição prolongada à temperatura subótima fria e seguida de elevação da temperatura, causaria danos oxidativos em tilápia-do-nylo. Dois níveis de inclusão da farinha de *Aurantiochytrium* sp. foram testados: 1,0 g (D1) e 4,0 g (D4) 100 g⁻¹ da dieta seca. Incluiu-se também uma dieta sem a referida suplementação (D0, 0 g 100 g⁻¹ da dieta seca) e uma dieta controle, suplementada com óleo de fígado de bacalhau (OFB). A concentração de DHA e do total de PUFA's da série n-3 da dieta controle era semelhante às encontradas nas dietas D1 e D4, respectivamente, objetivando comparar as duas fontes lipídicas de DHA. Os indicadores de danos oxidativos analisados foram: hemoglobina (Hb), enzima antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione total (GSH-t), tióis não proteicos (NPSH), além da proteína carbonilada (PC) e do dano ao DNA dos eritrócitos. Adicionalmente, um indicador de estresse térmico (proteína HSP70) foi determinado em peixes alimentados com a dieta controle. Os índices de danos oxidativos foram avaliados em três períodos: 1) após 87 dias a 22°C; 2) após sete dias subsequentes, quando a temperatura aumentou para 28°C e 3) após mais sete dias subsequentes, quando aumentou para 33°C. A suplementação dietética da farinha de *Aurantiochytrium* sp. durante 87 dias a 22°C causou pouco dano ao DNA da tilápia-do-nylo, demonstrando ser um aditivo seguro para dietas de inverno, apesar da sua alta concentração de DHA. No entanto, o subsequente aumento da temperatura afetou significativamente a concentração de hemoglobina bem como a atividade das enzimas antioxidantes. Já a HSP70 foi maior em tilápia-do-nylo mantida a 22°C (temperatura subótima) do que em tilápia submetida a um aumento de temperatura para 28°C (temperatura ótima de crescimento) ou para 33°C (temperatura acima da ótima). Portanto, sugere-se que temperaturas baixas podem levar a um maior estresse térmico do que altas

temperaturas para a tilápia-do-nylo, já que estimulam o aumento da HSP70 para melhorar as defesas contra o estresse térmico. Estudos adicionais são necessários para melhor compreender o mecanismo de adaptação da tilápia-do-nylo sob estresse térmico, evidente durante as oscilações térmicas, típicas das regiões subtropicais, onde há produção expressiva desta espécie.

Palavras-chave: Aditivo de inverno, DHA, enzimas antioxidantes, marcadores oxidativos, *Oreochromis niloticus*.

3.1 INTRODUÇÃO

A tilápia-do-nylo é o terceiro peixe mais produzido no mundo (FAO, 2020). Apesar de ser uma espécie tropical, é criada em muitos países com clima subtropical, como Brasil, China e Egito (FAO, 2020), onde a produção é prejudicada nos meses mais frios do ano. A variação diária ou sazonal da temperatura da água é um dos fatores ambientais mais danosos à produção de espécies aquícolas. Essa flutuação térmica pode afetar significativamente o crescimento e a sobrevivência dos peixes (Donaldson et al., 2008) já que afeta processos imunológicos e fisiológicos (Malev et al., 2010; Luo et al., 2014), parâmetros sanguíneos (Liu et al., 2010) e compromete o metabolismo (Sokolova e Lannig, 2008). Em regiões subtropicais, que possuem as quatro estações bem definidas, mortalidades significativas de tilápias podem ocorrer durante o inverno (Sifa et al., 2002; Shi et al., 2015). Entretanto, no início da primavera, o aumento da temperatura é particularmente estressante, considerando que os peixes já se encontram imunossuprimidos, o que contribui para o aumento das taxas de mortalidade (Muratori et al., 2001; Ibrahim, 2019). Há relatos que, durante o período de transição entre inverno e primavera, a ocorrência de doenças bacterianas e parasitárias é maior em produções de tilápia (Miyashita, 1984; Austin e Austin, 1993; Muratori et al., 2001; Eissa et al., 2008; Jerissa et al., 2011; Ibrahim, 2019). Quando há um aumento na temperatura ambiente, a atividade bacteriana retorna mais rapidamente do que a capacidade dos peixes de restaurar o pleno funcionamento de seu sistema imunológico (Ibrahim, 2019). As tilápias criadas sob a faixa ideal de temperatura de 26 a 30°C são menos propensas a doenças e redução da imunidade (Ma et al., 2015), mas tal suscetibilidade também é influenciada pela genética, nutrição e práticas de manejo.

A flutuação térmica nas regiões subtropicais geralmente promove respostas ao estresse fisiológico em animais ectotérmicos, como os peixes (Bagnyukova et al., 2007; Heise et al., 2006; Donaldson et al., 2008; Malev et al., 2010). As respostas ao estresse térmico por frio ou calor podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que produzem efeitos deletérios nos lipídios, proteínas e ao DNA (Heise et al., 2003; Luo et al., 2014). Embora as células possuam vários sistemas de defesa, a produção excessiva ou prolongada de ROS,

além de danificar as biomoléculas, também podem iniciar eventos que comprometem as funções celulares (Luo et al., 2015). As respostas ao estresse oxidativo podem danificar direta ou indiretamente o DNA, causando apoptose celular, afetando o sistema imunológico (Chandra et al., 2000). A mortalidade de peixes causada pelo frio está correlacionada positivamente com o aumento às respostas ao estresse oxidativo (Vinagre et al., 2012; Rossi et al., 2017). Portanto, a redução do estresse oxidativo pode aumentar a tolerância ao frio em peixes (Lu et al., 2019). A suplementação dietética do ácido α -lipóico ou glutathione reduzida (antioxidante) ao zebra-fish, *Danio rerio*, aumentou a capacidade antioxidante do organismo, o que, por sua vez, promoveu maior tolerância ao frio (Lu et al., 2019). Existem muitos estudos sobre respostas ao estresse causado pelo frio em peixes; incluindo variações em relação ao período de exposição bem como ao efeito da suplementação de aditivos alimentares (Vinagre et al., 2012; Rossi et al., 2017; Lu et al., 2019). Também há evidências que a alta temperatura da água, acima da temperatura ótima de crescimento, promove estresse oxidativo em animais aquáticos (Malev et al., 2010).

Estudos publicados sobre as exigências nutricionais da tilápia-do-nilo em temperatura subótima fria mostram melhora do crescimento e da eficiência alimentar quando os peixes são alimentados com dietas contendo fontes de ácido graxo poli-insaturado da série n-3 (PUFA) (Corrêa et al., 2017, 2018; Nobrega et al., 2017, 2019). Entretanto, sabe-se que uma alta concentração de PUFA no corpo, oriundos da ração, pode afetar negativamente as defesas antioxidantes dos vertebrados (Garrido et al., 1989; Huang e Huang, 2004). Essas consequências negativas estão relacionadas à facilidade de oxidação dos PUFA (Moldogazieva et al., 2019), potencializando processos que podem levar a danos oxidativos em biomoléculas, além da indução de respostas ao estresse oxidativo nos intestinos e a surtos de doenças (Bhattacharyya et al., 2014). No entanto, o efeito da suplementação dietética de PUFA e a flutuação térmica sob possíveis danos oxidativos têm sido pouco estudados em peixes.

Atualmente, a farinha de peixe e o óleo de peixe, que são a principal fonte dietética de ácidos graxos da série n-3 nas rações aquícolas, são obtidos através da exploração de recursos pesqueiros limitados (Naylor et al., 2009). Entretanto, aditivos como a farinha de *Aurantiochytrium* sp., que possui aproximadamente 16 g de ácido docosahexaenoico (22: 6 n-3, DHA) em 100 g⁻¹ de peso seco do produto, apresentam grande potencial como fonte alternativa de PUFA da série n-3 em dietas de inverno para a tilápia-do-nilo, conforme citado anteriormente (Corrêa et al., 2017, 2018; Nobrega et al., 2017, 2019). No entanto, o potencial dano oxidativo de dietas ricas em PUFA da série n-3 à tilápia-do-nilo sob variação térmica ainda não foi estudada. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os indicadores

de dano oxidativo em tilápia-do-nilo alimentada com farinha de *Aurantiochytrium* sp., e exposição a um período prolongado de temperatura subótima fria, seguida por elevação da temperatura, simulando o início da primavera.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Dietas experimentais

As dietas experimentais foram isonitrogenadas e isoenergéticas, sendo formuladas para atender às exigências nutricionais de juvenis de tilápia-do-nilo (NRC, 2011), utilizando ingredientes práticos. A biomassa seca da farinha de farinha de *Aurantiochytrium* sp., comercializada como ALL- G-RICH™ (Alltech, Nicholasville, KY, EUA), é um aditivo para ração animal, usado como fonte de DHA (16 g 100 g⁻¹ do peso seco). Dois níveis de inclusão de farinha de *Aurantiochytrium* sp. foram testados: 1,0 e 4,0 g 100 g⁻¹ da dieta seca (D1 e D4, respectivamente); além de uma dieta sem farinha de *Aurantiochytrium* sp. (0 g 100 g⁻¹ da dieta seca – D0) (Tabela 12). Além disso, uma dieta controle positivo foi formulada com óleo de fígado de bacalhau (OFB), contendo concentração de DHA semelhante à dieta com 1,0 g 100 g⁻¹ da dieta seca de farinha de *Aurantiochytrium* sp. e concentração de PUFA da série n-3 semelhante à dieta com farinha de *Aurantiochytrium* com 4,0 g 100 g⁻¹ da dieta seca, com o objetivo de comparar as duas fontes lipídicas.

Para manter uma composição centesimal semelhante entre as dietas, a farinha de *Aurantiochytrium* sp. foi substituída por banha suína, milho moído e farelo de soja. A banha suína e o óleo de milho também foram utilizados para obter uma proporção semelhante de ácidos graxos saturados (SFA) e ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) da série n-6, bem como para manter proporções semelhantes de ácido alfa-linolênico (α -LNA) e de PUFA da série n-6 entre as dietas experimentais. No entanto, a razão entre SFA e ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) (Tabela 13) variou um pouco devido às características do ingrediente.

Os ingredientes secos foram moídos (malha de tela de 1 mm, moinho de martelos), peneirados (0,6 mm, peneira manual), pesados e homogeneizados em um misturador horizontal. Os óleos foram então incorporados e homogeneizados à mistura. A umidade foi corrigida para 210 g kg⁻¹, com a adição de água destilada e a mistura foi extrusada em uma extrusora de parafuso único Modelo MX40 (Inbramaq, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os parâmetros de extrusão foram: temperatura 85°C, vazão a 20% da capacidade nominal, velocidade do parafuso 220 rpm, relação largura / diâmetro de 2,3 / 1; diâmetro do parafuso 92,5 mm, comprimento do cilindro 210 mm. Após a extrusão, os grânulos (1,5 a 2 mm) foram secos em um forno de

circulação de ar forçado (50°C) por 4 h. Após, as dietas foram armazenadas em recipientes hermeticamente fechados, protegidas da luz e mantidas em ambiente seco à 20°C para evitar a oxidação dos ácidos graxos.

Antes da preparação das dietas, todos os ingredientes foram analisados para determinar sua composição centesimal, perfil de ácidos graxos e conteúdo energético. Os perfis de ácidos graxos das dietas experimentais foram determinados no início e no final do teste de alimentação para garantir que não houvesse perdas por oxidação ao longo do período experimental.

Tabela 12. Formulação das dietas experimentais.

	Inclusão da farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp., g 100 g ⁻¹			Óleo de fígado de bacalhau
	0	1,0	4,0	
<i>Ingrediente</i> ¹ , g kg ⁻¹ da dieta seca				
Farelo de soja	473,8	472,0	465,9	477,4
Milho	321,7	316,0	305,0	314,1
Farinha de vísceras de aves	157,2	157,2	157,2	157,2
Banha Suína	19,0	16,5	-	-
Óleo de milho	-	-	3,60	3,00
ALL-G-RICH [®]	-	10,0	40,0	-
Óleo de fígado de bacalhau	-	-	-	20,0
Fosfato bicálcico	13,50	13,50	13,50	13,50
Premix vitamínico-micromineral ²	10,0	10,0	10,0	10,0
Bitartarato de colina	3,0	3,0	3,0	3,0
Butil-hidroxitolueno (BHT)	1,0	1,0	1,0	1,0
Treonina	0,80	0,80	0,80	0,80

¹ Farelo de soja e milho fornecido pela Nicoluzzi Rações Ltda (Penha, Santa Catarina, Brasil). Farinha de vísceras de aves produzida pela Kabsa S.A. (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). Banha suína produzida pela Seara Alimentos S.A. (Itajaí, Santa Catarina, Brasil). ALL-G-RICH[®] produzido e fornecido pela Alltech Inc. (Nicholasville, Kentucky, USA) e importado pela Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda (Araucária, Paraná, Brasil). Óleo de milho “Suavit” produzido pela Cocamar Ltda (Maringá, Paraná, Brasil). Óleo de fígado de bacalhau “Möllers Tran”, produzido pela Orkla Health (Oslo, Østlandet, Norway).

² Premix vitamínico-micromineral (produzido pela Cargill, Campinas, São Paulo), composição por kg: ácido fólico 420 mg, ácido pantotênico 8.333 mg, BHT 25.000 mg, biotina 134 mg, sulfato de cobalto 27 mg, sulfato de cobre 1.833 mg, sulfato de ferro 8.000 mg, iodato de cálcio 92 mg, sulfato de manganês 3.500 mg, niacina 8,333 mg, selênio 100 mg, vitamina (vit.) A 1.666.670 UI, vit. B₁ 2.083 mg, vit. B₁₂ 5.000 µg, vit. B₂ 4.166 mg vit. B₆ 3.166 mg, equivalente a ácido ascórbico 66.670 mg, vit. D₃ 666,670 UI, vit. E 16.666 UI, vit. K₃ 833 mg, sulfato de zinco 23.330 mg, inositol 50.000 mg, propionato de cálcio 250.000 mg.

3.2.2 Desenho e procedimentos experimentais

Juvenis de tilápia-do-nylo da linhagem GIFT, sexualmente invertidos para o sexo masculino, com peso corporal de aproximadamente $8,47 \pm 0,19$ g (média \pm erro padrão), foram obtidos de uma piscicultura experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI, Camboriú, SC, Brasil). O manejo dos peixes seguiu o protocolo n ° 5665210917, aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC). Os peixes foram inicialmente estocados em três tanques de 1000 L, todos conectados a um sistema de recirculação (RAS) de água doce, equipado com filtros mecânicos e biológicos, suprimento de ar e troca de aquecedores. O fotoperíodo foi ajustado para 12 h.

Tabela 13. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos das dietas experimentais.

Composição <i>g 100 g⁻¹ peso da dieta seca</i>	Inclusão da farinha de <i>Aurantiochytrium sp.</i> , <i>g 100 g⁻¹</i>			Óleo de fígado de bacalhau
	0	1,0	4,0	
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	4168	4216	4297	4168
Matéria seca	89,47	89,22	90,66	90,32
Proteína bruta	36,40	36,08	35,85	36,20
Lipídios	8,64	8,99	9,90	9,20
Cinzas	7,11	7,18	7,61	7,20
16:0 PAL ¹	1,55	1,77	2,43	1,16
18:1 n-9 OLA	2,56	1,93	1,49	1,89
18:2 n-6 LOA	1,92	1,75	1,71	1,81
20:4 n-6 ARA	ND ³	ND	ND	0,05
18:3 n-3 α -LNA	0,04	0,03	0,02	0,23
20:5 n-3 EPA	ND	ND	0,02	0,17
22:5 n-3 DPA	ND	ND	0,02	0,04
22:6 n-3 DHA	ND	0,20	0,75	0,23
SFA ²	2,14	2,24	2,98	1,29
MUFA	3,02	2,28	1,80	2,65
PUFA	1,98	2,04	2,70	2,79
PUFA n-6	1,94	1,83	1,87	1,89
LC-PUFA n-6	0,02	0,08	0,16	0,08
PUFA n-3	0,04	0,23	0,84	0,83
LC-PUFA n-3	ND	0,20	0,82	0,54
n-3/n-6	0,02	0,12	0,45	0,44

¹PAL = ácido palmitoleico, OLA = ácido oleico, LOA = ácido linoleico, ARA = ácido araquidônico, α -LNA = ácido alfa-linolênico, EPA = ácido eicosapentaenoico, DPA = ácido docosapentaenoico, DHA = ácido docosaenoico.

²Grupos de ácidos graxos: SFA = ácidos graxos saturados, MUFA = ácidos graxos monoinsaturados, PUFA = ácidos graxos poli-insaturados, LC-PUFA = PUFA de cadeia longa (com 20 a 22 carbono).

³Não detectados (<0.05% do total dos ácidos graxos).

Após cinco semanas, grupos de 25 peixes foram distribuídos aleatoriamente em 24 tanques de 100 L e aclimatados às condições do laboratório, a 28°C, na primeira semana. Na segunda semana, a temperatura da água foi gradualmente reduzida de 28°C para 22°C (1°C por dia) e, na terceira semana de aclimação, a temperatura da água foi mantida em 22°C. Durante o período de aclimação de três semanas, os peixes foram alimentados com dieta sem suplementação da farinha de *Aurantiochytrium* sp.

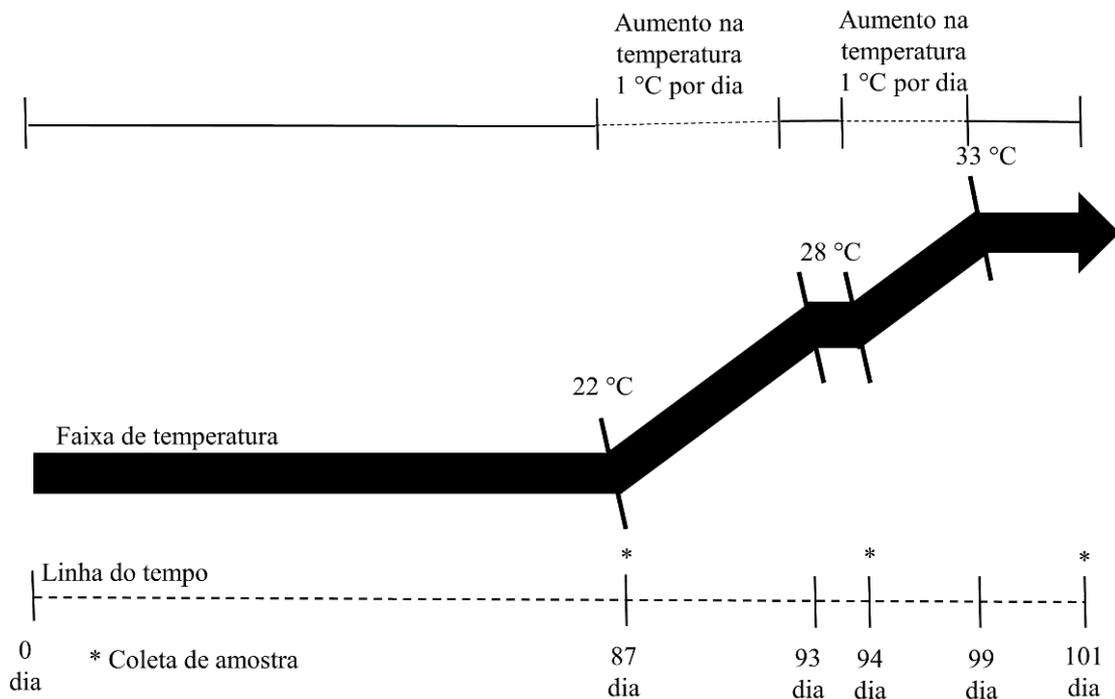
Cada tanque com 25 peixes foi considerado uma unidade experimental. As dietas foram distribuídas aleatoriamente nas unidades experimentais. O experimento testou quatro tratamentos dietéticos, com seis repetições por tratamento, em três períodos experimentais, os quais possuíam diferentes condições de temperatura. Em todos os tanques, durante o primeiro período experimental de 87 dias, a temperatura da água permaneceu constante a 22°C ($22,07 \pm 0,19^\circ\text{C}$) e a saturação de oxigênio foi de $89,07 \pm 0,68\%$. Posteriormente, no segundo período experimental de sete dias, a temperatura foi aumentada para 28°C durante seis dias (1°C por dia) e mantida por mais um dia. No terceiro período experimental de sete dias, a temperatura foi elevada para 33°C, durante cinco dias (1°C por dia) e mantida próxima a 33°C, durante mais dois dias ($32,96 \pm 1,09^\circ\text{C}$). Durante o segundo e o terceiro período, as médias de saturação de oxigênio seguidas do desvio padrão foram de $96,58 \pm 2,46\%$ e $96,37 \pm 2,08\%$, respectivamente. Essa mudança de temperatura teve como objetivo provocar respostas ao estresse térmico (**Figura 4**), simulando o aumento da temperatura da água que ocorre no início da primavera.

Durante o ensaio alimentar, os peixes de cada unidade experimental foram alimentados com suas respectivas dietas duas vezes ao dia (10 h e 18 h) até à saciedade aparente. O fluxo de entrada de água nas unidades experimentais foi de 25 mL s^{-1} , proporcionando uma taxa de troca de água de oito vezes o volume total das unidades experimentais por dia. As variáveis indicadoras de qualidade da água foram medidas semanalmente, durante todo o período experimental, exceto a temperatura e o oxigênio, que foram monitorados duas vezes ao dia. Os valores médios (\pm desvio padrão) foram: oxigênio dissolvido $7,34 \pm 0,62 \text{ mg L}^{-1}$; pH $7,22 \pm 0,11$; salinidade $0,90 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$; alcalinidade $47,16 \pm 7,06 \text{ CaCO}_3 \text{ mg L}^{-1}$; dureza $1871,01 \pm 92,53 \text{ CaCO}_3 \text{ mg L}^{-1}$; amônia total $0,18, \pm 0,12 \text{ mg L}^{-1}$; nitrito $0,06 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$; nitrato $4,30 \pm 0,37 \text{ mg L}^{-1}$. Os indicadores de qualidade da água estavam dentro do nível de conforto para a tilápia-do-nilo (Pompma e Lovshin, 1995), exceto a temperatura da água, que variou ao longo do experimento.

A amostragem do fígado e do sangue foi realizada na conclusão de cada período experimental para avaliar o dano oxidativo sofrido pelos juvenis de tilápia-do-nilo. Os peixes foram amostrados aleatoriamente (dois peixes por unidade experimental, por período),

sacrificados com sobredosagem anestésica (200 mg L⁻¹ Eugenol®, Biodinâmica, Ipirorã, Brasil), seguida de corte da coluna vertebral. Os tecidos coletados foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80 ° C até as análises bioquímicas.

Figura 4. Linha do tempo do ensaio experimental, considerando os três períodos de coleta de amostras, com as respectivas temperaturas.



3.2.3 Análise centesimal e perfil de ácidos graxos

As análises da composição centesimal e dos perfis de ácidos graxos dos ingredientes e das dietas foram realizadas no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI, UFSC). A análise de composição centesimal seguiu procedimentos padronizados pela "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC, 1999): umidade (secagem a 105°C até peso constante, método 950.01), proteína bruta (Kjeldahl, método 945.01), lipídio total (Soxhlet, método 920.39C) e cinzas (incineração a 550°C, método 942.05). A energia bruta foi determinada em uma bomba calorimétrica (PARR, modelo ASSY 6200), de acordo com as instruções do fabricante.

As determinações dos perfis de ácidos graxos nos ingredientes e nas dietas foram realizadas por cromatografia gasosa. Resumidamente, os lipídios das amostras foram extraídos a frio e quantificados pelo método de Folch et al. (1957), modificado por Ways e Hanahan (1964), e posteriormente modificado como descrito por Corrêa et al. (2018). Os ácidos graxos foram então esterificados usando o método de O'Fallon et al. (2007) e separados por um

cromatógrafo gasoso (Agilent 7890B, Santa Clara, Califórnia, EUA) com um detector FID, usando uma coluna capilar CP7487 (CP-Sil 88 para FAME - 60 m, 0,25 mm, 0,20 μm , 7-in. cage). As condições cromatográficas foram: temperatura do detector 300°C; temperatura do injetor 240°C; temperatura inicial da coluna 120°C por 10 min, programada para aumentar a uma taxa de 3°C min^{-1} até 186°C mantida por 5 min e depois aumentada novamente a 3°C min^{-1} até a temperatura final de 231°C. O hélio era o gás portador, com um fluxo de coluna de 2,5 mL min^{-1} e a injeção foi realizada no modo “Split” (1:40). Os ácidos graxos foram identificados com base no tempo de retenção de dois padrões, MIX 37 (37 Component FAME Mix e PUFA nº 3, SUPELCO, Bellefont, Pennsylvania, USA) e óleo menhaden (SUPELCO, Bellefont, Pensilvânia, EUA). As concentrações de ácidos graxos nas amostras foram calculadas de acordo com Joseph e Ackman (1992), utilizando como padrão interno 23:0 (ácido tricosanoico, Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA).

3.2.4 Hemoglobina (Hb)

O método Drabkin foi utilizado para medir a Hb no sangue (g dL^{-1}) (Drabkin, 1950). Em resumo, 1000 μL de solução Drabkin foram adicionados aos tubos de Eppendorf e, em seguida, 20 μL de sangue foram adicionados. A absorvância das amostras foi registrada em 540 nm.

3.2.5 Análises de marcadores de estresse oxidativo

3.2.5.1 Dano ao DNA

O possível dano ao DNA foi avaliado em um ensaio cometa (ou eletroforese em célula única) realizado de acordo com Singh et al. (1988), com pequenas modificações. O dano ao DNA foi avaliado nos glóbulos vermelhos da tilápia-do-nilo. Após a coleta em seringas heparinizadas, uma alíquota de sangue foi diluída em 160 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,75% em tampão PBS a 37°C) e distribuída para duplicar as lâminas de vidro pré-revestidas com agarose. Pelo menos 100 células de cada amostra (50 por lâmina técnica replicada) foram classificadas visualmente em cinco classes (0, 1, 2, 3 e 4) de acordo com o tamanho / intensidade da cauda. A classe zero corresponde ao DNA não danificado e a classe 4, às células com dano máximo ao DNA (Singh et al., 1988). O dano ao DNA foi expresso como índice de dano ao DNA para cada grupo. O índice de dano foi calculado como o número de células encontradas para cada classe de dano (0-4) multiplicada pelo respectivo número de classe (0-4), que recebeu um valor que varia de 0 a 400.

3.2.5.2 “Dot blot” para proteína carbonil

As proteínas carboniladas (PC) foram detectadas por *Dot blot*. O fígado foi homogeneizado em HEPES 20 mM pH 7,0 e derivado com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH, Sigma D199303, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) como descrito anteriormente (Levine et al., 1994). Resumidamente, as proteínas foram desnaturadas com SDS (6%) e derivadas com DNPH 20 mM em HCl 2 N durante 1 h, à temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram neutralizadas com Tris 2 M-Glicerol a 30% e depois foram adicionados 5% de β -mercaptoetanol. Uma alíquota de 2 μ L (0,2 μ g de proteína) foi identificada em uma membrana de PVDF ativada e deixada secar ao ar. O excesso de DNPH foi removido lavando as membranas com ácido acético. As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) e imunotransferidas com anticorpo anti-DNP (1:10000, Dinitrofenol rabbit Abcam - Ab6306, Cambridge, EUA) por 24 horas a 4°C.

As membranas foram expostas a anticorpos secundários (Anti-mouse Abcam ab97046 e Anti-rabbit Sigma sc-2004, ambos 1:10000) conjugados à peroxidase e visualizadas usando um *kit* de substrato quimioluminescente ECL para detecção de proteínas (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). As imagens foram coletadas em um dispositivo ChemiDoc (BioRad Lab, La Jolla, EUA). A análise densitométrica foi realizada usando o software Image J como controle de carregamento de proteínas. As membranas foram coradas com Ponceau S. A razão DNP / Ponceau S. foi usada para determinar os adutos de carbonila.

3.2.6 Análise enzimática

3.2.6.1 *Catalase (CAT)*

A atividade da CAT foi medida de acordo com a taxa de consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), pois esta enzima catalisa a reação de decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Nas amostras de fígado, a atividade foi monitorada por espectrofotometria, diminuindo a absorbância a 240 nm, seguindo à metodologia de Aebi (1984).

3.2.6.2 *Glutathione peroxidase (GPx)*

A metodologia baseia-se na capacidade da GPx de decompor o peróxido orgânico através da oxidação da glutathione, resultando em glutathione oxidada ou dissulfeto de glutathione (GSSG), que é reduzida pela enzima glutathione redutase (GR), usando elétrons doados pelo NADPH. Portanto, em amostras de fígado, a atividade da GPx foi monitorada através da taxa

de oxidação do NADPH por espectrofotometria (detectada na absorvância a 340 nm) (Wendel, 1981).

3.2.6.3 *Glutathiona total (GPH-t), tióis não proteicos (NPSH)*

As amostras de fígado foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,5 M e depois centrifugadas por 5 min a 15.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a análise de GSH-t e NPSH.

O NPSH foi medido pela reação espontânea de tióis com 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) (Ellman, 1959). As amostras foram misturadas com uma solução contendo TRIS / HCl (0,5 M), pH 8 e DTNB (0,2 mM) e incubadas por 30 min, à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 412 nm e comparada com uma curva padrão usando concentrações conhecidas de GSH.

A GSH-t, compreendendo a soma da GH mais a GSSG, a qual foi medida pelo método enzimático descrito por Tietze (Tietze, 1969). As amostras foram neutralizadas com tampão fosfato 0,1 M e adicionadas a um meio de reação contendo tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, EDTA 1 mM, NADPH 0,2 mM, NADPH 0,2 mM, DTNB 0,1 mM e unidades de 0,05 GR. A taxa de formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) foi seguida a 412 nm por 5 min e comparada com uma curva padrão feita com GSH.

3.2.7 **Proteína de choque térmico (HSP70)**

O teor de HSP70 foi determinado por *Western blotting*. Inicialmente, as amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão de lise gelado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 1%, solução inibidor de protease 1%, fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM). As amostras foram submetidas à eletroforese SDSPAGE (reduzido com 2-mercaptoetanol) e as proteínas foram eletrotransferidas para PVDF ou membranas de nitrocelulose, e bloqueadas com leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) (Posser et al., 2007). Para detecção da proteína de choque térmico (HSP), foram utilizados como anticorpos primários: Glo1 (SC - 67351, 1: 1000), Glo2 (SC - 51092, 1: 1000), GCL (SC - 22755, 1: 3000), TrxR1 (SC - 20147, 1: 1000) de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, EUA). O anticorpo na forma fosforilada de DARPP32 em Thr34 (AB9206; 1: 1,000) foi da Millipore (Burlington, EUA). O anticorpo GR (ab16801, 1: 1000) era da Abcam (Cambridge, UK). O anticorpo DARPP32 (# 2302, 1: 1.000) e p-Thr75-DARPP32 (# 2301, 1: 1.000 - coelho) foram adquiridos na Cell Signaling (Danvers, EUA). A imunotransferência foi desenvolvida usando o sistema de quimioluminescência aprimorada (ECL) (Amersham Biosciences). Após

a incubação com o anticorpo secundário, as imagens ECL foram produzidas em um aparelho Chemidoc (BioRad, La Jolla) e quantificadas pelo software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). A intensidade da banda foi normalizada para coloração Ponceau S que produziu um sinal linear em relação à carga de proteína ($r^2 = 0,94$; $p < 0,0001$) em um experimento feito em duplicata e géis carregados com 10, 20, 30 e 40 μg de proteína (dados não mostrados). Para medições de intensidade de Ponceau S, a faixa inteira foi usada, mas nas figuras, apenas uma área menor é apresentada.

3.2.8 Análises estatísticas

Todos os dados foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade para atender aos requisitos da ANOVA, sendo expressos como médias e erro padrão das médias. Posteriormente, para avaliar o efeito da suplementação dietética da farinha de *Aurantiochytrium* sp. ou do OFB e o efeito do estresse térmico nos danos oxidativos, todos os dados foram analisados *via* análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey, quando necessário. O nível de significância de 5% foi adotado em todos os testes.

3.3 RESULTADOS

Durante os 101 dias de período experimental, a taxa de sobrevivência foi de 99,20%, semelhante entre os peixes que receberam as diferentes dietas e não relacionada ao estresse térmico. Constatou-se que a atividade natatória dos peixes foi mais ativa com o aumento da temperatura de 22°C para 28°C e 33°C.

3.3.1 Hemoglobina (Hb)

Não houve efeito da suplementação da farinha de *Aurantiochytrium* sp. ou do OFB no teor de Hb em juvenis de tilápia-do-nilo, após um período de alimentação de 87 dias a 22°C ou após elevação da temperatura para 28°C, nem após a elevação da temperatura para 33°C (**Tabela 14**). Já o nível de Hb foi significativamente afetado pelo aumento da temperatura (**Tabela 14**). Peixes apresentaram aumento no teor de Hb, após o aumento da temperatura de 22°C para 28°C; entretanto, houve redução nos teores de Hb, após elevação da temperatura para 33°C.

Tabela 14. Valores médios, seguidos dos erros padrões, dos teores de hemoglobina, das atividades das enzimas antioxidantes e dos marcadores de estresse oxidativo, em juvenis de tilápia-do-nilo, após a alimentação com três níveis de inclusão de farinha de *Aurantiochytrium* sp. ou óleo de fígado de bacalhau, por 87 dias a 22°C, seguidos por sete dias de aumento de temperatura, de 22°C a 28°C, além de outros sete dias com aumento de temperatura de 28°C a 33°C.¹

	Hb	Dano ao DNA	CP	CAT	GPx	GSH-t	NPSH
Dieta ²							
D0	9,53 ± 0,45	33,57 ± 5,31	97,05 ± 6,90	98,80 ± 4,01	13,37 ± 1,20	2,00 ± 0,13	2,41 ± 0,19
D1	9,54 ± 0,44	41,72 ± 5,00	95,92 ± 3,51	90,58 ± 4,27	12,85 ± 1,39	1,95 ± 0,16	2,37 ± 0,23
D4	9,43 ± 0,51	38,27 ± 6,15	92,83 ± 4,61	87,04 ± 5,67	12,62 ± 1,66	1,92 ± 0,15	2,36 ± 0,25
OFB	9,12 ± 0,53	27,11 ± 2,3	103,52 ± 7,90	94,00 ± 6,07	13,22 ± 1,41	2,03 ± 0,15	2,42 ± 0,26
Temperatura							
22°C	9,43 ± 0,50 ^b	30,51 ± 4,82	104,65 ± 5,20 ^a	79,58 ± 4,98	12,06 ± 1,30 ^b	1,74 ± 0,13	2,14 ± 0,16 ^b
28°C	10,02 ± 0,32 ^a	40,83 ± 3,01	92,69 ± 4,21 ^b	91,99 ± 5,34	12,39 ± 1,58 ^b	2,14 ± 0,17	2,54 ± 0,20 ^a
33°C	8,29 ± 0,38 ^c	-	94,65 ± 3,01 ^b	105,10 ± 5,80	14,57 ± 1,23 ^a	2,06 ± 0,16	2,60 ± 0,26 ^a
Valor de p ³							
Interação	0,55	0,01	0,13	0,02	0,45	0,03	0,10
Dieta	0,12	0,04	0,11	0,01	0,54	0,36	0,84
Temperatura	<0,001	0,03	0,02	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹ Número de repetições por análise: Hb, hemoglobina, n = 12, g dL⁻¹; dano ao DNA, n = 8 a 9, índice de dano; CP, proteínas carboniladas, n = 5, DPN / coomassie (%); CAT, catalase, n = 10 a 12, µmol H₂O₂ min⁻¹ mg de proteína⁻¹; GPx, glutatona peroxidase, n = 10 a 12, µmol min⁻¹ mg de proteína⁻¹; GSH-t, glutatona total, n = 11 a 12, µmol mL⁻¹; NPSH, tióis não proteicos, n = 11 a 12, µmol mL⁻¹.

² D0: dieta sem farinha de *Aurantiochytrium* sp. (0 g 100 g⁻¹ da dieta seca); D1: dieta com suplementação de 1,0 g 100 g⁻¹ da dieta seca farinha de *Aurantiochytrium* sp.; D4: dieta com suplementação de 4,0 g 100 g⁻¹ da dieta seca farinha de *Aurantiochytrium* sp. e OFB: dieta controle com óleo de fígado de bacalhau.

³ Dados analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey.

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (p < 0,05).

3.3.2 Marcadores de estresse oxidativo

Após o período de alimentação a 22°C, a dieta sem suplementação de DHA propiciou o menor dano ao DNA da tilápia (**Figura 5**); porém, a dieta contendo 1 g 100 g⁻¹ da dieta seca do aditivo causou resultado semelhante à dieta suplementada com OFB. Quando a temperatura foi aumentada para 28°C, a maior inclusão de DHA (4 g 100 g⁻¹ da dieta seca de farinha de *Aurantiochytrium* sp. ou OFB) levou ao menor dano oxidativo do DNA. Já em relação ao efeito da elevação da temperatura para 28°C (**Tabela 14**), houve um aumento no dano ao DNA. O dano ao DNA não foi avaliado a 33°C.

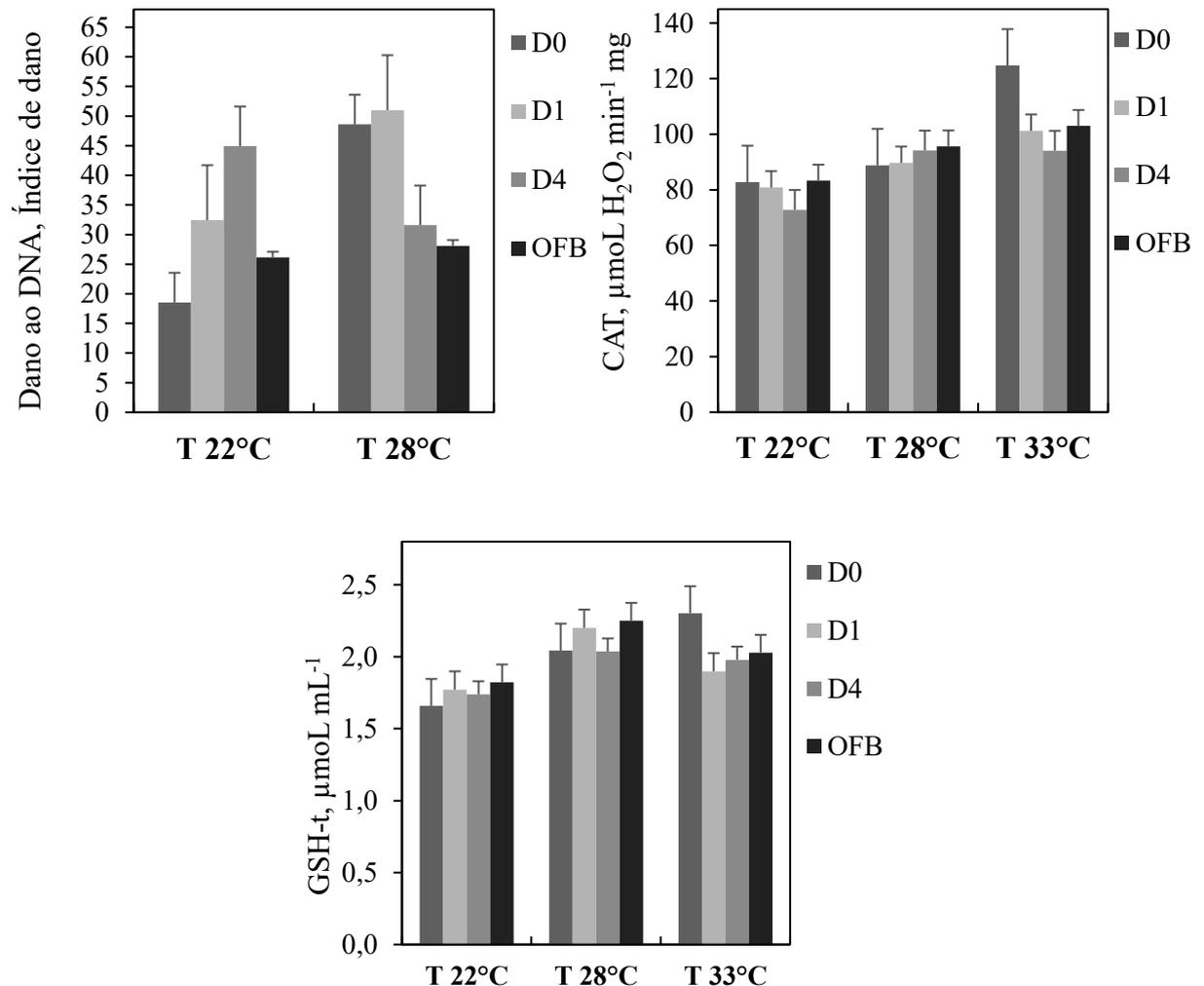
A CP em tilápia-do-nilo não foi influenciada pela suplementação com farinha de *Aurantiochytrium* sp., quando comparada à dieta sem suplementação de DHA ou suplementada com OFB (**Tabela 14**). Houve efeito da temperatura (**Tabela 14**) sobre a resposta da CP. Em tilápias mantidas a temperatura subótima de 22°C levou a uma maior resposta de CP do que os peixes mantidos às temperaturas de 28°C ou de 33°C.

3.3.3 Enzimas antioxidantes

A suplementação com DHA, independente da fonte e quantidade incluída na dieta, não afetou a atividade das enzimas GPx e NPSH em tilápia-do-nilo (**Tabela 14**). No entanto, as tilápias alimentadas com dieta sem suplementação de DHA apresentaram maior atividade da CAT. Por outro lado, ambos os níveis de inclusão dietética de farinha de *Aurantiochytrium* sp. propiciaram valores de CAT semelhantes àqueles apresentados quando a tilápia foi alimentada com dieta suplementada com OFB (**Tabela 14**). A elevação da temperatura levou a um aumento nos valores de todas as enzimas antioxidantes avaliadas, com efeito claro da CAT, GPx e NPSH (**Tabela 14**). Já quando os peixes foram mantidos em temperatura subótima fria, estes apresentaram menor atividade das enzimas antioxidantes em todos os tratamentos alimentares.

A elevação da temperatura para 33°C elevou os valores de CAT e GSH-t quando os peixes foram alimentados com a dieta sem suplementação de DHA (**Figura 5**). A elevação da temperatura de 22°C para 28°C elevou os valores de GSH-t, sendo esse efeito observado em peixes submetidos a todos os tratamentos dietéticos. A única redução na atividade das enzimas antioxidantes com elevação da temperatura ocorreu com a GSH-t em tilápias alimentadas com 1 g 100g⁻¹ da dieta seca de farinha de *Aurantiochytrium* sp., quando a temperatura aumentou de 28 para 33°C (**Figura 5**).

Figura 5. Médias e erro padrão dos teores de dano ao DNA, catalase (CAT) e glutatina total (GSH-t), em juvenis de tilápia-do-nylo, após a alimentação com três níveis de inclusão de farinha de *Aurantiochytrium* sp. ou óleo de fígado de bacalhau, por 87 dias a 22°C, seguidos por sete dias com aumento de temperatura de 22°C a 28°C, além de outros sete dias com aumento de temperatura de 28°C a 33°C. Houve interação significativa entre as dietas e as temperaturas para estas variáveis. D0: dieta sem farinha de *Aurantiochytrium* sp. (0 g 100 g⁻¹ da dieta seca); D1: dieta com suplementação de 1,0 g 100 g⁻¹ da dieta seca farinha de *Aurantiochytrium* sp.; D4: dieta com suplementação de 4,0 g 100 g⁻¹ da dieta seca farinha de *Aurantiochytrium* sp. e OFB: dieta controle com óleo de fígado de bacalhau.

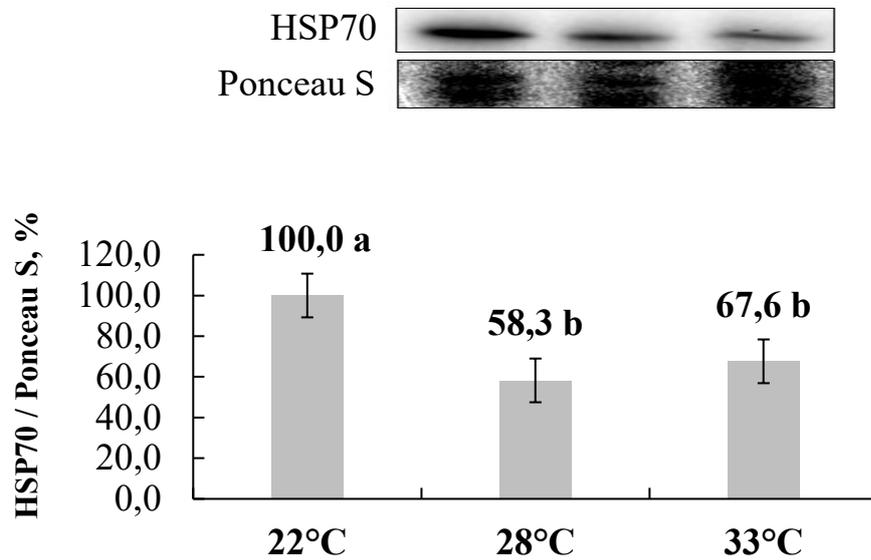


3.3.4 Proteína de choque térmico (HSP70)

A HSP70 foi avaliada em peixes alimentados com OFB em exposição prolongada a 22°C, após elevação da temperatura para 28°C e após o estresse térmico pelo calor (33°C). A temperatura subótima fria de 22°C afetou significativamente os níveis de HSP70 (**Figura 5**). Os peixes mantidos a 22°C por 87 dias apresentaram nível de HSP70 maior que àqueles submetidos a um aumento de temperatura para 28°C (temperatura ótima de crescimento) ou para 33°C (temperatura acima da ótima).

Figura 6. Proteínas de choque térmico (HSP70) no fígado de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com óleo de fígado de bacalhau por 87 dias a 22°C, seguido por sete dias com aumento da temperatura da água de 22°C para 28°C, além de outros sete dias com aumento de temperatura de 28°C a 33°C. Os resultados estão expressos como a média de dez repetições.

^{a,b} Letras diferentes indicam diferença significativa ($P = 0,009$).



3.4 DISCUSSÃO

A variação da temperatura pode afetar muitos aspectos do metabolismo e da fisiologia dos peixes. Portanto, é crucial que tais alterações sejam compreendidas para a melhoria nas estratégias de produção de maneira a minimizar seus efeitos deletérios na tilapicultura.

A Hb é um parâmetro hematológico que pode indicar a homeostase em animais (Wendelaar Bonga, 1997). A temperatura afetou significativamente o nível de Hb (Qiang et al., 2013; Ma et al., 2015; Panase et al., 2018), independente da suplementação ou não com DHA, ou mesmo do nível ou da fonte de suplementação, assim como relatado em outros estudos para a tilápia-do-nilo. Os resultados aqui relatados mostram que a concentração de Hb é maior na temperatura ótima de crescimento (28°C) para a tilápia-do-nilo, mesmo quando os peixes estão submetidos a uma variação na temperatura. Quando os peixes foram submetidos a uma temperatura mais baixa ou mais alta que a ótima de crescimento, os níveis de Hb diminuíram, contatando-se a importância da medida deste parâmetro como indicador da homeostase também na tilápia-do-nilo.

Em temperatura subótima fria, o metabolismo dos peixes é reduzido e menos energia é gasta, portanto, é necessário menos oxigênio (Bowden et al., 2007; Morgan et al., 2008), o que resulta em uma redução da concentração de hemácias, hematócritos e Hb (Bowden et al.,

2007; Ma et al., 2015; Panase et al., 2018). Além disso, o sangue se torna mais viscoso e mais difícil de bombear (Morgan et al., 2018). Portanto, a menor quantidade de Hb promove uma melhora na circulação sanguínea. Após o aumento da temperatura de 22°C para 28°C, a Hb aumentou, provavelmente devido ao aumento no metabolismo e na alimentação. Como outros vertebrados ectotérmicos, os peixes podem se adaptar às mudanças na temperatura ambiental, aumentando seu conteúdo total de Hb, o que pode modificar a quantidade de oxigênio no tecido, afetando a taxa metabólica e a produção de energia (Souza e Bonilla-Rodriguez, 2007). A Hb da tilápia foi reduzida concomitante com a elevação da temperatura da água para 33°C. A dinâmica do oxigênio dissolvido na água de criação pode ter influenciado os resultados de Hb. A solubilidade do oxigênio na água é maior em temperaturas mais baixas, mas, em condições com mesma quantidade de oxigênio dissolvido (em mg por litro), a porcentagem de saturação do oxigênio na água é inferior em temperatura fria quando comparada a temperatura alta. A elevação da temperatura de 22°C para 28°C e 33°C aumentou a saturação do oxigênio na água, aumentando sua disponibilidade para os peixes, o que pode ter sido compensado pelos peixes com a redução na concentração da Hb nos animais mantidos a 33°C. Outra possibilidade é que a alta temperatura possa levar a maior estresse fisiológico na tilápia, ocasionando lesões nos rins e fígado, além de reduzir o nível de contagem de glóbulos vermelhos (Abdel-Tawwab et al., 2010). A diminuição da concentração de Hb após o aumento da temperatura para 33°C no presente estudo foi semelhante à relatada para a tilápia-do-nylo exposta a 30°C ou 34°C (Qiang et al., 2013). Entretanto, esses resultados são diferentes daqueles encontrados por Ma et al. (2015), em que a concentração de Hb aumentou com o aumento da temperatura. Neste estudo, grupos de tilápia-do-nylo com 33 g de peso inicial foram criados durante 40 dias, separadamente, a 22, 28 ou 34 ° C. O valor de Hb em tilápias mantidas constantemente a 34 ° C (11,5 g dL⁻¹, Ma et al., 2015) foi superior ao valor encontrado em tilápias submetidas a 33°C por sete dias, obtido no presente estudo. Tal diferença pode ser explicada por diferenças em relação à duração da exposição à temperatura alta, estado nutricional, manejo, fase de desenvolvimento e genética, entre os estudos.

Há relatos sugerindo que a inclusão alimentar de óleo de peixe oxidado (Huang e Huang, 2004; Gao et al., 2012) ou mesmo de óleos não oxidados (Rady et al., 1990; Huang et al., 1998) pode induzir danos oxidativo nos tecidos de peixes, sendo que todos os estudos citados ocorreram na temperatura ótima de crescimento para a espécie. As moléculas que mais sofrem peroxidação lipídica são fosfolipídios das membranas que contêm PUFA, esses são os principais alvos do ataque de ROS (Abele e Puntarulo, 2004; Gęgotek e Skrzydlewska, 2019).

Quando há uma suplementação dietética de PUFA ou uma mudança de temperatura, os peixes podem necessitar maiores defesas contra os danos oxidativos.

Em nosso estudo a 22°C, o aumento da suplementação dietética com farinha de *Aurantiochytrium* sp., de 1 para 4 g 100 g⁻¹ da dieta seca, induziu um aumento no dano ao DNA da tilápia. Além disso, a 22°C, a dieta suplementada com a outra fonte de DHA, o OFB, propiciou a ocorrência de danos semelhantes aos encontrados nos peixes alimentados com D1, ambas dietas com a mesma concentração de DHA. Para a manutenção da fluidez da membrana em temperatura subótima fria, os peixes aumentam os níveis de insaturação dos ácidos graxos nos fosfolipídios que compõem as membranas celulares (Weber e Bosworth, 2005; Turchini et al., 2009), o que, conseqüentemente, se torna um alvo específico para a ação das ROS. Temperaturas subótimas frias para peixes podem aumentar o estresse oxidativo e o organismo exigirá mais defesas antioxidantes (Qiu et al., 2011), especialmente se alimentado com dietas ricas em LC-PUFAs, como é o caso do presente estudo.

O aumento da temperatura da água está associado a efeitos genotóxicos e também ao aumento da produção de ROS, o que leva ao estresse oxidativo em organismos aquáticos (Bagnyukova et al., 2007; Heise et al., 2006; Donaldson et al., 2008; Malev et al., 2010). Há aumento no consumo de oxigênio e nas taxas metabólicas (Sollid e Nilsson, 2006), apesar da diminuição dos níveis de insaturação de ácidos graxos nos fosfolipídios das membranas para manutenção da sua fluidez. De acordo com Rady et al. (1993) e Ma et al. (2015) em estudos com carpa-comum, *Cyprinus carpio* e tilápia-do-nilo, respectivamente, o acúmulo de PUFAs (principalmente PUFA da série n-3) é característico em baixas temperaturas ambientes, enquanto a síntese de SFA aumenta e a acumulação de PUFA diminui em temperaturas mais altas. No entanto, no presente estudo, a 28°C, a menor inclusão dietética da farinha de *Aurantiochytrium* sp. e a dieta sem suplementação de fonte de DHA levaram a um dano oxidativo maior ao DNA, se comparado com aquele apresentado pelos peixes alimentados com a maior inclusão de farinha de *Aurantiochytrium* sp. ou com OFB. Nos peixes alimentados com OFB, a 22 e 28°C, o menor dano pode ser explicado pela presença de antioxidantes no óleo comercial utilizado, que continha 2 mg ml⁻¹ dl- α -tocoferol de acetato (vitamina E) e tocoferol natural. Sabe-se que, após a alteração da temperatura, a composição dos ácidos graxos das membranas celulares é rapidamente modificada para manter a homeostase e a homoviscosidade e, em temperatura ótima, a deposição de PUFA nas membranas celulares é menor do que em temperatura subótima fria. Portanto, sugere-se que, a 28°C, a quantidade de LC-PUFA nas membranas não foi suficiente para ocasionar dano ao DNA. As altas concentrações de oxigênio

e Hb podem tornar os eritrócitos mais sensíveis a danos oxidativos (Klein et al., 2017), o que pode explicar a 28°C, o maior dano ao DNA dos peixes.

Houve redução da CP após aumento da temperatura em tilápia-do-nylo de 22°C para 28°C e para 33°C. Estes resultados são semelhantes àqueles relatados para o goldfish, *Carassius auratus*, quando submetido a uma temperatura alta (23°C) em comparação com os peixes climatizados ao frio (3°C), em que o fígado apresentou níveis mais baixos de CP por (Bagnyukova et al., 2007). Em peixes antárticos, quando expostos ao aumento da temperatura, não houve diferença na quantidade da CP no fígado (Heise et al., 2006; Klein et al., 2017). Como é sabido, o estresse oxidativo ativa as proteases multicatalíticas, enzimas responsáveis pela degradação de proteínas oxidadas (Starke et al., 1987). Proteínas oxidadas em excesso são degradadas no fígado o que pode compensar a taxa de oxidação proteica e diminuir os níveis de CP no tecido hepático (Bagnyukova et al., 2007; Klein et al., 2017), o que pode explicar nosso resultado.

As enzimas antioxidantes podem metabolizar os produtos da peroxidação lipídica, reduzindo o dano oxidativo (Sies, 1997; Gęgotek e Skrzydlewska, 2019). Desta forma, sugere-se que o estresse térmico causado pela elevação da temperatura de 22°C a 28°C e 33°C promoveu a elevação da atividade das enzimas antioxidantes (CAT, GPx, GSH-t, NPSH). Destaca-se ainda o aumento das atividades da CAT e GSH-t em tilápias alimentadas com a dieta sem suplementação de DHA, somente observado após elevação da temperatura a 33°C. A resposta do sistema de defesa antioxidante e o status oxidativo nos peixes dependerão do tecido analisado, do tempo de exposição (curto ou longo) e da temperatura, bem como da nutrição e genética (Kong et al., 2012; Klein et al., 2017). A produção de ROS pode causar danos celulares, que levam à ativação de mecanismos de defesa antioxidante, como a indução de enzimas eliminadoras de radicais livres, como a superóxido dismutase (SOD), CAT, GPx, GH e tioredoxina redutase (Pandey et al., 2003; Zhou et al., 2010). Essas enzimas antioxidantes são consideradas a primeira linha de defesa contra danos oxidativos após a exposição a curto prazo a mudanças de temperatura (Pandey et al., 2003; Shi et al., 2015). Há relato de aumento das atividades enzimáticas no início do estresse pelo frio, ocorrendo redução gradual em período prolongado de exposição ao frio (Shi et al., 2015), o que demonstra a capacidade adaptativa dos peixes (Hoeijmakers, 2001). Provavelmente, em nosso estudo, a atividade das enzimas antioxidantes também diminuiu ao longo tempo de exposição dos peixes ao estresse térmico frio, mas aumentou após a elevação da temperatura, provavelmente em resposta ao estresse térmico, ao aumento da ROS e do metabolismo.

As proteínas de choque térmico (HSPs) fazem parte da superfamília de chaperonas moleculares, que desempenham papel importante na homeostase proteica e em outras funções celulares (Heikkila, 2017). Na resposta ao choque térmico, as HSPs auxiliam na sobrevivência das células, protegendo os componentes vitais contra danos (Heikkila, 2017). Além disso, a relação entre expressão gênica, regulação, duração e frequência de ocorrência das HSPs está relacionada a um amplo mecanismo influenciado por fatores abióticos (Mottola et al., 2020). Genes diferentes regulam os mesmos processos biológicos em resposta à temperatura, pequenas HSPs são mais eficazes em resposta à flutuação térmica (Heikkila, 2017), enquanto HSPs maiores, como HSP70 e HSP90, são mais expressas durante a exposição constante a altas temperaturas (Podrabsky e Somero 2004). A expressão da HSP70 no fígado é o principal marcador de estresse para animais aquáticos, propiciando proteção e termotolerância durante o estresse térmico (Liu et al., 2019). A exposição ao frio (22°C) a longo prazo promoveu um maior nível de HSP70 no fígado da tilápia-do-nilo. Nosso resultado é semelhante ao relatado em tilápia-do-nilo de 103 g, mantidas a 15°C, onde a HSP70 aumentou no fígado após 12 h exposição (Shi et al., 2015). Resposta similar foi relatada no tecido cerebral de catfish, *Ictalurus punctatus*, submetido ao estresse pelo frio (Ju et al., 2002), mas o mesmo não ocorreu em salmão-do-Atlântico, *Salmo salar* (Zarate e Bradley, 2003) ou matrinxã, *Brycon amazonicus* (Inoue et al., 2008). Em tilápia-do-nilo, baixas temperaturas, como 22°C, podem levar a um estresse térmico maior que altas temperaturas, o que estimula o aumento da HSP70 para melhorar as defesas contra as respostas ao estresse térmico. A suplementação dietética de OFB pode ter aumentado o nível HSP70 no fígado da tilápia-do-nilo em temperatura subótima fria, conforme descrito para tilápia alimentada com 1 g de butirato de sódio kg⁻¹ da dieta seca (o ácido butírico é um ácido graxo de cadeia curta, 4:0), quando houve aumento na expressão da HSP70 (Dawood et al., 2020).

A produção de tilápia-do-nilo ocorre em regiões climáticas subtropicais em todo o mundo. Portanto, informações sobre possíveis danos oxidativos causados por aditivos alimentares, como a farinha de *Aurantiochytrium* sp., rica em DHA, são vitais para o sucesso na produção desta importante espécie aquícola. A suplementação dietética de 1 g 100 g⁻¹ da dieta seca de farinha de *Aurantiochytrium* sp. para a tilápia-do-nilo, quando mantida a 22°C por 87 dias, promove 16% e 5% a mais de ganho em peso, quando comparada à dieta sem suplementação ou com suplementação de 2 g 100 g⁻¹ da dieta seca de OFB, respectivamente (Nobrega et al., 2019). Apesar da suplementação dietética de 1 g 100 g⁻¹ da dieta seca de farinha de *Aurantiochytrium* sp. durante 87 dias a 22°C ter causado danos oxidativos moderados à tilápia-do-nilo, recomenda-se esse nível de inclusão em dietas de inverno, devido ao aumento

significativo no ganho em peso. Mais estudos devem ser realizados para determinar os níveis adequados de vitamina E e/ou antioxidantes com o aumento de LC-PUFA da série n-3 em dietas para tilápia-do-nilo, de forma a prevenir danos oxidativos.

3.5 CONCLUSÕES

A suplementação dietética de farinha de *Aurantiochytrium* sp., rica em DHA, é recomendada para a tilápia-do-nilo, quando mantida por período prolongado em temperatura subótima, pois não há aumento nos danos oxidativos nos peixes durante o período frio ou logo após a elevação de temperatura.

A elevação da temperatura de 22°C para 28°C aumenta a concentração da hemoglobina e aumenta a atividade das enzimas antioxidantes, sugerindo stress oxidativo ou no metabolismo dos peixes. Porém, a resposta dos marcadores de estresse oxidativo ao aumento de temperatura foi conflitante: os danos ao DNA aumentaram, mas a concentração de proteína carbonilada diminuiu.

AGRADECIMENTOS

À Alltech Inc. (USA), que financiou o presente estudo e também produziu o aditivo testado, cujo nome comercial é ALL-G-RICH™. À CAPES-Brasil (Código Financeiro 001) pela concessão de bolsas aos autores Renata O. Nobrega, Rosa O. Batista e Bruna Mattioni e ao CNPq-Brasil, pela concessão de bolsa ao último autor. Agradecemos também à Nicoluzzi Rações Ltda (Penha, Santa Catarina, Brasil) e à Kabsa Exportadora S.A. (Porto Alegre, RS, Brasil) pela doação de ingredientes para a elaboração das dietas experimentais.

3.6 REFERÊNCIAS

A.O.A.C. 1999. Official methods of analysis of the AOAC international (17th ed.). Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists.

Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M. H., Khattab, Y. A. E., Shalaby, A. M. E. 2010. Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture. 298, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.10.027>.

Abele, D. and Puntarulo, S. 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. Comp. Biochem.

Physiol. C 138, 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.05.013>.

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).

Austin, B. and D.A. Austin, 1993. *Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish*. 2nd Edn., Ellis Horwood, London, ISBN: 0-13-059494-6, Pages: 376.

Bagnyukova, T. V., Lushchak, O. V., Storey, K.B., Lushchak, V.I. 2007. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23°C. *J. Therm. Biol.* 32, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.004>.

Bowden, T.J., Thompson, K.D., Morgan, A.L., Gratacap, R.M.L., Nikoskelainen, S. 2007. Seasonal variation and the immune response: a fish perspective. *Fish Shellfish Immun.* 22, 695–706. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.08.016>.

Brignol, F. D., Fernandes, V. A. G., Nobrega, R. O., Corrêa, C. F., Filler, K., Pettigrew, J., Fracalossi, D. M., 2019. *Aurantiochytrium* sp. meal as DHA source in Nile tilapia diet, part II: Body fatty acid retention and muscle fatty acid profile. *Aquac. Res.* 50, 707–716.
<https://doi.org/10.1111/are.13906>.

Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. 2000. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 29, 323-333.
[https://doi.org/10.1016/S08915849\(00\)00302-6](https://doi.org/10.1016/S08915849(00)00302-6).

Corrêa, C.F., Nobrega, R.O., Block, J.M., Fracalossi, D.M. 2018. Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. *Aquaculture.* 497, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.034>.

Corrêa, C.F., Nobrega, R.O., Mattioni, B., Block, J.M., Fracalossi, D.M., 2017. Dietary lipid sources affect the performance of Nile tilapia at optimal and cold, suboptimal temperatures. *Aquacult. Nutr.* 23, 1016–1026. <https://doi.org/10.1111/anu.12469>.

Dawood, M. A. O., Eweedah, N. M., Elbially, Z. I., Abdelhamid, A. I. 2020. Dietary sodium butyrate ameliorated the blood stress biomarkers, heat shock proteins, and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to heat stress. *J. Therm. Biol.* 88, 102-500.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102500>.

Donaldson, M., Cooke, S., Patterson, D., Macdonald, J. 2008. Cold shock and fish. *J. Fish. Biol.* 73, 1491-1530. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02061.x>.

Drabkin, D. L. e Austin, J. H. 1932. Spectrophotometric studies. I. Spectrophotometric constant for common hemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood. *J Biol Chem.* 98(2), 719-33.

Eissa, E.A., Moustafa, M., Abdelaziz, M., Ezzeldeen, N. A. 2008. *Yersinia ruckeri* infection in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, at a semi-intensive fish farm in lower Egypt. *Afr. J. Aquat. Sci.*, 3, 283-286. <https://doi.org/10.2989/AJAS.2008.33.3.13.625>.

Ellman, G. e Lysko, H. 1979. A precise method for the determination of whole blood and

plasma sulfhydryl groups. *Anal. Biochem.* 93, 98–102. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(79\)80122-0](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(79)80122-0).

FAO, 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture, 2020. Sustainability in action.* Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

Fernandes, V. A. G., Brignol, F. D., Filler, K., Pettigrew, J., Fracalossi, D. M. 2019. *Aurantiochytrium* sp. meal as DHA source in Nile tilapia diet, part I: Growth performance and body composition. *Aquac. Res.* 50, 390–399. <https://doi.org/10.1111/are.13887>.

Folch, J., Lees, M., Stanley, G. H. S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.

Gao, Y. Y., Xie, Q. M., Jin, L., Sun, B. L., Ji, J., Chen, F., Ma, J. Y., Bi, Y. Z. 2012. Supplementation of xanthophylls decreased proinflammatory and increased anti-inflammatory cytokines in hens and chicks. *Br. J. Nutr.* 108, 1746–1755. <https://doi.org/10.1017/S0007114512000025>.

Garrido, A., Garrido, F., Guerra, R., Valenzuela, A. 1989. Ingestion of high doses of fish oil increases the susceptibility of cell membranes to the induction of oxidative stress. *Lipids.* 24, 833–835. <https://doi.org/10.1007/BF02544593>.

Gęgotek, A. and Skrzydlewska, E. 2019. Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chem. Phys. Lipids.* 221, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.03.011>.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine* 4th ed. Oxford University Press, New York.

Heikkilä, J. J. 2017. The expression and function of hsp30-like small heat shock protein genes in amphibians, birds, fish, and reptiles. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 203, 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.09.011>.

Heise, K., Puntarulo, S., Nikinmaa, M., Abele, D., Pörtner, H. O. 2006. Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus*. *L. J. Exp. Biol.* 209, 353–363. <https://doi.org/10.1242/jeb.01977>.

Heise, K., Puntarulo, S., Pörtner, H. O., Abele, D. 2003. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 134, 79–90. [https://doi.org/10.1016/s1532-0456\(02\)00212-0](https://doi.org/10.1016/s1532-0456(02)00212-0).

Hoeijmakers, J., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nat. Genet.* 411, 366–374. <https://doi.org/10.1038/35077232>.

Huang, C. H., Huang, M. C., Hou, P. C. 1998. Effect of dietary lipids on fatty acid composition and lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 120:331–336. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10022-6](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10022-6).

- Huang, C. H. and Huang, S. L., 2004. Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation, and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, fed oxidized oil. *Aquaculture*. 237, 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.04.002>.
- Ibrahim, R. E., El-Houseiny, W., Behairy, A., Abo-Elmaaty, A., Al-Sagheer. A. A. 2019. The palliative role of *Eruca sativa* leaves dietary supplementation against oxidative stress, immunosuppression, and growth retardation in temperature-stressed *Oreochromis niloticus*. *J. Therm. Biol.* 84, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.05.026>.
- Inoue, L. A. K. A., Moraes, G., Iwama, G. K., Afonso, L. O. B. 2008. Physiological stress responses in the warm-water fish matrinxã (*Brycon amazonicus*) subjected to a sudden cold shock. *Acta. Amaz.* 38, 603– 609. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000400002>.
- Jerônimo, G. T., Speck, G. M., Cechinel, M. M., Gonçalves, E. L. T., Martins, M. L. 2011. Seasonal variation on the ectoparasitic communities of Nile tilapia cultured in three regions in southern Brazil. *Brazilian J. Biol.* 71, 365-373. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000300005>.
- Joseph, J. D., and Ackman, R. G. 1992. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: Collaborative study. *J. AOAC Int.* 75(3), 488– 506. <https://doi.org/10.1093/jaoac/75.3.488>.
- Ju, Z., Dunham, R. A., Liu, Z. 2002. Differential gene expression in the brain of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in response to cold stress. *Mol. Genet. Genomics.* 268, 87– 95. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0727-9>
- Klein, R. D., Borges, V. D., Rosa, C. E., Colares, E. P., Robaldo, R. B., Martinez, P. E., Bianchini, A. 2017. Effects of increasing temperature on antioxidant defense system and oxidative stress parameters in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. *J. Therm. Biol.* 68, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.02.016>.
- Kong, D., Shang, H., Guo, K., Liu, Y., Zhang, J., Wei, H. 2012. A study on optimizing the cryopreservation methods for *Bama miniature* pig semen. *Exp. Anim.* 61, 533–542. <https://doi.org/10.1538/expanim.61.533>.
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. R., Shacter, E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233, 346–357. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).
- Liu, B., Xie, J., Ge, X.P., Xu, P., Wang, A.M., He, Y.J., Zhou, Q.L., Pan, L.K., Chen, R.L. 2010. Effects of anthraquinone extract from *Rheum officinale* Bail on the growth performance and physiological responses of *Macrobrachium rosenbergii* under high temperature stress. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.018>.
- Liu, X., Shi, H., Liu, Z., Wang, J., Huang, J. 2019. Effect of heat stress on heat shock protein 30 (Hsp30) mRNA expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 19, 681-688. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_8_06.

- Lu, D.L., Ma, Q., Sun, S.X., Zhang, H., Chen, L.Q., Zhang, M.L., Du, Z.Y., 2019. Reduced oxidative stress increases acute cold stress tolerance in zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 235, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.06.009>.
- Luo, S.W., Cai, L., Liu, Y., Wang, W.N. 2014. Functional analysis of a dietary recombinant Fatty acid binding protein 10 (FABP10) on the *Epinephelus coioides* in response to acute low temperature challenge *Fish. Shellfish Immunol.* 36, 475-484. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.028>.
- Luo, S., Huang, Y., Xie, F., Huang, X., Liu, Y., Wang, W., Qin, Q. 2015. Molecular cloning, characterization and expression analysis of PPAR gamma in the orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) after the *Vibrio alginolyticus* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 43, 310-324. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.003>.
- Ma, X.Y., Qiang, J., He, J., Gabriel, N.N., Xu, P. 2015. Changes in the physiological parameters, fatty acid metabolism, and SCD activity and expression in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at three different temperatures. *Fish Physiol. Biochem.* 41, 937–950. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0059-4>.
- Malev, O., Rut, M., Maguire, I., Tambuk, A., Ferrero, E. A. Lorenzon, S., Klobučar, G. R. I. V. 2010. Genotoxic, physiological and immunological effects caused by temperature increase, air exposure or food deprivation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 152, 433-443. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.07.006>.
- Miyashita, T., 1984. *Pseudomonas fluorescens* and *Edwardsiella tarda* Isolated from Diseased Tilapia. *Fish Pathol.* 19, 45–50. <https://doi.org/10.3147/jsfp.19.45>.
- Moldogazieva, N.T., Mokhosoev. I. M., Mel'nikova, T. I. 2019. Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3085756>.
- Montero, D. and Izquierdo, M., 2011. Welfare and health of fish fed vegetable oils as alternative lipid sources to fish oil. In: Turchini, G.M., Ng, W.K., Tocher, D.R. (Eds.), *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 439–486.
- Morgan, R., Finnøen, M. H., Jutfelt, F. 2018. CTmax is Repeatable and Doesn't Reduce Growth in Zebrafish. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25593-4>.
- Mottola, G., Nikinmaa, M., Anttila, K., 2020. Hsp70s transcription-translation relationship depends on the heat shock temperature in zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 240, 110629. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.110629>.
- Muratori, M. C. S., Martins, N. E., Peixoto, M. T. D., Oliveira, A. L., Ribeiro, L. P., Costa, A. P. R., Silva, M.C.C., Leite, R. C. 2001. Mortalidade por "septicemia dos peixes tropicais" em tilápias criadas em consorciação com suínos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, n.6, p.658-662. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000600007>.
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A. P., Nichols, P. D. 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceed. Natio. Acad. Scie.*, 106,

15103–15110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905235106>.

Nobrega, R.O., Batista, R.O., Corrêa, C.F., Mattioni, B., Filer, K., Pettigrew, J.E., Fracalossi, D.M., 2019. Dietary supplementation of *Aurantiochytrium* sp. meal, a docosahexaenoic acid source, promotes growth of Nile tilapia at a suboptimal low temperature. *Aquaculture*. 507, 500–509. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.030>.

Nobrega, R.O., Corrêa, C.F., Mattioni, B., Fracalossi, D.M., 2017. Dietary α -linolenic for juvenile Nile tilapia at cold suboptimal temperature. *Aquaculture*. 471, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.026>.

NRC. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National Research Council. Washington, DC: National Academic Press.

O'Fallon, J. V., Busboom, J. R., Nelson, M. L., Gaskins, C. T. 2007. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *J. Animal Sci.* 85(6), 1511–1521. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-491>.

Panase, P., Saenphet, S., Saenphet, K. 2018. Biochemical and physiological responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, Lin subjected to cold shock of water temperature. *Aquac. Reports*. 11, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.05.005>.

Pandey S., Parvez S., Sayeed I., Haque R., Bin-Hafeez B., Raisuddin S. 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study on river Yamuna fish Wallago attu (Bland Schn.). *Scie. T. Enviro.* 309, 105–115. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00006-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00006-8).

Pimolrat, P., Whangchai, N., Chitmanat, C., Promya, J., Lebel, L. 2013. Survey of climate-related risks to tilapia pond farms in northern Thailand. *Int. J. Geosci.* 4, 54–59. <https://doi.org/10.4236/ijg.2013.45b009>.

Podrabsky, J. E. and Somero, G. N. 2004. Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J. Exp. Biol.* 207, 2237–2254. <https://doi.org/10.1242/jeb.01016>.

Pompma, T. J. and Lovshin, L. L. 1999. Worldwide prospects of commercial production of tilapia. Auburn, Alabama: Auburn University.

Posser, T., de Aguiar, C.B., Garcez, R.C., Rossi, F.M., Oliveira, C.S., Trentin, A.G., Neto, V.M., Leal, R.B. 2007. Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. *Arch. Toxicol.* 81, 407–414. <https://doi.org/10.1007/s00204-007-0177-6>.

Qiang, J., Yang, H., Wang, H., Kpundeh, M.D., Xu, P. 2013. Interacting effects of water temperature and dietary protein level on hematological parameters in Nile tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* (L.) and mortality under *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.003>.

Qiu, J., Wang, W. N., Wang, L. J., Liu, Y.F., Wang, A. L. 2011. Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute

low temperature stress. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 154, 36–41.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.02.007>

Rady, A. A. R., Csengeri I., Matkovics, B. 1990. Phospholipid fatty acid composition and lipid peroxidation in some tissues of carp acclimation to different environmental temperature. *Aquacult. Hung. (Szarvas)* VI, 161-170.

Rady, A.A. 1993. Environmental temperature shift induced adaptive changes of carp (*Cyprinus carpio* L.) erythrocyte plasma membrane in vivo. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 105, 513–518. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90427-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90427-6).

Rossi, A., Bacchetta, C., Cazenave, J. 2017. Effect of thermal stress on metabolic and oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (*Teleostei, Callichthyidae*). *Ecol. Indic.* 79, 361-370. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.04.042>.

Shi, G.-C., Dong, X.-H., Chen, G., Tan, B.-P., Yang, Q.-H., Chi, S.-Y., Liu, H.-Y., 2015. Physiological responses and HSP70 mRNA expression of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under cold stress. *Aquac. Res.* 46, 658–668.
<https://doi.org/10.1111/are.12212>.

Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82:2, 291-295.

Sifa, L., Chenhong, L., Dey, M., Gaglac, F., Dunham, R. 2002. Cold tolerance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in China. *Aquaculture.* 213, 123–129.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00068-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00068-6).

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175, 184–191.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).

Sokolova, I. M. and Lannig., G. 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim. Res.* 37, 181-201. <https://doi.org/10.3354/cr00764>.

Sollid, J. and Nilsson, G. E. 2006. Plasticity of respiratory structures adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 154, 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2006.02.006>.

Souza, P. C. and Bonilla-Rodriguez, G. O., 2007. Fish hemoglobins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40:6, 769–778. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2007000600004>.

Starke, P. E., Oliver, C. N., Stadtman, E. R. 1987. Modification of hepatic proteins in rats exposed to high oxygen concentration. *FASEB J.* 1. 36-39.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.1.1.2886388>.

Tietze, F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. biochem.* 27:3, 502–522.

Turchini, G. M., Torstensen, B. E., Ng, W.K. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition.

Rev. Aquac. 1, 10–57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>

Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Diniz, M. 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. Ecol. Indic. 23, 274-279. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.04.009>.

Ways, P. and Hanahan, D. J. 1964. Characterization and quantification of red cell lipids in normal man. Journal of Lipid Research, 5, 318–328.

Weber, T. E. and Bosworth, B. G. 2005. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish. Aquaculture. 246, 483–492. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.032>.

Wendel, A. 1981. Glutathione Peroxidase. Methods Enzymol. 77, 325–333. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77046-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77046-0).

Wendelaar Bonga S. E. 1997. The stress response in Fish Physiology Review 77: pp. 591-625. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>.

Zarate, J. and Bradley, T. M. 2003. Heat shock proteins are not sensitive indicators of hatchery stress in salmon. Aquaculture. 223, 175– 187. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00160-1).

Zhou, J., Wang, L., Xin, Y., Wang, W.N., He, W.Y., Wang, A.L., Liu, Y. 2010. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. J. Therm. Biol 35, 284–289. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2010.06.004>.

4. CONCLUSÃO GERAL

A suplementação de farinha de *Aurantiochytrium* sp. na faixa de 0,45 a 1,42 g, 100⁻¹ da dieta seca para juvenis de tilápia-do-nylo, quando mantidos a 22°C por 87 dias, melhorou o crescimento, eficiência alimentar, composição lipídica corporal e muscular. Sendo que tilápias alimentadas com 1 g 100 g⁻¹ da dieta seca de farinha de *Aurantiochytrium* sp. apresentaram 5% a mais no crescimento que peixes alimentados com 2 g 100 g⁻¹ da dieta seca de OFB e 16% a mais no crescimento em comparação aos animais alimentados com dieta sem suplementação do DHA.

Há divergência sobre a recomendação diária de ingestão de LC-PUFA da série n-3 para humanos, mas a relação de PUFA n-3 / n-6 recomendada para o consumo humano é de 0,25, a qual foi alcançada na musculatura da tilápia alimentada com 0,50 g 100 g⁻¹ da dieta seca da farinha de *Aurantiochytrium* sp.

A digestibilidade do DHA (96,05%) e de todos os PUFAs foram altas, mesmo em temperatura subótima fria. No entanto, o PAL (52,25%), possui baixa digestibilidade, interferindo na digestibilidade da proteína (68,64%) e do lipídio (68,38%).

A inclusão de 1 g 100 g⁻¹ da dieta seca de farinha de *Aurantiochytrium* sp. em dietas para juvenis de tilápia-do-nylo é segura, pois promoveu poucas alterações nos danos oxidativos basais. Porém a elevação da temperatura da água promoveu alterações significativas nos danos ao DNA e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes. Assim, é importante estudar as exigências das vitaminas lipossolúveis e antioxidantes em dietas de peixes expostos à variação térmica.

A grande quantidade de DHA presente na farinha de *Aurantiochytrium* sp. pode ser uma alternativa para melhor o desempenho produtivo da tilápia durante o inverno, sendo esse um aditivo seguro para o uso na aquicultura.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABDEL-GHANY, H.M., EL-SAYED, A.F.M., EZZAT, A.A., ESSA, M.A., HELAL, A.M., 2019. Dietary lipid sources affect cold tolerance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **J. Therm. Biol.** 79, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.11.009>
- ATWOOD, H.L., TOMASSO, J.R., WEBB, K., GATLIN, D.M., 2003. Low-temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Effects of environmental and dietary factors. **Aquac. Res.** 34, 241–251. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00811.x>
- BAGNYUKOVA, T. V., LUSHCHAK, O. V., STOREY, K.B., LUSHCHAK, V.I. 2007. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23°C. **J. Therm. Biol.** 32, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.004>.
- BATISTA, R. O. 2019. Farinha de *Aurantiochytrium* sp. como suplemento dietético para tilápia-do-nilo em temperatura subótima : retenção de ácidos graxos e alterações metabólicas. 68 p. **Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Agrárias.** Florianópolis, 2019.
- BIANCHI, M. L. P., ANTUNES, L. M. G., 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-30.
- BOZAOGLU, S.A., BILGUVEN, M., 2012. The effects of different oils sources on the growth performance and body composition of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.). **J. Anim. Vet. Adv.** 11, 853-857. <https://doi.org/10.3923/javaa.2012.853.857>.
- BRIGNOL, F.D., FERNANDES, V.A.G., NOBREGA, R.O., FILLER, K., PETTIGREW, J., FRACALOSSO, D.M., 2018. *Aurantiochytrium* sp. meal as DHA source in Nile tilapia diet, part II: body fatty acid retention and muscle fatty acid profile. **Aquac. Res.** 50, 707–716.
- CHANG, Y.M., CAO, D.C., SUN, X.W., LIANG, L.Q., 2006. Changes of serum biochemical indices of common carp affected by cold temperatures. **Chin. J. Fish.** 2, 71–75.
- CHARO-KARISA, H., REZK, M.A., BOVENHUIS, H., KOMEN, H., 2005. Heritability of cold tolerance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles. **Aquaculture.** 249, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.029>
- CHEN, C., SUN, B., LI, X., LI, P., GUAN, W., BI, Y., PAN, Q., 2013. N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Quantification of optimum requirement of dietary linolenic acid in juvenile fish. **Aquaculture.** 416–417, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.003>
- CHEN, Y. P., JIANG, W. D., LIU, Y., JIANG, J., WU, P., ZHAO, J., FENG, L. 2015. Exogenous phospholipids supplementation improves growth and modulates immune response and physical barrier referring to NF-κB, TOR, MLCK and Nrf2 signaling factors in the intestine of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish and Shellfish Immunology.** 47:1, 46–62. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.08.024>

CORRÊA, C.F., NOBREGA, R.O., BLOCK, J.M., FRACALOSSO, D.M., 2018. Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. **Aquaculture**. 497, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.034>

CORRÊA, C.F., NOBREGA, R.O., MATTIONI, B., BLOCK, J.M., FRACALOSSO, D.M., 2017. Dietary lipid sources affect the performance of Nile tilapia at optimal and cold, suboptimal temperatures. **Aquacult. Nutr.** 23, 1016–1026. <https://doi.org/10.1111/anu.12469>

CRAIG, S. R., NEILL, W. H., GATLIN, D. M., 1995. Effects of dietary lipid and environmental salinity on growth, body composition, and cold tolerance of juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Fish Physiol. Biochem.** 14, 49–61. <https://doi.org/10.1007/BF00004290>

DAN, N.C., LITTLE, D.C., 2000. Overwintering performance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) broodfish and seed at ambient temperatures in northern Vietnam. **Aquacult. Res.** 31, 485–493. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00466.x>

DAWOOD, M.A.O., EWEEDAH, N.M., ELBIALY, Z.I., ABDELHAMID, A.I., 2020. Dietary sodium butyrate ameliorated the blood stress biomarkers, heat shock proteins, and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to heat stress. **J. Therm. Biol.** 88, 102500. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.102500>

EL ASELY, A.M., REDA, R.M., SALAH, A.S., MAHMOUD, M.A., DAWOOD, M.A.O., 2020. Overall performances of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) associated with using vegetable oil sources under suboptimal temperature. **Aquac. Nutr.** 1154–1163. <https://doi.org/10.1111/anu.13072>.

FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture, 2020. **Sustainability in action. Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

FAO-FISHSTATJ, 2019. **Software for Fishery and Aquaculture Statistical Time Series**. September 2019. <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>. Date accessed: 20 Sept. 2019.

FAWZIA, S., MAGDY, M., RASHED, M.A., ESSA, M.A., ALI, R.A., BADAWY, E.A., 2016. Differential expression analysis in egyptian redbelly tilapia (*Tilapia zillii*) exposed to cold stress. **Egypt. J. Aquatic Res.** 42, 313–18. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2016.06.005>.

FERNANDES, V.A.G., BRIGNOL, F.D., FILLER, K., PETTIGREW, J., FRACALOSSO, D.M., 2019. *Aurantiochytrium* sp. meal as DHA source in Nile tilapia diet, part I: Growth performance and body composition. **Aquacult. Res.** 50, 390–399. <https://doi.org/10.1111/are.13887>

LEWIS, T.E., NICHOLS, P.T., MCMEEKIN, T.A. The Biotechnological Potential of Thraustochytrids. **Mar. Biotechnol.** 1, 580-587, 1999.

FRACALOSSO, D.M., LOVELL, R.T., 1995. Growth and liver polar fatty acid composition of year-1 channel catfish fed various lipid sources at two water temperatures. **Prog. Fish Cult.** 57, 107–113. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1995\)057<0107:GALPFA>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1995)057<0107:GALPFA>2.3.CO;2).

GARCÍA-ORTEGA, A.; KISSINGER, K. R.; TRUSHENSKI, J. T. Evaluation of fish meal and fish oil replacement by soybean protein and algal meal from *Schizochytrium limacinum* in diets for giant grouper *Epinephelus lanceolatus*. **Aquaculture**, v. 452, p. 1–8, 2016.

GEÇOTEK, A. AND SKRZYDLEWSKA, E. 2019. Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. **Chem. Phys. Lipids**. 221, 46–52.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.03.011>.

GLENCROSS, B.D., 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. **Rev. Aquac.** 1, 71–124.

GUIMARÃES, A. M.; SCHLEDER, D. D.; NAGATA, M.; NÓBREGA, R. O.; FRACALOSI, D. M.; SEIFFERT, W. Q.; VIEIRA, F. N. 2019. *Aurantiochytrium* sp. meal can replace fish oil in practical diets for the juvenile Pacific white shrimp. **Aquaculture Nutrition**. 25, 798–807.

GUPTA, A.; BARROW, C. J.; PURI, M. 2012. Omega-3 biotechnology: Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1733–1745.
HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J. 2007. **Free Radicals in Biology and Medicine** 4th ed. Oxford University Press, New York.

HASSAN, B., EL-SALHIA, M., KHALIFA, A., ASSEM, H., AL BASOMY, A., EL-SAYED, M., 2013. Environmental isotonicity improves cold tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in Egypt. **Egypt. J. Aquatic Res.** 39, 59–65.
<https://doi.org/10.1016/j.ejar.2013.03.004>

HEISE, K., PUNTARULO, S., NIKINMAA, M., ABELE, D., PÖRTNER, H. O. 2006. Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus*. **L. J. Exp. Biol.** 209, 353-363. <https://doi.org/10.1242/jeb.01977>.

HUANG, C. H., HUANG, M.C., HOU, P. C. 1998. Effect of dietary lipids on fatty acid composition and lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.** 120:331–336.
[https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10022-6](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10022-6).

HUANG, C. H. AND HUANG, S. L., 2004. Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation, and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, fed oxidized oil. **Aquaculture**. 237, 381–389.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.04.002>.

IBRAHIM, R. E., EL-HOUSEINY, W., BEHAIRY, A., ABO-ELMAATY, A., AL-SAGHEER, A. A. 2019. The palliative role of *Eruca sativa* leaves dietary supplementation against oxidative stress, immunosuppression, and growth retardation in temperature-stressed *Oreochromis niloticus*. **J. Therm. Biol.** 84, 26-35.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.05.026>.

JERÔNIMO, G. T., SPECK, G. M., CECHINEL, M. M., GONÇALVES, E. L. T., MARTINS, M. L. 2011. Seasonal variation on the ectoparasitic communities of Nile tilapia cultured in three regions in southern Brazil. **Brazilian J. Biol.** 71, 365-373.
<https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000300005>

JOBLING, M., 1994. **Fish bioenergetics-Fish and fisheries series**. Vol. 13, Chapman & Hall, London, UK.

KOUSOULAKI, K., MØRKØRE, T., NENGAS, I., BERGE, R.K., SWEETMAN, J., 2016. Microalgae and organic minerals enhance lipid retention efficiency and fillet quality in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**. 451, 47–57.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.027>.

KOSTAL, V. 2010. Cell structural modifications in insects at low temperatures. **Low Temperature Biology of Insects**. 116–140. Cambridge University Press, U.K.

LEE, M.-C., ZHUO, L.-C., LIN, Y.-H., 2018. Effects of dietary docosahexaenoic acid sources, microalgae meal and oil, on growth, fatty acid composition and docosahexaenoic acid retention of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. **Aquac. Res.** 49, 30–35.

LIMA DE ALMEIDA, C.A.L., LIMA DE ALMEIDA, C.K.L., MARTINS, E.D.F.F., GOMES, Â.M., DA ANUNCIACÃO PIMENTEL, L., PEREIRA, R.T., FORTES-SILVA, R., 2019. Effect of the dietary linoleic/ α -linolenic ratio (n6/n3) on histopathological alterations caused by suboptimal temperature in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **J. Therm. Biol.** 85, 102386. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.07.028>.

LUO, S.W., CAI, L., LIU, Y., WANG, W.N. 2014. Functional analysis of a dietary recombinant Fatty acid binding protein 10 (FABP10) on the *Epinephelus coioides* in response to acute low temperature challenge Fish. **Shellfish Immunol.** 36, 475-484.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.028>.

MA, X.Y., QIANG, J., HE, J., GABRIEL, N.N., XU, P., 2015. Changes in the physiological parameters, fatty acid metabolism, and SCD activity and expression in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at three different temperatures. **Fish Physiol. Biochem.** 41, 937–950. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0059-4>.

MABDEL-AAL, M., 2008. Effects of over-wintering and water depth on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). 8Th Int. Symp. **Tilapia Aquac.** 297–306.

MARCHAN, L.F., CHANG, K.J.L., NICHOLS, P.D., MITCHELL, W.J., POLGLASE, J.L., GUTIERREZA, T. 2018. Taxonomy, ecology and biotechnological applications of thraustochytrids: A review. **Biotechnol. Adv.** 36, 26-46.

MATA-SOTRES, J.A., TINAJERO-CHAVEZ, A., BARRETO-CURIEL, F., PARES-SIERRA, G., DEL RIO-ZARAGOZA, O.B., VIANA, M.T., ROMBENSO, A.N., 2018. DHA (22:6n-3) supplementation is valuable in *Totoaba macdonaldi* fish oil-free feeds containing poultry by-product meal and beef tallow. **Aquaculture**. 497, 440–451.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734544>.

MÉDALE, F., BRAUGE, C., VALLÉE, F., KAUSHIK, S. J., 1995. Effects of dietary protein/energy ratio, ration size, dietary energy source and water temperature on nitrogen excretion in rainbow trout. **Water Sci Technol.** 30:10, 185–194.
<https://doi.org/10.2166/wst.1995.0376>.

MILLER, M. R.; NICHOLS, P. D.; CARTER, C. G. Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium* sp. L oil in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) diets.

Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology, v. 148, n. 2, p. 382–392, 2007.

MOLDOGAZIEVA, N.T., MOKHOSOEV. I. M., MEL'NIKOVA, T. I. 2019. Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases. **Oxid. Med. Cell. Longev.** <https://doi.org/10.1155/2019/3085756>.

MUFATTO, L.M., NOBREGA, R.O., MENOYO, D., FRACALOSSO, D.M., 2019. Dietary ratios of n-3/n-6 fatty acids do not affect growth of Nile tilapia at optimal temperatures (28 °C) nor at temperatures that simulate the onset of winter (22 °C). **Aquacult. Nutr.** 25, 646–661. <https://doi.org/10.1111/anu.12886>

MURATORI, M. C. S., MARTINS, N. E., PEIXOTO, M. T. D., OLIVEIRA, A. L., RIBEIRO, L. P., COSTA, A. P. R., SILVA, M.C.C., LEITE, R. C. 2001. Mortalidade por "septicemia dos peixes tropicais" em tilápias criadas em consorciação com suínos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.53, n.6, p.658-662. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000600007>.

MURRAY, M. W., ANDREWS, J. W., DELOACH, H. L., 1977. Effects of dietary lipids, dietary protein and environmental temperatures on growth, feed conversion and body composition of channel catfish. **J. Nutr.** 107, 272–280. <https://doi.org/10.1093/jn/107.2.272>

NG, W.K., SIGHOLT, T., BELL, J.G., 2004. The influence of environmental temperature on the apparent nutrient and fatty acid digestibility in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed finishing diets containing different blends of fish oil, rapeseed oil and palm oil. **Aquacult. Res.** 35, 1228–1237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01131.x>

NOBREGA, R.O., BANZE, J.F., BATISTA, R.O., FRACALOSSO, D.M., 2020. Improving winter production of Nile tilapia: What can be done? **Aquac. Reports** 18, 100453. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100453>.

NOBREGA, R.O., BATISTA, R.O., CORRÊA, C.F., MATTIONI, B., FILER, K., PETTIGREW, J.E., FRACALOSSO, D.M., 2019. Dietary supplementation of *Aurantiochytrium* sp. meal, a docosahexaenoic acid source, promotes growth of Nile tilapia at a suboptimal low temperature. **Aquaculture.** 507, 500–509. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.030>

NOBREGA, R.O., CORRÊA, C.F., MATTIONI, B., FRACALOSSO, D.M., 2017. Dietary α -linolenic for juvenile Nile tilapia at cold suboptimal temperature. **Aquaculture.** 471, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.12.026>

PEIXE-BR, 2020. Associação Brasileira da Piscicultura. **ANUÁRIO Peixe-BR da piscicultura 2020**, Brazil, pp. 155.

RATLEDGE, C.; LIPPMEIER, C. **Microbial Production of Fatty Acids**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809521-8.00006-4>.

SIES, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp. Physiol.** 82:2, 291-295.
SHI, G.-C., DONG, X.-H., CHEN, G., TAN, B.-P., YANG, Q.-H., CHI, S.-Y., LIU, H.-Y., 2015. Physiological responses and HSP70 mRNA expression of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under cold stress. **Aquac. Res.** 46, 658–668.

<https://doi.org/10.1111/are.12212>

SIFA, L., CHENHONG, L., DEY, M., GAGALAC, F., DUNHAM, R., 2002. Cold tolerance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in China. **Aquaculture**. 213, 123–129. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00068-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00068-6)

SOLLID, J. AND NILSSON, G. E. 2006. Plasticity of respiratory structures adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. **Respir. Physiol. Neurobiol.** 154, 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2006.02.006>.

SOLTAN, M.A., ABDELLA, M.M., EL-SAYAAD, G.A., ABU-EL Wafa, M.H., 2015. Effect of some over- wintering regimes on survival and growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Biological and Chemical Research**, 2: 362-374.

SPRAGUE, M., WALTON, J., CAMPBELL, P. J., STRACHAN, F., DICK, J. R., BELL, J. G. Replacement of fish oil with a DHA-rich algal meal derived from *Schizochytrium* sp. on the fatty acid and persistent organic pollutant levels in diets and flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) post-smolts. **Food Chemistry**, v. 185, p. 413–421, 2015.

SKRETTING, 2016. **Skretting to offer algal oil breakthrough**. Disponível em: <https://www.skretting.com/en/settings/news/general-news/skretting-to-offer-algal-oil-breakthrough/>. Acesso em: 20 julho 2020.

SUN, L.T., CHEN, G.R., CHANG, C.F., 1992. The physiology responses of tilapia exposed to low temperature. **J. Ther. Biol.** 17, 149–153

TAKEUCHI, T., SATOH, S., WATANABE, T., 1983. Requirement of Tilapia nilotica for essential fatty acids. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 49, 1127–1134.

TESHIMA, S.I., KANAZAWA, A., SAKAMOTO, M., 1982. Essential fatty acids of tilapia nilotica. **Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.** 31, 201–204.

TOCHER, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. **Rev. Fish. Sci.** 11, 107–184. <https://doi.org/10.1080/713610925>

TURCHINI, G.M., TORSTENSEN, B.E., NG, W.-K., 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. **Rev. Aquacult.** 1, 10–57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>.

WALLAERT, C., BABIN, P.J., 1994. Thermal adaptation affects the fatty acid composition of plasma phospholipids in trout. *J. Lipid* 29, 373–376. <https://doi.org/10.1007/BF02537193>

WEBER, T.E., BOSWORTH, B.G., 2005. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish. **Aquaculture**. 246, 483–492. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.032>.

WOHLFARTH, G.W., HULATA, G., 1983. **Applied genetics of Tilapias**. ICLARM Studies and Review 6, Manila, Philippines.

WORLDCLIM, 2019. WorldClim - **Global climate data**. September 2019. Disponível em: <http://www.worldclim.org/>. Acesso em: 1 Oct. 2019.

YAMAMOTO, T., SUZUKI N., FURUITA H., 2007. Supplemental effect of bile salts to soybean meal-based diet on growth and feed utilization of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fish. Sci.** 73, 123–131. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01310.x>