



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

Jhonis Ernzen Pessini

**Uso do aditivo alimentar VILIGEN™ em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo**

FLORIANÓPOLIS

2021

Jhonis Ernzen Pessini

**Uso do aditivo alimentar VILIGEN™ em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo**

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

Orientadora: Prof. Dra. Débora Machado Fracalossi  
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Peres Silva

Florianópolis

2021

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

Pessini, Jhonis Ernzen

Uso do aditivo alimentar VILIGEN™ em dietas para juvenis de tilápia-do-nylo / Jhonis Ernzen Pessini ; orientador, Débora Machado Fracalossi, coorientador, Carlos Peres Silva, 2021.

104 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Butirato de Sódio. 3. Levedura hidrolisada. 4. Proteinato de zinco. I. Fracalossi, Débora Machado . II. Silva, Carlos Peres . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Jhonis Ernzen Pessini

**Uso do aditivo alimentar VILIGEN™ em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo**

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

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

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Altevir Signor, Dr.  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

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 em Aquicultura

---

Profª. Dra. Débora Machado Fracalossi  
Orientadora

Florianópolis, 2021.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Édio Luiz Pessini e Roselene Eliza Ernzen, por todo o suporte, apoio, companheirismo e incentivo durante toda a jornada que envolveu graduação, mestrado e, agora, doutorado. Amo vocês! Agradeço ao meu irmão, João Vitor Pessini, por ser o irmão que é e pelo apoio, te amo! Agradeço também a todos os meus familiares pelo incentivo e apoio durante todos esses anos. Amo vocês!

Agradeço a minha namorada, Hella Fernanda Giehl Bressan, por todo o suporte, companheirismo, amor, paciência e apoio nas decisões que tomei. Te amo!

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Débora Machado Fracalossi, em me aceitar e me receber tão bem como orientado e membro do Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI/UFSC). Agradeço por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, pelo suporte durante o doutorado e por ser um exemplo de orientadora. Muito obrigado!

Ao meu coorientador, Prof. Dr Carlos Peres Silva, pelo suporte metodológico para a realização das análises de enzimas digestivas, interpretação dos resultados e apoio na escrita da tese.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr Robson Andrade Rodrigues, Prof. Dr. Alex Pires de Oliveira Nuñez e Prof. Dr. Altevir Signor, pelo aceite em participar da avaliação desta tese e por suas contribuições.

Agradeço ao Douglas Ismael Cadorin, Vitória Daitx de Oliveira, Bruno da Silva Pierri e Antônio Marcos Jaques Ramos pela amizade construída durante o doutorado, pelos incentivos, conversas e companheirismo.

A todos os membros do LABNUTRI/UFSC, que ajudaram e foram fundamentais para a realização dos experimentos e análises laboratoriais desta tese.

À Maria Fernanda Oliveira da Silva, do LABNUTRI/UFSC, pelo auxílio nas análises bromatológicas.

À Lúvia Souza de Sá, José Luiz Pedreira Mouriño e demais colaboradores do Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAQ/UFSC), por ceder o espaço físico para a realização do experimento de desafio bacteriano e análises imunológicas.

Ao Lucas Cardoso, do Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS/UFSC) por todo auxílio e suporte nas análises histológicas.

À Cristina Rios, do Laboratório de Defesas Nucleares (LABDEF/UFSC), por todo auxílio e suporte nas análises enzimáticas.

Ao Prof. Dr. Delano Dias Schleder, por todo auxílio e suporte nas análises metagenômicas.

Agradeço também à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) por ser uma das melhores universidades do país e onde me graduei e realizei meu mestrado. Agradeço ainda ao Grupo de Estudos de Manejo na Aquicultura (GEMAQ/UNIOESTE) e aos professores integrantes deste: Aldi Feiden, Wilson Rogério Boscolo, Altevir Signor e Fábio Bittencourt, por todo apoio, conselhos, puxões de orelha e incentivos. Isso teve influência muito grande na minha formação profissional.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, por toda sua estrutura e pelo acolhimento. É uma das melhores universidades do país e que tive o privilégio de ser aluno.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura (PPGAQI-UFSC) pelos ensinamentos. Agradeço também ao secretário do PPGAQI, Carlito Klunk, pelo seu profissionalismo e competência.

Agradeço à Alltech® (EUA) pelo financiamento desta pesquisa e apoio financeiro para a apresentação dos resultados parciais desta tese em congressos.

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

Muito obrigado!

## RESUMO

Os aditivos alimentares são utilizados na produção animal para promover respostas benéficas aos animais. VILIGEN™ (Alltech®, EUA) é um novo aditivo alimentar desenvolvido com o propósito de melhorar o crescimento e a saúde intestinal, sendo composto por proteinato de zinco, levedura hidrolisada e butirato de sódio. As seguintes respostas à adição crescente deste aditivo foram avaliadas em juvenis de tilápia-do-nylo: desempenho zootécnico, morfologia intestinal, respostas imunológicas, sobrevivência após infecção bacteriana contra *Streptococcus agalactiae*, bem como avaliação da comunidade microbiana intestinal e atividades das enzimas digestivas. Para tanto, grupos de 28 peixes com peso médio inicial de 1,98 g foram distribuídos aleatoriamente em 30 unidades experimentais (200 L), conectadas a um sistema de recirculação. Os grupos de peixes foram alimentados durante 60 dias com as respectivas dietas experimentais, as quais continham níveis crescentes de inclusão de VILIGEN™ (0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg<sup>-1</sup>), além de uma dieta controle, sem a adição do aditivo alimentar. Todos os tratamentos dietéticos foram testados em seis repetições. Os peixes alimentados com as dietas contendo VILIGEN™ apresentaram maior ganho em peso, maior perímetro das dobras intestinais e maior número de células caliciformes na região proximal do intestino, sendo que o nível de suplementação ideal para essas variáveis foi estimado por meio de regressão polinomial em 2,80, 3,30 e 3,50 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente. A imunoglobulina total, após o desafio bacteriano, apresentou resposta linear decrescente aos níveis de inclusão do aditivo alimentar. Não houve efeito do VILIGEN™ nas demais respostas imunológicas avaliadas (lisozima, título de aglutinação e atividade antimicrobiana), bem como na sobrevivência, após a infecção bacteriana. Os peixes alimentados com dietas contendo VILIGEN™ apresentaram maior diversidade alfa de espécies bacterianas no intestino, enquanto os alimentados com as dietas suplementadas com 0,60 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> apresentaram perfil de comunidade bacteriana intestinal distinto em relação aos peixes do grupo controle. Os filos mais abundantes foram: Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Patescibacteria, Chloroflexi, Chlamydiae, Firmicutes, Dependientiae, Planctomycetes. Já os gêneros mais abundantes foram *Legionella*, *Mycobacterium*, *Aurantimicrobium*, *Cetobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Rhodobacter*, *Nordella*, *Rombustia* e *Bacillus*. Houve aumento na atividade da tripsina na porção medial do intestino e redução na atividade da lipase na porção proximal do intestino em peixes alimentados com as dietas suplementadas. A inclusão de VILIGEN™ em dietas para tilápia-do-nylo melhorou os parâmetros zootécnicos, alterou positivamente a morfologia intestinal, além de modular positivamente a comunidade bacteriana intestinal, porém não houve resposta clara nas respostas imunológicas e sobrevivência após desafio bacteriano.

**Palavras-chave:** Aquicultura. Butirato de Sódio. Levedura hidrolisada. Proteinato de zinco.

## ABSTRACT

Feed additives are used in animal production to promote a variety of beneficial responses to animals. VILIGEN™ (Alltech®, USA) is a new feed additive developed with the purpose of improving growth and gut health, including zinc proteinate, hydrolyzed yeast, and sodium butyrate. The following responses to increasing addition of this additive were evaluated in Nile tilapia juveniles: zootechnical performance, intestinal morphology, immune responses, survival after bacterial infection against, as well as evaluation of the intestinal microbial community and digestive enzyme activities. Thus, groups of 28 fish with an average initial weight 1.98 g were randomly distributed into 30 experimental units (200 L), connected to a water recirculation system. Fish groups were fed for 60 days with their respective experimental diets containing increasing levels of inclusion of VILIGEN™ (0.60; 1.20; 2.40 and 4.80 g kg<sup>-1</sup>), in addition to a control diet, without the addition of the feed additive. All dietary treatments were tested in six replicates. Fish fed diets containing VILIGEN™ showed the highest weight gains, the highest perimeter of gut folds, and the highest number of goblet cells in the proximal intestine; the ideal supplementation level for each of these variables were estimated using polynomial regression and were at 2.80, 3.30, and 3.50 g kg<sup>-1</sup>, respectively. After the bacterial challenge, total immunoglobulin showed a decreasing linear response as the supplementation of the additive increased. There was no effect of VILIGEN™ on the remaining immune responses evaluated (lysozyme, agglutination titer, and antimicrobial activity), as well as on the survival after bacterial infection. Fish fed diets containing VILIGEN™ had the highest alpha diversity of bacterial species in the gut, while fish fed diets containing 0.60 and 4.80 g kg<sup>-1</sup> VILIGEN™ had a distinct intestinal bacterial community profile (beta diversity) if compared to fish in the control group. The most abundant phyla were: Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Patescibacteria, Chloroflexi, Chlamydiae, Firmicutes, Dependientiae, and Planctomycetes. *Legionella*, *Mycobacterium*, *Aurantimicrobium*, *Ketobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Rhodobacter*, *Nordella*, *Rombustia*, and *Bacillus* were the most abundant genera. There was an increase in trypsin activity in the midgut and a reduction in lipase activity in the proximal gut in fish fed the diets supplemented with VILIGEN™. The inclusion of VILIGEN™ in Nile tilapia diets improved growth, positively altered gut morphology, and positively modulated the gut bacterial community, but there was no clear response of the feed additive on immune responses nor in survival after bacterial challenge.

**Keywords:** Aquaculture. Hydrolyzed yeast. Sodium Butyrate. Zinc Proteinate.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Molécula de butirato de sódio.....22
- Figura 2.** A) Micrografia eletrônica de célula de levedura em desenvolvimento. A barra representa 5 mm. B) Principais características de uma célula de levedura típica. 24
- Figura 3.** Estrutura simplificada da parede celular de leveduras. ....25
- Figura 4.** Visão geral do benefício causado ao hospedeiro pela presença de prebióticos e imunossacarídeos. Alguns compostos, como MOS ou  $\beta$ -glucano, podem ter ambas as propriedades funcionais, mas a função dupla não é comum a todos os prebióticos. MAMP=padrão molecular associado a micróbios; ROS=espécies reativas de oxigênio. ....27

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Ganho em peso diário de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™ por 60 dias. A linha tracejada representa a maior resposta no ganho em peso diário de acordo com a equação polinomial. ....47
- Figura 2.** Morfometria intestinal de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™. A) número de células caliciformes da região proximal do intestino; B) perímetro de dobra da região proximal do intestino; C) altura da dobra da região distal do intestino; e D) perímetro de dobra da região distal do intestino. As linhas tracejadas representam os valores mais altos ou mais baixos determinados pela equação polinomial (n = 18, dentro de cada porção do intestino).....50
- Figura 3.** Imunoglobulina total no plasma sanguíneo de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™, 14 dias após o desafio bacteriano (n = 18). .... 51
- Figura 4.** Sobrevivência cumulativa de juvenis de tilápia-do-nylo após exposição a *Streptococcus agalactiae* a  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> (n = 40)..... 52

## CAPÍTULO III

- Figura 1.** Curva de rarefação da microbiota intestinal em juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> de VILIGEN<sup>TM</sup> e dieta controle sem suplementação ..... 70
- Figura 2.** Índices de riqueza microbiana (Riqueza e Chao1) e diversidade (Shannon e Inverse Simpson) em juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> de VILIGEN<sup>TM</sup> e uma dieta controle sem suplementação. O asterisco indica diferenças estatísticas quando comparado ao grupo controle. \* = p < 0,05; ● = outlier. .... 70
- Figura 3.** Composição da comunidade bacteriana intestinal em juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> de VILIGEN<sup>TM</sup> e uma dieta controle sem suplementação. A escala multidimensional não métrica (NMDS, do inglês *non-metric multidimensional scale*) e os gráficos de análise de coordenadas principais (PCoA, do inglês *principal coordinates analysis*) são baseados na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis e incorporam a abundância de todas as 1.003.306 sequências (agrupadas em 74 OTUs) no conjunto de dados. Cada ponto corresponde a uma amostra e as elipses definem os intervalos de confiança de 95% para cada grupo. Valor de estresse NMDS = 0,137; PCoA1 = 0,0354 e PCoA2 = 0,0199; PERMANOVA: 0,00 vs 0,60 p = 0,026; 0,00 vs 1,20 p = 0,495; 0,00 vs 2,40 p = 0,067; 0,00 vs 4,80 p = 0,031..... 71
- Figura 4.** A abundância relativa dos filos (A), famílias (B) e gêneros bacterianos (C) mais dominantes no intestino de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> de VILIGEN<sup>TM</sup> e dieta controle sem suplementação..... 73
- Figura 5.** Representação gráfica (mapa de calor) das 74 OTUs identificadas no microbioma intestinal de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo 0,60 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> de VILIGEN<sup>TM</sup> e uma dieta controle sem suplementação. A cor vermelha escura representa maior abundância, enquanto a cor azul escura representa menos abundância. .... 74

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Formulação e composição das dietas experimentais e composição do aditivo alimentar. ....41
- Tabela 2.** Crescimento e sobrevivência de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo diferentes níveis de VILIGEN™ por 60 dias.....48
- Tabela 3.** Composição corporal inicial e final (expressa como peso úmido) e taxa de retenção aparente de proteína (TRAP) em juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™ por 60 dias (n =18). ....48
- Tabela 4.** Morfometria intestinal, nas diferentes porções intestinais, em juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™ por 60 dias (n = 18 em cada porção intestinal).....49
- Tabela 5.** Respostas imunológicas de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™, antes e após o desafio com *Streptococcus agalactiae* (n = 18 desafio anterior n = 12 após o desafio). ....51

### CAPÍTULO III

- Tabela 1.** Formulação e composição das dietas experimentais e composição do aditivo alimentar. ....66
- Tabela 2.** Valores médios de atividade específica de enzimas digestivas nas regiões proximal, medial e distal do intestino de juvenis de tilápia-do-nilo, após 60 dias de alimentação com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™. Valores expressos em U mg de proteína<sup>-1</sup>.....75

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>13</b>
1.1 AQUICULTURA .....	13
1.2 TILÁPIA .....	14
1.3 INTENSIFICAÇÃO E ENFERMIDADES NA PISCICULTURA .....	15
1.4 INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>S. AGALACTIAE</i> .....	16
1.5 ADITIVOS ALIMENTARES .....	17
<b>1.5.1 Ácidos e sais orgânicos na aquicultura.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5.2 Mecanismo de ação dos ácidos orgânicos.....</b>	<b>19</b>
1.5.2.1 <i>Efeito sobre a dieta.....</i>	19
1.5.2.2 <i>Efeito no trato gastrointestinal .....</i>	20
1.5.2.3 <i>Efeito sobre o metabolismo .....</i>	21
1.6 BUTIRATO DE SÓDIO .....	21
1.7 LEVEDURAS .....	24
<b>1.7.1 Levedura hidrolisada .....</b>	<b>26</b>
1.7.1.1 <i>Mecanismo de ação dos <math>\beta</math>-glucanos.....</i>	26
1.7.1.2 <i>Mananoligossacarídeos.....</i>	28
1.7.1.3 <i>Nucleotídeos .....</i>	30
1.8 ZINCO.....	32
1.9 VILIGENT™.....	34
1.10 COMUNIDADE BACTERIANA DO TRATO GASTROINTESTINAL .....	34
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
OBJETIVO GERAL.....	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>CAPÍTULO II: A SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE VILIGENT™ PARA TILÁPIA- DO-NILO MELHORA O CRESCIMENTO E A MORFOLOGIA INTESTINAL .....</b>	<b>37</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
2.1 DESENHO EXPERIMENTAL, DIETAS E ALIMENTAÇÃO.....	39
2.2 PEIXES E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	42
2.3 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO, EFICIÊNCIA ALIMENTAR E COLETA DE AMOSTRAS .....	42
2.4 RESPOSTAS IMUNES .....	43

2.5	COMPOSIÇÃO CORPORAL E DAS DIETAS.....	45
2.6	HISTOLOGIA INTESTINAL .....	45
2.7	DESAFIO COM <i>S. agalactiae</i> .....	45
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
3.1	CRESCIMENTO E EFICIÊNCIA ALIMENTAR.....	47
3.2	COMPOSIÇÃO CORPORAL E TAXA DE RETENÇÃO PROTEICA APARENTE	48
3.3	HISTOLOGIA INTESTINAL .....	49
3.4	RESPOSTAS IMUNES .....	50
3.5	DESAFIO BACTERIANO .....	52
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>
	<b>CAPÍTULO III: A SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE VILIGEN™ MODULA A MICROBIOTA INTESTINAL E A FUNÇÃO DIGESTIVA EM JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO.....</b>	<b>62</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>64</b>
2.1	PLANO EXPERIMENTAL, DIETAS E ALIMENTAÇÃO .....	64
2.2	PEIXES, PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E COLETA DE AMOSTRAS.	65
2.3	DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL .....	67
2.4	ENZIMAS DIGESTIVAS.....	67
2.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	68
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>69</b>
3.1	MICROBIOMA INTESTINAL .....	69
3.2	ENZIMAS DIGESTIVAS.....	72
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>81</b>
	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>88</b>
	<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>89</b>

## CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 AQUICULTURA

Por definição, aquicultura é a criação de espécies que vivem ou tem parte da vida em ambiente aquático (FAO, 2014). Atualmente, é uma atividade multidisciplinar, que envolve a criação de diversos organismos aquáticos, como peixes, moluscos, crustáceos, algas, microalgas e plantas, com o objetivo de incremento da produção por meio de manejo no processo de criação (OLIVEIRA, 2009).

A aquicultura apresentava valores produtivos irrisórios, em meados do século passado. Entre as décadas de 50 e 70, o valor produtivo não ultrapassava 5,2% do total de pescados. No entanto, com a estagnação da pesca extrativista no final da década de 80 e a crescente demanda de pescado para o consumo humano, a aquicultura começou a ter maior participação na produtividade para atender à busca do pescado como alimento. No final da década de 80, a produção aquícola apresentava 9,6% de crescimento anual, chegando a 34% em 2001 e 35,2% em 2002 e (EL-SAYED, 2006). Em números, a produção saltou de 10 milhões de toneladas anuais na década de 90, para mais de 80 milhões de toneladas, em 2018 (FAO, 2020). Este aumento produtivo na aquicultura refletiu positivamente no consumo de pescado pela população, que cresceu de 9,9 kg, na década de 60, para 20,5 kg per capita, em 2018 (FAO, 2020).

Em relação à produtividade entre os países, destaca-se a China, com mais de 49 milhões de toneladas, representando um valor produtivo superior aos demais países combinados. Em seguida, aparecem Índia, Indonésia, Vietnã, Bangladesh, Egito, Noruega, Chile, Mianmar e Tailândia. O Brasil, por sua vez, aparece na décima terceira posição, com pouco mais de 802 mil toneladas produzidas (FAO, 2020). Com relação às principais espécies produzidas mundialmente, destacam-se a carpa-capim *Ctenopharyngodon idellus*, carpa-prateada *Hypophthalmichthys molitrix*, tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus*, carpa-comum *Cyprinus carpio* e carpa-cabeçuda *Hypophthalmichthys nobilis* (FAO, 2020). No Brasil, a principal espécie é a tilápia-do-nilo, com pouco mais de 311 mil toneladas produzidas, o que representa mais de 60% da produção total da aquicultura brasileira, seguida pelo tambaqui *Colossoma macropomum*, com pouco mais de 19% do total produzido e o tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) e tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*), com 7,9% (IBGE, 2019).

## 1.2 TILÁPIA

A tilápia é um peixe de água doce que pertence à família Cichlidae, com 75 espécies descritas (EL-SAYED, 2006). É uma espécie nativa da África que foi introduzida em vários países tropicais, subtropicais e temperados na década de 50, com o objetivo para produção de alimento para consumo humano, pesca, controle de plantas aquáticas e para fins de pesquisa (PILAY, 1990), no entanto, há registros de sua criação desde 2000 a.C.

Em relação à produtividade, o grupo das tilápias apresenta características extremamente favoráveis, tais como: rápido crescimento, tolerância a uma ampla gama de condições ambientais, boa resistência ao estresse e doenças, fácil reprodução em sistemas de criação e em tempo curto, além de ser uma espécie com hábito alimentar em baixos níveis tróficos e aceitação de alimentação inerte imediatamente após a absorção do saco vitelínico (EL-SAYED, 2006). NH<sub>3</sub>

Historicamente, a produção de tilápia apresentava valores abaixo de 1% do total produzido em 1970 (24.633 t) (EL-SAYED, 2006). Entre as décadas de 70 e 90, houve uma expansão de sua produção, que atingiu o valor de 383.654 t, representando cerca de 2,28% do total produzido pela aquicultura. Durante este período, o crescimento médio foi de 14,2% ao ano (EL-SAYED, 2006). Dos anos 90 até o início dos anos 2000, a produção continuou aumentando e atingiu o patamar de 1.505.804 t em 2002, o que representa 2,93% do total produzido pela aquicultura, e o crescimento médio entre esse período foi de 12,2%. Os dados mais atuais de produção de tilápias mostram que este valor chegou a 4.525.400 toneladas em 2018, responsável por 8,3% da produção aquícola total (FAO, 2020).

Dentre as espécies pertencente a este grupo, a *Oreochromis niloticus*, popularmente conhecida como tilápia-do-nilo, é a mais produzida, com mais de 80% do total de produção para este grupo (EL-SAYED, 2006; FAO, 2020). Outras espécies, como a tilápia-moçambicana, *Oreochromis mossambicus*, tilápia-azul, *Oreochromis aureus*, *Oreochromis andersonii*, *Tilapia rendalli*, *Oreochromis macrochir* também são produzidas, mas em menor escala (EL-SAYED, 2006). Os maiores produtores de tilápias mundialmente são a China, com 1.930.000 t, Indonésia, com 1.3500.000 t, Egito, com 900.000 t e o Brasil, com 486.000 t (FAO, 2020; PEIXE BR, 2021). No Brasil, o primeiro registro de produção de tilápia ocorreu em 1995, com 12.014 t (EL-SAYED, 2006). No final de 2002, a produção chegou a 42.003 t, tornando o Brasil um dos principais países produtores na América do Sul (EL-SAYED, 2006). Desde então, a produção apresentou taxa média anual de crescimento em 13,33%, atingindo 486.000 t produzidas em 2020 (PEIXE BR, 2021).

Vários fatores contribuíram para o aumento considerável da produção de tilápias no Brasil, dentre eles, destaca-se a tolerância a uma ampla gama de temperatura, que varia de 10°C a 42°C (ABDEL-GANHY et al., 2019; FAO, 2005). No entanto, seu conforto térmico fica entre 27°C e 30°C; quando fora desta faixa, há prejuízos no consumo e crescimento (EL-SAYED, 2006). Além disso, tolera baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, 0,2 mg L<sup>-1</sup>, e pH entre 5 e 11, porém, entre 5 e 8 encontram-se os melhores resultados zootécnicos. A tecnologia de produção bem estabelecida nas áreas de nutrição, reprodução, manejo produtivo e controle de doenças também deve ser destacado como importante para o expressivo resultado produtivo da tilápia (VALLADÃO et al., 2016).

### 1.3 INTENSIFICAÇÃO E ENFERMIDADES NA PISCICULTURA

Com o objetivo de aumentar a produção e atender à crescente demanda por pescado, a aplicação de novas tecnologias propiciou o crescimento de criações em sistemas intensivos de produção, aumentando assim a produtividade (MARTINS et al., 2004; TAKAHASHI, 2011). Por outro lado, esta intensificação trouxe consequências negativas, como maior densidade de estocagem, deterioração na qualidade da água, aumento da carga orgânica do sistema e maior manuseio dos peixes (BARTON, 2002). Tais fatores favorecem a ocorrência de enfermidades nos peixes e comprometem o sistema imunológico e, conseqüentemente, facilitam a ocorrência de patógenos (MARTINS et al., 2004).

Os microrganismos potencialmente patógenos podem habitar normalmente a superfície corporal, como brânquias, escamas e órgãos internos, além da água, sem ocasionar problemas aos peixes. O surgimento da enfermidade está ligado ao aumento da susceptibilidade do hospedeiro, que geralmente ocorre através das condições de estresse ocasionadas no ambiente de criação (MORAES; MARTINS, 2004; PAVANELLI et al., 2008). Os problemas de enfermidades podem levar os peixes à morte e gerar um enorme prejuízo econômico. Para os peixes, os números podem chegar a US\$ 9,58 bilhões por ano (SHINN et al., 2015). Com relação ao Brasil, estima-se que o prejuízo por enfermidades é de aproximadamente US\$ 85 milhões ao ano (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017), sendo importante salientar que os dados são imprecisos, podendo o prejuízo ser ainda maior. Além disso, é importante destacar a interferência e prejuízo das enfermidades no desempenho produtivo e reprodutivo dos peixes (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017).

Dentre as enfermidades, podemos destacar as bacterianas, que causam grandes mortalidades nos sistemas de produção (PAVANELLI et al., 2008). As principais bactérias de

ocorrência na aquicultura brasileira são: *Streptococcus* spp, *Aeromonas hydrophila* e *Flavobacterium columnare*, agentes da estreptococose, septicemia hemorrágica e columnariose, respectivamente (FIGUEIREDO et al., 2006; FIGUEIREDO; LEAL, 2008; PILARSKI et al., 2008). Além destas, os peixes também podem ser acometidos por doenças causadas por parasitos, fungos e vírus, presentes no ambiente aquático (AL-HARBI, 2016). Portanto, são necessárias boas práticas produtivas a fim de evitar o surgimento de enfermidades, além da utilização de medidas seguras que ajudem na prevenção e tratamento na produção aquícola, principalmente em sistemas intensivos.

#### 1.4 INFECÇÕES CAUSADAS POR *S. AGALACTIAE*

As bactérias do gênero *Streptococcus* estão entre as principais enfermidades em criações de tilápia-do-nylo (EVANS et al., 2009). As bactérias deste gênero apresentam 1 µm de diâmetro, são formadoras de cadeias, anaeróbias facultativas, imóveis, além de serem cocos Gram-positivas (ROBERTS, 2012). Dentre os estreptococos, a *Streptococcus agalactiae* é responsável por grandes perdas na criação de várias espécies no mundo inteiro, independentemente do ambiente ser dulcícola ou marinho (AL-HARBI, 2016). Além de peixes, esta bactéria também acomete répteis, anfíbios, pássaros e mamíferos.

A estreptococose relacionada ao *S. agalactiae* foi relatada em diversos países, como Arábia Saudita, Brasil, Canadá, China, Colômbia, Estados Unidos, Indonésia, Malásia, Tailândia, dentre outros (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011; AL-HARBI, 2016; SALVADOR et al., 2005; MIAN et al., 2009; YE, et al., 2011; Li et al., 2014; HERNANDEZ et al., 2009; BARATO et al., 2015; LUSIASTUTI et al., 2014; MUSA et al., 2009; KAYANSAMRUJ et al., 2014). Dentre as espécies acometidas, destacam-se, além da tilápia-do-nylo, a carpa *Notemigonus cruseleucas*, a garoupa *Epinephelus lancealatus*, a perca *Scortum barcoo* e o camarão-branco-do-pacífico *Litopenaeus vannamei* (SALVADOR et al., 2005; LIU et al., 2014; HASSON et al., 2009; ROBINSON; MEYER, 1966).

*S. agalactiae* pode ser subdividida em nove sorotipos, diferenciando-se na composição do polissacarídeo capsular. No Brasil, encontram-se dois sorotipos, I e III, sendo que o sorotipo I possui uma subdivisão em a e b e os dois estão presentes em fazendas aquícolas nacionais. Primeiramente, acreditava-se que somente tilápias acima de 150 g eram sensíveis à esta bactéria. No entanto, atualmente, sabe-se que ocorrem surtos em juvenis, com peso em torno de 50 g. Além disso, acreditava-se que a doença estava relacionada a elevadas temperatura da água, em torno de 30°C, mas hoje é sabido que a doença ocorre também em temperaturas mais

baixas, por volta de 24°C. No entanto, é importante salientar que as infecções por *S. agalactiae* são mais graves em temperaturas elevadas.

Os principais sinais clínicos de infecções causadas por *S. agalactiae* são septicemia, exoftalmia, opacidade nas córneas, natação errática, aumento de volume visceral, hemorragia nos órgãos internos e melanose (CHEN et al., LI et al., 2014). A infecção ocorre rapidamente, provocando altos índices de mortalidades nos sistemas produtivos (FIGUEIREDO et al., 2006). Além disso, apresenta potencial zoonótico, prejudicando a segurança alimentar do pescado.

Dentre as espécies suscetíveis à infecção por *S. agalactiae*, a tilápia é uma das mais afetadas. Diversos surtos foram relatados, em diferentes países (AL-HARBI, 2016), sendo que sua alta patogenicidade está ligada à capacidade da bactéria superar a barreira hematoencefálica do hospedeiro, ocasionando meningoencefalite (PEREIRA et al., 2010). A via horizontal é a principal via de transmissão, podendo ocorrer entre peixe infectado, alimento contaminado, bem como pela própria água do sistema de criação (LIM; WEBSTER, 2006).

Para minimizar, evitar ou controlar a estreptococose em sistemas de criação, faz-se o uso de antibióticos, administrados via ração. Porém, um dos sinais clínicos iniciais desta enfermidade é a perda de apetite, o que diminui a eficiência do tratamento, principalmente quando diagnosticada tardiamente (KUBITZA, 2001). A vacinação é outra maneira de evitar a infecção por *S. agalactiae*; no entanto, apresenta custos elevados, sendo apenas indicada para peixes acima de 15 g (PRIDGEON; KLESZIUS, 2013). Ainda, a vacina protege especificamente contra um único sorotipo, sendo assim, a doença pode ocorrer se os peixes vacinados forem expostos a outro sorotipo. Portanto, o uso profilático de aditivos que imunomodulam positivamente o sistema imunológico pode ser uma alternativa ambientalmente viável ao uso de antibióticos, considerando sua fácil incorporação em rações para os peixes.

## 1.5 ADITIVOS ALIMENTARES

Aditivos alimentares ou dietéticos podem ser definidos como ingredientes não nutritivos ou componentes não nutritivos de ingredientes que, quando adicionados em formulações de dietas, exercem influência sobre suas propriedades físicas ou químicas, afetando o desempenho ou qualidade dos produtos resultantes da aquicultura (BARROWS, 2000, NRC 2011). No Brasil, a legislação que regulamenta a utilização de aditivos alimentares na alimentação animal os define como substância, microrganismo ou produto formulado que é adicionado intencionalmente a dietas não como ingrediente, que pode ter valor nutritivo ou não, com o intuito de melhorar as características dos produtos utilizados na alimentação animal, dos produtos animais, que melhore o desempenho produtivo e atenda às necessidades nutricionais

(MAPA, 2015). Ainda, podem ser definidos como: 1) aditivos tecnológicos, com finalidade tecnológica; 2) sensoriais, para melhorar ou modificar propriedades organolépticas ou características visuais do produto de origem animal; 3) nutricionais, para manter ou melhorar as características nutricionais e 4) zootécnicos, para melhorar o desempenho produtivo dos animais (MAPA, 2004).

Os aditivos alimentares apresentam uma diversificada natureza química e seu uso em formulações comerciais para espécies aquícolas é bastante variado. O uso desses compostos em dietas tanto pode objetivar a manutenção de características físicas e químicas adequadas da dieta (aglutinantes e conservantes) (NRC, 2011) bem como afetar positivamente o desempenho dos peixes ou a qualidade do produto (probióticos, prebióticos/imunoestimulantes, sais ou ácidos orgânicos, extratos derivados de plantas ou animais) (DAWOOD et al., 2015b; NG; KOH, 2017), dentre outras funções.

A seguir, será apresentado um resumo da influência dos compostos butirato de sódio, levedura hidrolisada desidratada e o proteinato de zinco sobre a nutrição e saúde de espécies aquícolas. Tais compostos estão presentes no aditivo alimentar VILIGEN™, avaliado neste trabalho.

### **1.5.1 Ácidos e sais orgânicos na aquicultura**

Os ácidos orgânicos são compostos orgânicos que apresentam um ou mais grupos carboxila (NG; KOH, 2017), com uma estrutura molecular geral de  $R-COOH$ , em que R representa o grupo funcional monovalente. Os ácidos orgânicos também podem ser chamados de ácidos graxos de cadeia curta, ácidos graxos voláteis ou ácidos carboxílicos fracos. Quando os ácidos orgânicos estão ligados a um sal, são denominados sais de ácidos orgânicos, garantindo maior estabilidade e facilidade de manuseio (NG; KOH, 2017).

A forma de obtenção destas moléculas pode ser 1) natural, através da fermentação de microorganismos, 2) síntese química ou 3) oxidação de ácidos graxos de cadeia longa (THOMAS et al., 2013; PANDEY et al., 2008). Na microbiota intestinal, através da fermentação natural de bactérias, ocorre a formação de diferentes ácidos orgânicos, sendo os principais o ácido propiônico e o butírico (THOMAS et al., 2013; PANDEY et al., 2008). São encontrados em maiores concentrações na região distal do intestino (CLEMETS et al., 1994), sendo utilizados principalmente como fonte de energia para o hospedeiro (SMITH et al., 1996; MOUNTFORT et al., 2002; GERMAN 2009). O hábito alimentar e o habitat são fatores que influenciam a concentração de ácidos orgânicos no intestino de peixes. Como exemplo, peixes

herbívoros marinhos apresentam maiores concentrações de ácidos orgânicos no intestino que os herbívoros de água doce, porém peixes carnívoros apresentam maiores concentrações de ácidos orgânicos que peixes herbívoros e onívoros (SMITH et al., 1996; CLEMENTS et al., 2014).

Os ácidos orgânicos são considerados como acidificantes e são uma alternativa ao uso de antibióticos como promotores de crescimento na aquicultura (LÜCKSTÄDT, 2008). Tradicionalmente, os ácidos orgânicos são utilizados como conservantes no armazenamento de alimentos e ingredientes a fim de prevenir a deterioração do produto por fungos e micróbios (RICKE 2003). Além disso, alguns ácidos orgânicos apresentam efeitos antibacterianos contra patógenos de origem alimentar, como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (CHERRINGTON et al., 1991; VAN IMMERSEEL et al., 2003; SKRIVANOVA et al., 2006).

O relato do uso de sais ou ácidos orgânicos na aquicultura iniciou na década de 80 (RUNGRUANGSAK; UTNE, 1981), em estudo que avaliou o efeito dos ácidos fórmico ou sulfúrico em dietas para a truta-arco-íris *Salmo gairdneri* sobre o crescimento e atividade de proteases digestivas. Mais tarde, Fauconneau (1988) avaliou a possibilidade de substituição de proteína por ácido cítrico em truta-arco-íris. Na década de 90, houve um aumento nos estudos envolvendo ácidos orgânicos, destacando-se o desenvolvido por RINGØ (1991), avaliando o lactato e propionato em dietas para truta-do-ártico *Salvelinus alpinus* e, posteriormente, avaliando o formato e acetato para a mesma espécie (RINGØ, 1992; RINGØ, 1991; RINGØ; OLSEN; CASTELL, 1994). Posteriormente, Vielma e Lall (1997) avaliaram a inclusão do ácido fórmico em dietas sobre a digestibilidade de minerais para a truta-arco-íris *Oncorhynchus mykiss*. Desde então, houve um aumento considerável em estudos envolvendo a utilização de ácidos orgânicos em dietas, principalmente a partir dos anos 2000 (NG; KOH, 2017).

## **1.5.2 Mecanismo de ação dos ácidos orgânicos**

### *1.5.2.1 Efeito sobre a dieta*

As rações, por serem ricas em nutrientes, apresentam características altamente favoráveis ao crescimento de fungos, bactérias ou leveduras, os quais podem contaminar as dietas (LUCKSTADT, 2008). Fatores como alta umidade (>14%), ambientes quentes e mau armazenamento são favoráveis ao crescimento destes micróbios. A maioria das espécies bacterianas apresentam requisitos específicos de pH para ótimo crescimento e não se desenvolvem em condições ácidas (pH < 4,5). Deste modo, os acidificantes funcionam como conservantes, reduzindo o pH do meio por meio da liberação de íons de hidrogênio (prótons) e,

assim, dificultando e/ou prevenindo o crescimento microbiano. Estes microorganismos podem ser patogênicos ou apresentar metabólitos tóxicos aos peixes, como as micotoxinas (LUCKSTADT, 2008, NG; KOH, 2017). Portanto, a acidificação das dietas, por meio da utilização de ácidos orgânicos, melhora a qualidade higiênica e reduz a perda de seu valor nutritivo durante o armazenamento (NG; KOG, 2017).

#### *1.5.2.2 Efeito no trato gastrointestinal*

A ação dos ácidos orgânicos no trato gastrointestinal pode ocorrer por meio de dois mecanismos distintos: primeiro, reduzindo o pH estomacal, através da liberação de íons  $H^+$ , o que favorece a ativação da pepsina (LUCKSTADT, 2008). Esta medida pode ser utilizada em situações em que ocorrem altos consumos de ração, como na alimentação de juvenis ou quando se utilizam dietas ricas em proteínas. Em ambos os casos, há prejuízo na concentração de ácido clorídrico no estômago, o que afeta negativamente a ativação e secreção das enzimas proteolíticas que ali atuam (LUCKSTADT, 2008). A inclusão de acidificantes nas dietas ajuda a minimizar este efeito, reduzindo o pH no estômago e melhorando a digestão, aumentando tanto a retenção de nitrogênio como a digestibilidade dos nutrientes (ØVERLAND et al., 2000).

Já, no segundo mecanismo, os ácidos orgânicos, por apresentarem baixo peso molecular e serem lipofílicos, podem se difundir através da parede celular de bactérias, principalmente as Gram-negativas, se dissociando e liberando prótons no citoplasma. Isto acarreta um gasto excessivo de energia por parte das células bacterianas para transportar os prótons intracelulares ao meio externo, visando manter o equilíbrio do pH celular, o que pode levar a célula bacteriana à morte, principalmente as bactérias patogênicas (LUCKSTADT, 2008). Com isso, os ácidos orgânicos afetam a comunidade bacteriana no trato gastrointestinal, visto que minimizam ou inibem o crescimento de bactérias patogênicas ou potencialmente patogênicas (NG; KOH, 2017), favorecendo o crescimento de bactérias benéficas, que são tolerantes a ácidos e não reduzem sua população ou até mesmo a aumentam (LUCKSTADT, 2008). A mudança na população e composição do microbioma intestinal acarreta impactos significativos no desempenho, utilização de nutrientes, respostas imunes e resistência contra patógenos em animais de criação e Ng e Koh (2017) enfatizam que pesquisas são necessárias em peixes para elucidar os efeitos dos ácidos orgânicos sobre as mudanças na microbiota intestinal.

### 1.5.2.3 Efeito sobre o metabolismo

A maioria dos ácidos orgânicos apresenta altos valores de energia bruta, sendo geralmente absorvidos via difusão passiva através do epitélio intestinal (LUCKSTADT, 2008). Posteriormente, são utilizados em diversas vias metabólicas para geração de energia, como o ácido láctico, que fornece piruvato; ácido cítrico e fumarato que participam como intermediários no ciclo de Krebs e o butirato de sódio, que pode ser utilizado como fonte energética (LUCKSTADT, 2008; LEHNINGER, 2007).

### 1.5.2.4 Efeito sobre a disponibilidade de minerais

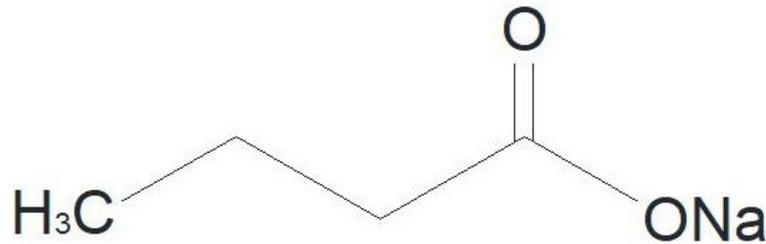
Os ácidos orgânicos também podem afetar positivamente a disponibilidade minerais, principalmente o fósforo em dietas com ingredientes vegetais, visto que grande parte do fósforo oriundo destes ingredientes está na forma de ácido fítico, que não é digerido pelos animais monogástricos, já que não produzem a enzima fitase (NG; KOH, 2017). Os ácidos orgânicos podem promover a atividade da fitase microbiana no intestino, a qual é mais eficiente em ambientes com pH mais baixo (DIBNER; BUTTIN 2002; de WET 2005). Assim, como os ácidos orgânicos possuem capacidade acidificante, favorecem a ação desta enzima, aumentando a disponibilidade de fósforo ao animal e, conseqüentemente, diminuindo a excreção deste mineral. Além disso, os ácidos orgânicos, ao se dissociarem no intestino, podem atuar como agentes quelantes, ligando-se a cátions e formando complexos minerais ao longo do intestino, que resultam em maior absorção de minerais pelo epitélio intestinal (RAVINDRAN; KORNEGAY 1993), como evidenciado em diversos trabalhos (KOH et al., 2016; ZHU et al., 2014; BARUAH et al., 2007; HOSSAIN et al., 2007; SARKER et al., 2005).

## 1.6 BUTIRATO DE SÓDIO

Butirato de sódio é o nome tradicional do ânion do ácido butírico (Figura 1). É um dos acidificantes mais estudados na nutrição humana e animal. Seguindo esta tendência, seu uso em dietas na aquicultura tem sido amplamente estudado, com efeitos benéficos sobre o desempenho e eficiência alimentar (HOSEINIFAR; SUN; CAIPANG, 2016). Para o bagre africano *Clarias gariepinus*, a inclusão de 2 g kg<sup>-1</sup> de butirato de sódio em dietas contendo farinha de peixe, acarretou maior crescimento e melhor conversão alimentar (OWEN et al., 2006). Similarmente, Robles et al. (2013) relataram que a inclusão de 3 g kg<sup>-1</sup> em dietas para a dourada *Sparus aurata* proporcionou maior ganho em peso. Já para a carpa comum, a inclusão de apenas 0,3 g kg<sup>-1</sup> foi suficiente para aumentar o ganho em peso e melhorar a conversão alimentar (LIU et al., 2014).

A inclusão de  $0,02 \text{ g kg}^{-1}$  de butirato de sódio em dietas contendo altas doses de farelo de soja para linguado *Scophthalmus maximus* melhorou os índices zootécnicos, aumentou a superfície de absorção de nutrientes no intestino, melhorou a digestibilidade de nutrientes (LIU et al., 2019). Para o camarão-branco-do-pacífico *Litopenaeus vannamei*, apesar da inclusão de uma dose bem mais elevada ( $20 \text{ g kg}^{-1}$ ) de butirato de sódio na dieta, houve efeito positivo sobre o crescimento e eficiência alimentar, além de aumentar a retenção de nitrogênio, taxa de sobrevivência e rendimento dos camarões em comparação aos alimentados com a dieta controle (SILVA et al., 2016). Estas diferenças entre as doses de inclusão de butirato de sódio e respostas positivas sobre o desempenho produtivo pode estar ligado com a forma que este é adicionado as dietas. Por exemplo, se o butirato de sódio é adicionado na sua forma protegida ou não, o que influencia na absorção deste composto: o butirato de sódio não protegido é rapidamente absorvido na primeira porção do intestino, sendo utilizado como fonte energética (ROEDIGER, 1980). Por outro lado, em sua forma protegida, há uma liberação gradual por todo o intestino, aumentando a energia ao longo do epitélio intestinal (JESUS et al., 2019).

**Figura 1.** Molécula de butirato de sódio.



Fonte: Adaptado de Sigma-Aldrich, 2020.

Além dos efeitos positivos sobre o desempenho, Robles e colaboradores (2013) demonstraram o efeito benéfico do butirato sobre os metabólitos intestinais, onde intermediários da glicólise, 2-fosfoglicerato e 3-fosfoglicerato se acumularam em peixes alimentados com dietas suplementadas com butirato de sódio. Os autores ligam este fato à inibição do butirato de sódio sobre o ciclo da glicólise já que este é uma fonte energética preferencial à glicose. Além disso, os autores relataram que a suplementação de butirato de sódio em dietas poupou a oxidação de aminoácidos, aumentando a absorção de aminoácidos essenciais no intestino e, conseqüentemente, aumentando sua biodisponibilidade na circulação arterial.

Além dos efeitos positivos sobre o crescimento, eficiência alimentar e metabolismo, o butirato de sódio apresenta efeitos benéficos sobre respostas imunológicas, resistência a doenças e modulação do microbioma intestinal, este último, com poucos relatos na literatura

(LIU et al., 2019). Doses de 5, 10 e 20 g kg<sup>-1</sup> foram efetivas em diminuir o crescimento de *Vibrio sp.* no intestino do camarão-branco-do-pacífico, além de aumentar a aglutinação sérica (SILVA et al., 2016). No linguado, além de mitigar sintomas inflamatórios intestinais, como a diminuição de infiltrados leucocitários na *lamina propria*, e diminuir a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B, aumentou a expressão gênica das junções oclusivas claudina-4, ocludina e zonula occludens-1, que desempenham papel importante na regulação da barreira mecânica intestinal (LIU et al., 2019). Com relação ao microbioma intestinal, os peixes alimentados com dietas contendo farelo de soja e butirato de sódio apresentaram uma composição microbiana intestinal mais próxima ao grupo alimentado com farinha de peixe, com aumento da abundância de bactérias do filo Proteobacteria e Actinobacteria, quando comparado aos peixes alimentados com dietas contendo farelo de soja sem a inclusão de butirato de sódio, minimizando o efeito adverso de altos níveis de inclusão deste ingrediente em dietas para o linguado (LIU et al., 2019).

Para a carpa-comum *Cyprinus carpio*, a inclusão de butirato de sódio microencapsulado nas dietas (0,3 g kg<sup>-1</sup>) proporcionou um estímulo nas respostas imunológicas, além de melhorar a condição intestinal, sendo este efeito mais acentuado quando os peixes foram alimentados com óleo oxidado (LIU et al., 2014). Em robalo-europeu *Dicentrarchus labrax*, além de melhorar o ganho em peso e diminuir o pH intestinal, a inclusão do polímero  $\beta$ -hidroxibutirato em dietas alterou a comunidade microbiana intestinal, após seis semanas de alimentação (DE SCHRYVER et al., 2010).

Para tilápia-do-nilo, a oferta de dietas contendo 0,05 g kg<sup>-1</sup> do polímero  $\beta$ -hidroxibutirato por 28 dias resultou em melhores taxas de crescimento específico (SITUMORANG et al., 2016). Em estudo mais recente, Jesus e colaboradores (2019a) avaliaram a inclusão de diferentes níveis de butirato de sódio nas formas protegidas (óleo e tampão) e verificaram que, independentemente da forma de proteção, o butirato de sódio melhorou os índices zootécnicos durante o período de reversão sexual para a tilápia-do-nilo. Além disso, os peixes alimentados com butirato de sódio (0,05 e 0,025 g kg<sup>-1</sup>) apresentaram maior contagem de monócitos, células imunológicas do sistema inato, com atividade citotóxica e fagocítica, que são transitórias e, durante o processo inflamatório, migram e se transformam em macrófagos (BILLER-TAKAHASHI; URBINATI, 2014). Além de melhorar os índices zootécnicos, a inclusão de butirato de sódio em dietas promoveu aumento da área de absorção de nutrientes no intestino, verificado via histologia e microscopia eletrônica de transmissão, além da diminuição no número de células calciformes, possivelmente ligado a ausência de

agentes estressores, diminuindo a necessidade da produção dessas células (JESUS et al., 2019b).

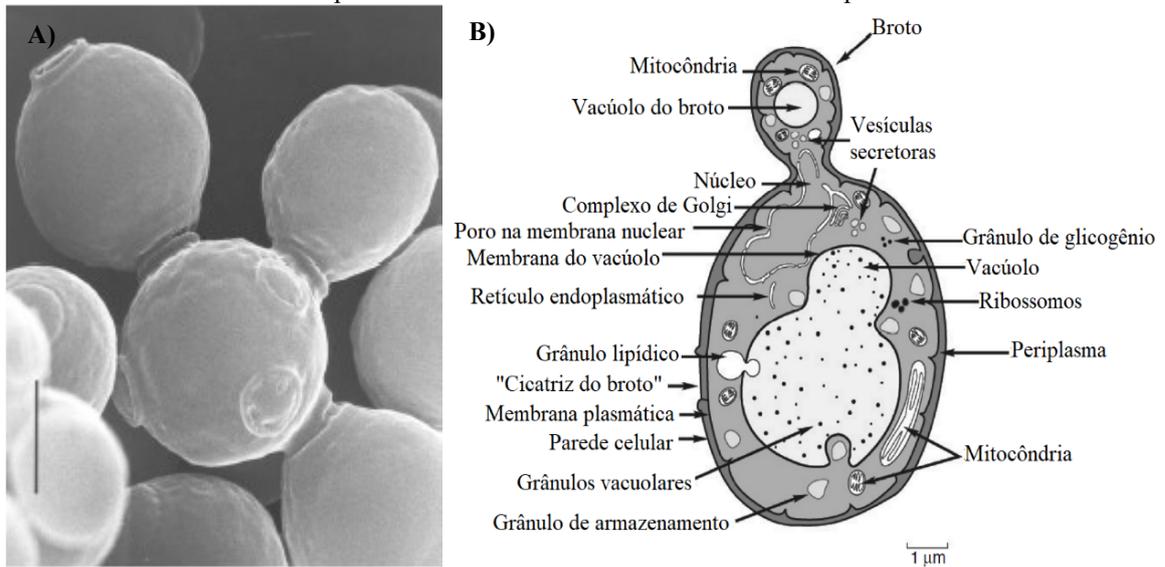
## 1.7 LEVEDURAS

As leveduras são microrganismos unicelulares (Figura 2a e b), pertencentes ao reino *Fungi* que variam de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de comprimento e de 5 a 7  $\mu\text{m}$  de largura (RUSSEL, 2006), reproduzindo-se de forma sexuada ou assexuada e apresentando melhor desenvolvimento em fermentação alcoólica (HORII, 1997). São consideradas as fontes mais antigas de proteínas unicelulares, sendo amplamente usadas na alimentação humana e animal, destacando-se a espécie *Saccharomyces cerevisiae* (BARBALHO, 2009).

A composição proximal das leveduras é bastante variável por depender de diferentes fatores, tais como a natureza do subproduto utilizado, concentração de sais, tampões utilizados no processo de fermentação, espécie de levedura, aeração do meio, secagem, dentre outros (BAPTISTA, 2001). Em geral, a composição proximal das leveduras inclui 42,60% de proteína bruta, 1,00% de lipídios, 3,20% de fibras e 6,60% de cinzas e, cerca de 15% a 20% da matéria seca total da levedura é representada pela parede celular, rica em  $\beta$ -glucanos, mananoligossacarídeos e quitinas (Figura 3) (CABIB; ROBERTS; BOWERS, 1982). Após a descoberta das propriedades benéficas dos compostos presentes nas leveduras, diversos processos de isolamento e purificação foram desenvolvidos para utilização destes como nutrientes funcionais (FREIMUND et al., 2003). Dentre esses compostos, podemos destacar os nucleotídeos, nucleosídeos, aminoácidos, fibras, lipídios, vitaminas do complexo B, ácidos ribonucleicos, mananos, glucanos, trealoses e glicogênio (SARWAR et al., 1985).

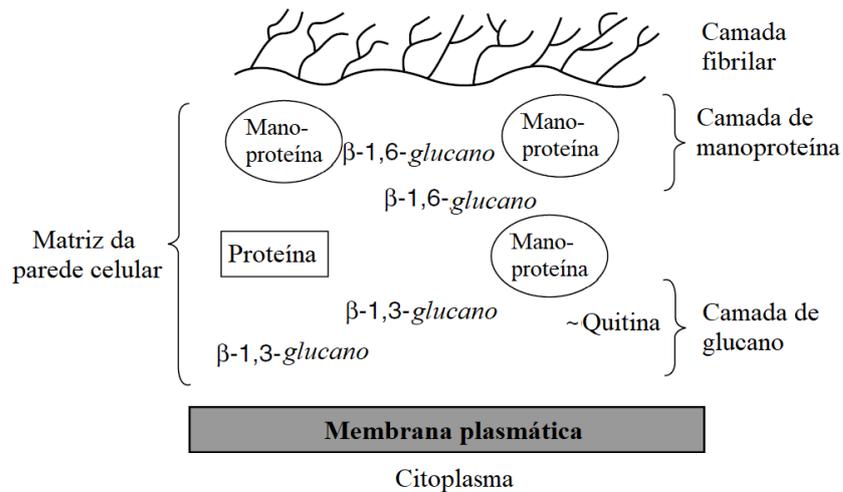
A obtenção dos compostos benéficos é dependente do método de processamento das leveduras: 1) a levedura-seca, que é obtida por evaporação a vácuo ou pelo método de *spray-dry*, é uma fonte rica em proteína, aminoácidos e carboidratos; 2) a levedura em sua forma ativa, utilizada como probiótico e 3) a levedura hidrolisada, onde ocorre a hidrólise da parede celular, expondo o citoplasma e disponibilizando uma grande quantidade de nucleotídeos, polipeptídios, vitaminas e os compostos da parede celular [ $\beta$ -glucanos, mananoligossacarídeos (MOS) e quitina] (SILVA, 2009; HUIGE, 2006).

**Figura 2.** A) Micrografia eletrônica de célula de levedura em desenvolvimento. A barra representa 5 mm. B) Principais características de uma célula de levedura típica.



Fonte: Adaptado de Priest e Stewart (2006).

**Figura 3.** Estrutura simplificada da parede celular de leveduras.



Fonte: Adaptado de Priest e Stewart (2006).

Os compostos com o objetivo de modular a microbiota intestinal e/ou o sistema imune são classificados como prebióticos, que geralmente são compostos não digeridos pelo hospedeiro (RINGØ et al., 2010). Alguns destes compostos, como mananoligossacarídeos (MOS) e β-glucanos, apresentam a capacidade de modulação da microbiota intestinal e ação imunomodulatória; entretanto, esta dupla função não se aplica a todos os prebióticos (SEONG et al., 2014).

### 1.7.1 Levedura hidrolisada

A obtenção da levedura hidrolisada se dá pela hidrólise da parede celular de *S. cerevisiae*, que ocorre por meio de enzimas endógenas e exógenas. Este processo também pode ocorrer por meio de autodigestão, denominado autólise, que consiste na quebra de proteínas, glicogênio, ácidos nucleicos e outros componentes da célula por ação de enzimas intracelulares, sendo que este processo ocorre naturalmente na fase de apoptose celular. Para atingir os anseios comerciais e otimizar este processo, é realizada a hidrólise da parede de levedura por meio da indução com agentes químicos, físicos ou enzimáticos a fim de diminuir o tempo de reação, aumentar o rendimento e minimizar contaminações e deteriorações (VOSTI; JOSLYN, 1954).

Dentre os compostos presente na parede de leveduras, os  $\beta$ -glucanos são polissacarídeos de cadeia longa, que também podem ser encontrados na parede celular de plantas, algas e bactérias. Os  $\beta$ -glucanos oriundos da levedura, são do tipo  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos e são conhecidos moduladores do sistema imune (RINGØ et al., 2012; BARMAN et al., 2013), com resultados positivos em espécies aquícolas já relatados em revisões de literatura sobre este tema (RAA, 1996; GANNAM; SCHROCK, 1999; SAKAI, 1999; BRICKNELL; DALMO, 2005; RINGØ et al., 2012; SONG et al., 2014). Além dos  $\beta$ -glucanos, a parede das leveduras é também rica em MOS e nucleotídeos (HALAS; NOCHTA, 2012; RINGØ et al., 2012).

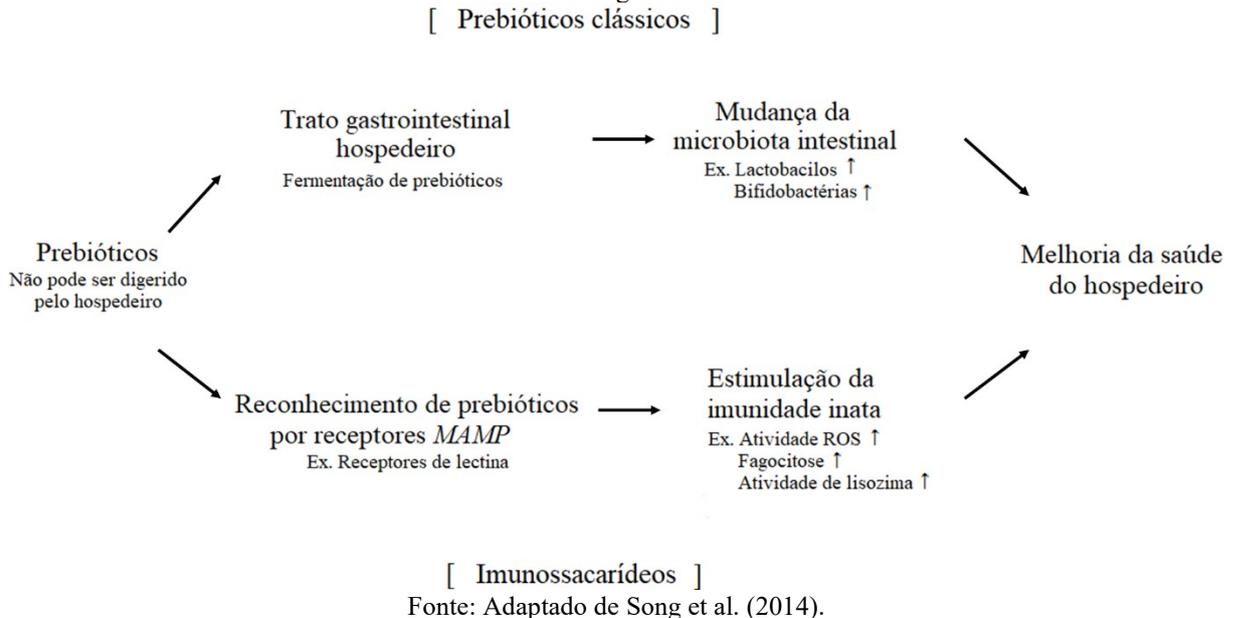
#### 1.7.1.1 Mecanismo de ação dos $\beta$ -glucanos

O reconhecimento de patógenos invasivos é fundamental para a ativação do sistema imunológico e isto ocorre através da ligação dos receptores de reconhecimento padrões (PRR, do inglês *pattern recognition receptors*) que se ligam aos micróbios associados a padrões moleculares (MAMPs, do inglês *microbe associated molecular patterns*) (RINGØ et al., 2012, PALM; MEDZHITOV, 2009). Posteriormente, ocorre a ativação de moléculas transdutoras de sinal, que estimulam as células imunes (YADAV; SCHOREY, 2002), resultando no aumento da fagocitose por neutrófilos e monócitos, aumento de linfócitos, imunoglobulinas séricas e atividade de lisozima (SAKAI, 1999).

Outra forma de ação dos  $\beta$ -glucanos é através de sua metabolização por bactérias específicas que promovem a modulação do microbioma intestinal (SONG et al., 2014). Estas bactérias são consideradas benéficas à saúde e ao crescimento do hospedeiro, minimizando a presença de patógenos no trato gastrointestinal (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Portanto, os  $\beta$ -glucanos podem atuar de duas maneiras: (1) estimulando diretamente o sistema imunológico ou (2) aumentando o crescimento da microbiota comensal (SONG et al., 2014 - Figura 4).

Entretanto, Ringø e colaboradores (2012) destacam que o conhecimento sobre a capacidade dos imunostimulantes, como os  $\beta$ -glucanos, em modular positivamente a microbiota intestinal são escassos.

**Figura 4.** Visão geral do benefício causado ao hospedeiro pela presença de prebióticos e imunossacarídeos. Alguns compostos, como MOS ou  $\beta$ -glucano, podem ter ambas as propriedades funcionais, mas a função dupla não é comum a todos os prebióticos. MAMP=padrão molecular associado a micróbios; ROS=espécies reativas de oxigênio.



Basicamente, os  $\beta$ -glucanos podem ser administrados de três maneiras: injeção, imersão e absorção oral (BARMAN et al., 2013). Os autores relatam que a forma injetável resulta em potentes respostas imunes inatas, mas demanda mais tempo e mão-de-obra, o que acaba aumentando os custos produtivos. Por outro lado, a imersão é mais econômica que a forma injetável, mas as respostas imunes são menos acentuadas. Por fim, a ingestão oral produz boas respostas imunes inatas e é o método mais econômico e viável, visto que permite tanto a inclusão do prébiotico na formulação, durante a elaboração da ração, como na cobertura do pélete, normalmente usando óleo de peixe como revestimento (BARMAN et al., 2013). Abaixo, segue um sumário de estudos com espécies aquícolas que avaliaram a inclusão de  $\beta$ -glucanos.

Dawood e colaboradores (2020) avaliaram a inclusão de  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $\beta$ -glucanos em dietas sobre o crescimento, morfometria intestinal, parâmetros imunes e genes relacionados ao sistema imune em juvenis de tilápia-do-nilo, com peso inicial médio de 28 g, criadas a baixa ( $200 \text{ peixes m}^{-3}$ ), média ( $400 \text{ peixes m}^{-3}$ ) e alta densidade ( $600 \text{ peixes m}^{-3}$ ) durante 60 dias. Os peixes alimentados com  $\beta$ -glucanos apresentaram maior ganho em peso e taxa de crescimento específico e melhor conversão alimentar que os peixes alimentados com a dieta controle, sem

o aditivo, independentemente da densidade de estocagem. Os autores relacionaram estas respostas positivas à modulação da microbiota intestinal e aumento das dobras intestinais, condição que foi encontrada nas porções proximal, medial e distal do intestino, nos peixes alimentados com  $\beta$ -glucanos. Além disso, foi relatado um aumento na contagem de glóbulos vermelhos e níveis de hemoglobina, demonstrando um aumento da capacidade da tilápia-do-nylo em transportar oxigênio no sangue. Por fim, os autores evidenciaram aumento da atividade fagocítica e de lisozima, além de aumento dos genes de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), o que explicaria a melhora evidenciada nas respostas imunes.

Em estudo com tilápia-moçambicana *Oreochromis mossambicus* alimentadas com dietas contendo 0, 20, 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de  $\beta$ -glucanos durante oito semanas e posteriormente desafiadas com amônia (100 mg L<sup>-1</sup>) durante uma semana, Divya e colaboradores (2020) relataram maior crescimento nos peixes alimentados com 100 mg kg<sup>-1</sup> de  $\beta$ -glucanos. Além disso, os peixes deste tratamento apresentaram melhores respostas imunes celulares (mieloperoxidase, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio), humorais (fosfatase alcalina, atividade de lisozima e inibição da peroxidase), além de apresentarem um aumento na resposta antioxidante (catalase, superóxido dismutase e glutatona). Os autores concluem que a aplicação de  $\beta$ -glucanos induz a tolerância ao estresse e melhora o crescimento da tilápia moçambicana.

Avaliando a administração oral de  $\beta$ -glucanos (0,08 g kg<sup>-1</sup>) para o linguado senegalês *Solea senegalensis* até 72 h após o tratamento, verificou-se que após 48 h ocorreu aumento da expressão gênica de Interleucina 1 $\beta$ , citocina pró-inflamatória que media a ativação de macrófagos (CARBALLO et al., 2019; PIETRETTI et al., 2013). Além disso, a administração oral de  $\beta$ -glucanos diminuiu a abundância de bactérias patogênicas *Vibrio*. Os autores concluem que a administração oral deste imunostimulante agiu localmente no intestino e modulou a resposta imune, indicando que os  $\beta$ -glucanos representam uma fonte promissora de prebióticos na aquicultura.

#### 1.7.1.2 Mananoligossacarídeos

O mananoligossacarídeo (MOS) é um carboidrato indigestível derivado da levedura, representando até 40% da matéria seca da parede celular (HALAS; NOCTHA, 2012; SINGH; SINGH; ARYA, 2018). O MOS pode ser composto somente por mananos ou estar ligado a molécula de glicose e/ou galactose, sendo chamados de glucomanos, galactomananos e galactoglucomanos (LIEPMAN et al., 2007). O MOS possui ação prebiótica no hospedeiro, melhorando sua saúde intestinal e a absorção de nutrientes, além de ação imunomoduladora (AKTER et al., 2016; HAHOR; THONGPRAJUKAEW; SUANYUK, 2019).

A imunomodulação pela administração do MOS ocorre através do reconhecimento pelas células dendríticas e macrófagos, que possuem o receptor de manose, gerando uma reação em cascata que ativa a resposta imune, principalmente os macrófagos, células fagocíticas e citocinas (COLLETT, 2000; CARBONE; FAGGIO, 2016). Diversos estudos relatam efeitos benéficos sobre o sistema imune inato com a utilização dietética de MOS. Ha e colaboradores (2017) observaram aumento significativo de atividade de lisozima, globulina, leucócitos linfócitos e monócitos após 60 dias de alimentação com dietas contendo MOS (ACTIGEN®) para juvenis de tilápia-do-nilo. Por outro lado, em outro estudo não foi observado melhoria no sistema imune de tilápias-do-nilo alimentadas com dietas contendo MOS (CAVALCANTE et al., 2020). Porém, ressalta-se que os peixes alimentados com dietas contendo MOS apresentaram maior sobrevivência, quando desafiados contra *Aeromonas hydrophila*. Em outras espécies, também há relatos positivos quanto à utilização de MOS em dietas sobre o sistema imune em: 1) carpas, *Cyprinus carpio* e *Carassius auratus gibelio*, onde aumentou a atividade da lisozima, do sistema de complemento e imunoglobulinas (MOMENI-MOGHADDAM et al., 2015; LIU et al., 2013); 2) truta-arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, onde a utilização de MOS resultou em maior atividade de lisozima, atividade bactericida e do sistema de complemento (STAYKOV et al., 2007); 3) robalo-europeu, *Dicentrarchus labrax*, onde houve melhoria no índice fagocítico, além de uma correlação positiva entre a atividade de lisozima e do sistema de complemento (TORRECILLAS et al., 2007)

O MOS também pode atuar de maneira seletiva na microbiota intestinal, já que pode aglutinar bactérias patogênicas, sendo estas eliminadas pelo bolo fecal (GÜLTEPE et al., 2011). Os sítios de ligações de manose presente no MOS são semelhantes aos encontrados nos enterócitos e, assim, ocorre a diminuição de bactérias patogênicas nos enterócitos e sua colonização no trato digestivo, facilitando o aumento de bactérias benéficas ao hospedeiro (OYOFO et al., 1989). Tal fato poderia explicar a maior sobrevivência de tilápias desafiadas contra *A. hydrophila* mencionada anteriormente (CAVALCANTE et al., 2020), uma vez que não houve melhora nos parâmetros imunes avaliados. Além disso, em carpa-capim verificou-se diminuição dos gêneros patogênicos *A. hydrophila* e *Escherichia coli* e aumento dos gêneros benéficos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (LU et al., 2020). Em alevinos de carpa-comum, *Cyprinus carpio*, e juvenis de panga, *Pangasianodon hypophthalmus*, a suplementação dietética com MOS aumentou a quantidade de bactérias ácido-láticas no intestino (AKTER et al., 2016; MOMENI-MOGHADDAM et al., 2015).

O aumento de bactérias benéficas ao hospedeiro e a consequente diminuição de bactérias patogênicas que competem por nutrientes, se ligam aos enterócitos ou produzem

toxinas, resulta em melhor desenvolvimento da morfologia e mucosa intestinal (AZEVEDO et al., 2016; DIMITROGLOU et al., 2009; PELICANO et al., 2005), bem como na melhora do desempenho produtivo dos peixes. Como exemplo, em larvas de tilápia-do-Nilo, verificou-se aumento no comprimento do intestino, bem como na altura e densidade das dobras intestinais (SCHWARZ et al., 2011). Ainda, a conversão alimentar apresentou um efeito quadrático, sendo o melhor resultado estimado em 0,34% de inclusão de MOS. Similarmente, em juvenis de tilápia-do-Nilo, a inclusão de MOS nas dietas proporcionou melhora na conversão alimentar, além de maior taxa de eficiência proteica, proteína da carcaça e altura das dobras intestinais (SCHWARZ et al., 2010).

### 1.7.1.3 Nucleotídeos

Os nucleotídeos são moléculas formadas por bases nitrogenadas (púricas ou pirimídicas), grupo fosfato e pentoses (NELSON; COX, 2014), que constituem o DNA, RNA e ATP (RINGØ et al., 2012). Para o DNA, a pentose pode ser a 2-desoxiribose e, para o RNA, a ribose. A adenina (A) e a guanina (G) são as principais bases púricas, enquanto a citosina (C), timina (T) e uracila (U) são as principais bases pirimídicas.

Os nucleotídeos podem ser sintetizados pelos animais pela via *de novo* a partir de seus precursores metabólicos, como a glutamina, no citosol hepático (MATEO; STEIN, 2004), porém tem um alto custo metabólico e de energia na forma de ATP (ROSSI; XAVIER; RUTZ, 2007). Outra forma de obtenção de nucleotídeos é pela via de salvamento, que utiliza nucleotídeos fornecidos via dieta, e que também ocorre no citosol hepático (KULKARNI et al., 1989; SANDERSON; HE, 1994; YAMAMOTO et al., 1997), auxiliando principalmente em tecidos que apresentam capacidade limitada de sintetizar nucleotídeos (LELEIKO et al., 1983; UAUY; QUAN; GIL, 1994; WESTWOOD, 1999). Pela via de salvamento, ocorre a reciclagem de bases livres e nucleosídeos que são liberados dos nucleotídeos e ácidos nucleicos, gerando um gasto menor de energia (PELÍCIA, 2008).

Os nucleotídeos não são considerados nutrientes essenciais, uma vez que o organismo é capaz de produzi-los endogenamente; contudo, essa afirmação vem sendo contestada em várias publicações que sugerem que a deficiência de nucleotídeos dietéticos pode prejudicar as funções do fígado, coração, intestino e sistema imune (GRIMBLE; WESTWOOD, 2000; RINGØ et al., 2012). A incorporação de nucleotídeos via dieta apresentou modulação positiva na ativação e proliferação de linfócitos, macrófagos, aumento da atividade de imunoglobulinas, na microbiota intestinal e na expressão gênica de citocinas em animais endotérmicos (GIL, 2002; SINGHAL et al., 2008), além de ser um aspecto importante da pesquisa sobre nutrição

clínica e desenvolvimento de alimentos funcionais para humanos (GRIMBLE; WESTWOOD, 2000; GUTIERREZ-CASTELLON et al., 2007).

Em peixes, os estudos envolvendo a inclusão de nucleotídeos em dietas iniciaram na década de 70 e foram aprofundadas a pouco mais de 20 anos (RINGØ et al., 2012). Inicialmente, a utilização de nucleotídeos em dietas para peixes tinha como objetivo aumentar a palatabilidade da dieta, bem como melhorar a biossíntese de aminoácidos não essenciais e, mais recentemente, vem sendo testado como suplemento dietético para aumentar a imunidade e a resistência a doenças (RINGØ et al., 2012). Além disso, a utilização de nucleotídeos em dietas melhorou a qualidade das larvas oriundas de reprodutores alimentados com este nutriente, além de alterar a estrutura intestinal, aumentar a tolerância ao estresse e modular respostas imunes inatas e adaptativas (RINGØ et al., 2012).

Para a tilápia-do-nilo, a suplementação de nucleotídeos via dieta foi eficiente em melhorar o ganho em peso, taxa de crescimento específico e eficiência alimentar, além de aumentar a expressão de genes relacionados ao crescimento, MyoD, IGF-1, GH, GHR-1, (ASADUZZAMAN et al., 2017). Igualmente, o ganho em peso e consumo alimentar aumentaram linearmente em juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de nucleotídeos (BERTO et al., 2015). Além disso, ocorreu aumento na contagem de trombócitos, leucócitos e monócitos no sangue, indicando melhor resposta de defesa nos peixes alimentados com dietas contendo nucleotídeos (BERTO et al., 2015). Em outro estudo com tilápia-do-nilo, a inclusão de nucleotídeos em dietas resultou em melhor desempenho, eficiência alimentar e taxa de eficiência proteica e conteúdo proteico e lipídico corporal, bem como maior atividade das enzimas lipase, amilase e hormônio de crescimento (SELIM et al., 2020). Para a tilápia híbrida (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*), a administração de nucleotídeos via dieta resultou em maior ganho em peso e eficiência alimentar, além de melhorar a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase e da atividade de lisozima (XU et al., 2015). Para a tilápia-do-nilo, também foi observada melhora nos parâmetros imunes, tais como aumento nos granulócitos, linfócitos, imunoglobulinas, além de maior atividade da lisozima e maior sobrevivência dos peixes após desafio bacteriano contra *Aeromonas sobria* (REDA et al., 2018)

Para o “red drum”, *Sciaenops ocellatus*, além de melhorar o desempenho produtivo, a inclusão de nucleotídeos nas dietas proporcionou aumento significativo na altura das dobras intestinais, altura do enterócito nos cecos pilóricos e nas regiões proximal e distal do intestino, além de maior altura das microvilosidades em todas as seções entéricas (CHENG; BUENTELLO; GATLIN, 2011). Condição também evidenciada em salmão-do-atlântico,

*Salmo salar*, em que maior altura das dobras intestinais nas regiões proximal, medial e distal foi verificada nos peixes alimentados com dietas contendo nucleotídeos (BURRELLS et al., 2001).

## 1.8 ZINCO

O zinco (Zn) é um elemento químico essencial devido sua importância como componente estrutural, além de atuar como cofator específico para várias enzimas, em várias vias metabólicas, proliferação celular e sistemas de reparo e sinalização em processos fisiológicos (WATANABE; KIRON; SATOH, 1997; TAN; MAI, 2001; KIMURA; KAMBE, 2016), sendo o segundo elemento de maior importância nutricional para os peixes dentre os microminerais essenciais (BURY, WALKER; GLOVER, 2003).

No processo de proliferação celular, o zinco destaca-se por atuar diretamente sobre as células imunológicas, com capacidade de interferir na ação citolítica das células T, no processo de fagocitose de macrófagos e neutrófilos, na atividade de células *natural killer* e na maturação de linfócitos (CRUZ; SOARES, 2011). Além disso, o zinco está diretamente envolvido no correto funcionamento do sistema antioxidante, sendo elemento essencial da enzima superóxido dismutase (SOD), bem como na regulação da concentração de metalotioneínas, ligadas à eliminação de radicais livres (TAPIERO; TEW, 2003).

Devido à baixa disponibilidade de zinco na água e a capacidade reduzida de absorção por meio das brânquias (LALL; BISHOP, 1977), a suplementação via dieta é necessária para atender às exigências nutricionais em peixes (SÁ et al., 2005). Para juvenis de tilápia-do-nilo alimentadas com dietas purificadas, a exigência dietética é de 30 mg/kg baseada no ganho em peso, conteúdo de zinco corporal e ósseo (EID; GHONIM, 1994). Para a fase de engorda, a exigência dietética de zinco foi determinada em 37,2 mg kg<sup>-1</sup> e 52,1 mg kg<sup>-1</sup>, baseada no ganho em peso e no conteúdo de zinco ósseo, respectivamente (HUANG et al., 2015). No entanto, em dietas práticas, o fitato, fator antinutricional presente em ingredientes vegetais, interage com os nutrientes da dieta e pode reduzir a biodisponibilidade do zinco (MCCLAIN; GATLIN, 1988; GATLIN; PHILLIPS, 1989). Com isso, as dietas práticas são suplementadas com níveis superiores à exigência dietética estabelecida para superar os efeitos de fatores nutricionais, como o fitato (NRC, 2011). Como exemplo, Sá et al. (2005) determinaram a exigência de zinco em 79,5 mg kg<sup>-1</sup>, utilizando o sulfato de zinco como fonte deste mineral para juvenis de tilápia-do-nilo.

Outro fator que influencia a exigência nutricional dos minerais é sua fonte de inclusão, que pode ser inorgânica ou orgânica. As fontes inorgânicas são comumente utilizadas pela indústria e geralmente os valores de inclusão são maiores que a exigência nutricional da espécie, já que estas fontes são menos estáveis estruturalmente e menos biodisponíveis, além de interagirem com fatores antinutricionais, como mencionado anteriormente (NRC, 2011). Por outro lado, as fontes orgânicas são mais estáveis estruturalmente e têm maior biodisponibilidade, resultando em melhor absorção e metabolização (MILES; HENRY, 2000). Como exemplo, juvenis de tilápias-do-nylo alimentadas com dietas contendo zinco orgânico (Zn-Metionina) apresentaram maior ganho em peso e deposição de zinco no músculo e no soro quando comparado aos peixes alimentados com dietas contendo fonte inorgânica de zinco (óxido de zinco), independente das doses testadas, que foram de 20 e 40 mg kg<sup>-1</sup> (KISHAWY et al., 2020). Ainda nesse mesmo estudo, na comparação entre as dosagens testadas na forma orgânica de zinco, os autores verificaram maior crescimento nos peixes alimentados com a dose de 40 mg kg<sup>-1</sup> em comparação aos alimentados com a dosagem de 20 mg kg<sup>-1</sup>. Além disso, os peixes alimentados com as dietas contendo a fonte orgânica de zinco, independente da dose, apresentaram maior sobrevivência após desafio contra *Aeromonas hydrophila*. Esta maior sobrevivência frente ao desafio bacteriano pode estar ligada ao aumento da resposta imune nos peixes alimentados com dietas contendo zinco orgânico, visto que apresentaram maior atividade de lisozima, imunoglobulina e atividade bactericida (KISHAWY et al., 2020). Além disso, os peixes alimentados com dietas contendo zinco na forma orgânica apresentaram maior capacidade de atividade antioxidante, verificado pelo aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase (KISHAWY et al., 2020). Por fim, os autores enfatizam que a forma química do mineral tem um impacto enorme em sua absorção e utilização.

A avaliação de fontes orgânicas de minerais em outras espécies de peixes também resultou em maior disponibilidade, quando comparadas às fontes inorgânicas. Para o bagre-do-canal, *Ictalurus punctatus*, a exigência dietética utilizando o sulfato de zinco foi de 19 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto, utilizando o zinco orgânico (Zn-Metionina), diminuiu para 5,5 mg kg<sup>-1</sup> (PARIPATANANONT; LOVELL, 1995). Para o camarão-branco-do-pacífico, *Litopenaeus vannamei*, as fontes orgânicas de zinco (Zinco-Lisina, Zinco-Glicina e Zinco-Metionina) resultaram em maior crescimento quando comparada à fonte inorgânica sulfato de zinco (LIN et al., 2013). Neste mesmo estudo, entre as fontes orgânicas, a suplementação dietética com Zinco-Metionina apresentou os melhores resultados de ganho em peso, além de maior sobrevivência após desafio contra *Vibrio harveyi* (LIN et al., 2013).

## 1.9 VILIGEN™

O VILIGEN™ (Alltech, Nicholasville, EUA) é um novo aditivo alimentar comercial, o qual foi desenvolvido usando técnicas nutrigenômicas para melhorar o crescimento animal e a saúde intestinal. Por se tratar de um novo aditivo, há poucas informações científicas avaliando sua inclusão dietética. Para leitões desmamados, a suplementação dietética com 1,35 g kg<sup>-1</sup> de VILIGEN™ promoveu maior ganho em peso e consumo alimentar, além de diminuir a necessidade do uso de medicamentos durante essa fase de vida dos leitões (FRUGE et al., 2018). Em outro estudo, avaliando a inclusão de 0,001 g kg<sup>-1</sup> de VILIGEN™ para frangos de corte de 1 a 21 dias, não foram observadas diferenças no peso final, ganho em peso, consumo de ração e conversão alimentar quando comparados aos frangos de corte alimentados com a dieta controle (SANTOS, 2020). Não existem ainda trabalhos publicados sobre a avaliação deste aditivo em dietas para peixes.

## 1.10 COMUNIDADE BACTERIANA DO TRATO GASTROINTESTINAL

Antigamente havia grande controvérsia quanto a existência de uma microbiota intestinal indígena e seu papel no trato gastrointestinal em peixes; contudo, atualmente é amplamente aceito que peixes e outros animais aquáticos possuem microbiota no trato gastrointestinal (RINGØ et al., 2015). Nos últimos anos, a fim de investigar a importância dessas comunidades microbianas, houve um aumento das pesquisas envolvendo a diversidade e relacionamento funcional da microbiota intestinal em peixes (CLEMENTS et al., 2014).

A microbiota intestinal dos peixes pode ser classificada como bactérias autóctones (indígenas) ou alóctones (KIM et al., 2007; RINGØ et al., 2003). Bactérias autóctones são as que colonizam a superfície epitelial intestinal do hospedeiro ou estão associadas às microvilosidades. Por outro lado, as bactérias alóctones são transitórias, associadas a partículas de alimentos ou presentes no lúmen. É importante a avaliação da microbiota intestinal dos peixes, uma vez que o trato gastrointestinal é a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos presentes na água, ração ou trato gastrointestinal (FENG et al., 2015; TRAN-NGOC et al., 2016), além de sua função principal na digestão e absorção de nutrientes (RINGØ et al., 2015; CELI et al., 2017).

Vários fatores afetam a microbiota intestinal em peixes, tais como: manipulações dietéticas, variações sazonais, estresse, variações individuais, diferença entre regiões do trato gastrointestinal, animal de criação *versus* animal selvagem, triploide *versus* diplóide, macho

*versus* fêmea, variação do dia a dia, ciclo de vida, formação de hierarquia, jejum, migrações, qualidade de água (RINGØ et al., 2016). Tendo em vista a influência de diversos fatores na variação da microbiota intestinal e com o objetivo de diminuir essas variações, um *pool* de amostra do mesmo tratamento foi coletado para a realização das análises (HOVDA et al., 2007; ROESELERS et al., 2011; SULLAM et al., 2012; ZARKASKI et al., 2014).

Os primeiros estudos sobre microbiota intestinal em peixes foram conduzidos entre as décadas de 70 a 90, sendo a maioria desses baseada em técnicas dependentes de cultura para a caracterização a comunidade microbiana intestinal (RINGØ et al., 2016). Recentemente, com o avanço tecnológico de sequenciamento de DNA, de análises bioinformáticas e do uso de métodos moleculares foi possível a realização de estudos mais aprofundados sobre as comunidades microbianas intestinais (MAHDI et al., 2015). Com isso, observou-se que a diversidade dessa comunidade microbiana é mais complexa do que se acreditava anteriormente (RINGØ et al., 2016). A composição da comunidade microbiana intestinal apresenta bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias obrigatórias, que favorecem o desenvolvimento, metabolismo, imunidade, resistência a doenças, além de serem fonte potencial de diversas enzimas exógenas para o hospedeiro (BAIRAGI et al., 2002; NAYAK, 2010; RAWLS et al., 2006; SAHA et al., 2006). Porém, a comunidade bacteriana também inclui bactérias oportunistas, que podem causar doenças aos peixes (ROESELERS et al., 2011).

Uma maneira de melhor entender a comunidade bacteriana do intestino é utilizando-se análises metagênicas, que possibilitam a análise de genomas complexos presentes em um nicho microbiano (NIELSEN et al., 2014). Dentro dessas análises, o sequenciamento de alto rendimento permite a identificação de alta precisão da comunidade bacteriana presente na amostra (GAJARDO et al., 2016; KUMAR; KOCOUR, 2017). Com isso, é possível calcular a dinâmica, diversidade, abundância e riqueza da microbiota intestinal, além de ser possível classificar as bactérias desde filo até espécie (KUMAR; KOCOUR, 2017). Assim, esta é uma importante ferramenta, já que possibilita a avaliação mais precisa de nutrientes que favorecem o crescimento de bactérias benéficas ao hospedeiro e, conseqüentemente, diminuem a incidência de bactérias patogênicas.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Avaliar a inclusão de diferentes níveis do aditivo alimentar VILIGEN™ em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência do aditivo alimentar sobre os parâmetros zootécnicos.
- Avaliar a morfologia intestinal de juvenis quando diferentes níveis de inclusão do aditivo são utilizados.
- Avaliar a resposta imunológica e sobrevivência, antes e após infecção bacteriana com *Streptococcus agalactiae*.
- Investigar a influência do aditivo sobre a comunidade microbiana do intestino e enzimas digestivas de juvenis de tilápia-do-nilo.
- Estimar a melhor concentração do aditivo na dieta com base nas respostas avaliadas.

## CAPÍTULO II: A SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE VILIGEN™ PARA TILÁPIA-DO-NILO MELHORA O CRESCIMENTO E A MORFOLOGIA INTESTINAL

Artigo publicado na revista *Aquaculture Nutrition*

DOI: <https://doi.org/10.1111/anu.13247>

Jhonis Ernzen Pessini<sup>1</sup>, Vitória Daitx de Oliveira<sup>1</sup>, Lúvia Souza de Sá<sup>1</sup>, José Luiz Pedreira Mouriño<sup>1</sup>, James Eugene Pettigrew<sup>2</sup>, Débora Machado Fracalossi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Rodovia Admar Gonzaga, 1346, CEP 88034-000, Florianópolis, SC, Brazil.

<sup>2</sup> Pettigrew Research Services, Tubac, AZ, USA.

\*Autor correspondente: [debora.fracalossi@ufsc.br](mailto:debora.fracalossi@ufsc.br)

### RESUMO

O presente estudo avaliou o crescimento, histomorfometria intestinal, respostas imunes e resistência de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) contra a infecção por *Streptococcus agalactiae*, quando alimentadas com VILIGEN™, um aditivo alimentar contendo butirato de sódio, levedura hidrolisada desidratada e proteinato de zinco. Doses crescentes (0,00; 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg<sup>-1</sup>) foram adicionadas a uma dieta basal e distribuídas aleatoriamente para seis grupos, cada um com 28 peixes. Os peixes foram alimentados até a saciedade duas vezes ao dia por 60 dias. Após o ensaio de alimentação, foram infectados via gavagem com *S. agalactiae* a uma concentração de  $1,0 \times 10^9$  unidades formadoras de colônia (UFC) mL<sup>-1</sup>, sendo a mortalidade registrada durante 14 dias. A suplementação dietética com VILIGEN™ propiciou maior ganho de peso, maior perímetro de dobras intestinais e maior número de células caliciformes. Por meio de regressão polinomial, o nível de suplementação ideal para essas variáveis foi estimado em 2,80, 3,30 e 3,50 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente. No entanto, com exceção da imunoglobulina total após o desafio, não houve efeito do aditivo nas respostas imunes testadas, nem na sobrevivência após a infecção bacteriana. Este é o primeiro estudo sobre a suplementação de VILIGEN™ em dietas para peixes. Maior crescimento e alteração positiva na morfologia intestinal foram evidenciados com a inclusão de VILIGEN™ na faixa de 2,80 a 3,50 g kg<sup>-1</sup>, porém não houve resposta benéfica clara após o desafio bacteriano.

**PALAVRAS-CHAVE:** Desafio bacteriano, aditivo alimentar, nutrição de peixes, crescimento, resposta imune, histologia intestinal.

## 1 INTRODUÇÃO

As tilápias são o segundo grupo de peixes mais produzido no mundo, depois das carpas (FAO, 2018) e sua produção deve aumentar ainda mais para atender à demanda global de alimentos (TIENGTAM et al., 2017). A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, espécie-alvo deste estudo, apresenta características altamente favoráveis à aquicultura, como rápido crescimento em altas densidades, robustez, fácil reprodução e boa aceitação pelo mercado consumidor (WATANABE et al., 2002). Porém, a intensificação da aquicultura pode aumentar a presença de agentes estressores, devido ao aumento da densidade de estocagem, alteração na qualidade da água, excesso de matéria orgânica, além de manejo excessivo dos peixes (BARTON, 2000). Estes fatores podem causar imunossupressão, diminuição do crescimento e aumento da suscetibilidade a doenças causadas por patógenos nos peixes (TORT, 2011). Nesse contexto, as doenças causadas por bactérias são uma grande preocupação na aquicultura, pois apresentam altas taxas de proliferação, causando grandes perdas nos sistemas de produção (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

Na criação de tilápias, doenças causadas por bactérias do gênero *Streptococcus* são responsáveis por grandes perdas econômicas e apresentam os seguintes sinais clínicos: perda de apetite, deslocamento da coluna, exoftalmia, opacidade da córnea, hemorragia das brânquias, opérculo e nadadeiras (YANONG; FLOYD, 2002; ZAMRI-SAAD; AMAL; SITI-ZAHRAH, 2010; JIMÉNEZ et al., 2007; ZHENG et al., 2018). A utilização de antibióticos contra infecções bacterianas na produção aquícola é proibida em vários países (DENEV et al., 2009), pois além de deixar resíduos na carne dos peixes, também promove a ocorrência de cepas resistentes ao medicamento, além de reduzir a microbiota benéfica no trato gastrointestinal dos peixes (MUNIR et al., 2016). Assim, o uso de produtos alternativos que não produzam esses efeitos colaterais negativos pode promover a sustentabilidade da indústria aquícola (DOAN et al., 2018).

Uma nova tendência na produção aquícola é o uso de aditivos alimentares, tais como prebióticos, imunostimulantes e sais orgânicos, que promovem o crescimento e a saúde dos peixes (LUCKSTADT, 2008; TIENGTAM et al., 2017), tornando-se uma alternativa ambientalmente viável aos antibióticos. Tais aditivos, além de promoverem o crescimento, também podem estimular o crescimento de bactérias benéficas no intestino do hospedeiro, promovendo imunomodulação positiva que irá minimizar a ação e proliferação de patógenos (RINGØ et al., 2010; TORRECILLAS et al., 2015; ZHAO et al., 2015; ADORIAN et al., 2016; HA et al., 2017).

O VILIGENT™ (Alltech, Nicholasville, EUA) é um novo aditivo alimentar comercial, composto por proteinato de zinco, levedura hidrolisada desidratada e butirato de sódio, o qual foi desenvolvido usando técnicas nutrigenômicas para melhorar o crescimento animal e a saúde intestinal. Dentre os componentes do aditivo, o butirato de sódio é um ácido orgânico que, além de possuir propriedades bactericidas (SILVA et al., 2013; NG; KOH, 2017), favorece o crescimento de bactérias lácticas (BARUAH et al., 2007; LUCKSTADT, 2008; ROBLES et al., 2013), fornece energia às células epiteliais e, conseqüentemente, promove sua proliferação. A levedura hidrolisada modula positivamente o sistema imunológico por meio de receptores que identificam proteínas e padrões moleculares associados a patógenos, o que desencadeia respostas imunes inatas melhoradas (TRICHET, 2010; HA et al., 2017). Já o proteinato de zinco é um mineral orgânico, sendo mais biodisponível que as formas inorgânicas, com efeitos benéficos no crescimento e importância na proliferação celular no sistema imunológico (IBS; RINK, 2003; APINES-AMAR et al., 2004; RINK; HAASE, 2007; LIN et al., 2013). Portanto, o uso dos três compostos sinergicamente em um só aditivo provavelmente resultará em maior crescimento e maior rapidez nas respostas imunológicas se comparado ao uso de um único composto isoladamente.

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a influência de diferentes níveis de inclusão do aditivo alimentar VILIGENT™ em dietas para juvenis de tilápia-do-nylo sobre o crescimento, composição corporal, retenção proteica, histologia intestinal, respostas imunes e sobrevivência após desafio bacteriano com *Streptococcus agalactiae*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 DESENHO EXPERIMENTAL, DIETAS E ALIMENTAÇÃO

Uma dieta basal foi formulada com ingredientes práticos para atender às exigências nutricionais da tilápia-do-nylo (FURUYA, 2010; NRC, 2011). O aditivo foi incluído a esta dieta basal em cinco níveis: 0,00; 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg<sup>-1</sup>, em substituição ao milho (Tabela 1).

Os ingredientes foram triturados individualmente em moinho de martelo (malha da peneira de 1,0 mm), peneirados manualmente (0,5 mm), pesados e homogeneizados em misturador horizontal. Uma alíquota destes ingredientes foi amostrada para determinação da composição proximal e teor energético. Antes da extrusão, a qual foi realizada em extrusora mono rosca modelo MX-40 (Inbramaq, Ribeirão Preto, Brasil), a umidade dos ingredientes foi ajustada para 21%, usando água. Os parâmetros de extrusão foram os seguintes: temperatura,

100°C; velocidade de rosca, 220 rpm; taxa de fluxo, 20% da capacidade nominal; relação largura/diâmetro, 2,3: 1; diâmetro da rosca, 92,5 mm e comprimento do cilindro, 210 mm. Após a extrusão, as dietas foram secas em estufa com circulação de ar forçada a 55°C e, posteriormente, embaladas e armazenadas em ambiente seco a temperatura constante de 23°C.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições para cada nível testado. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (09:00 e 0430 h) até a saciedade aparente por 60 dias. O consumo de ração e a mortalidade foram registrados diariamente.

**Tabela 1.** Formulação e composição das dietas experimentais e composição do aditivo alimentar.

Ingredientes	Inclusão de VILIGEN™, g kg <sup>-1</sup>				
	0,00	0,60	1,20	2,40	4,80
Milho moído <sup>1</sup>	432,90	432,30	431,70	430,50	428,10
Farelo de soja <sup>2</sup>	366,00	366,00	366,00	366,00	366,00
Farinha de vísceras de frango <sup>3</sup>	195,00	195,00	195,00	195,00	195,00
Premix vitamínico-mineral <sup>4</sup>	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Cloreto de colina <sup>2,5</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Hidroxitolueno butilado -BHT	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
VILIGEN™ <sup>6</sup>	0,00	0,60	1,20	2,40	4,80
<b>Composição das dietas, g kg<sup>-1</sup> da matéria seca</b>					
Matéria seca	907,00	914,60	845,60	904,30	897,90
Proteína bruta	365,20	365,90	365,60	368,90	367,80
Proteína digestível <sup>7</sup>	340,00	340,00	340,00	340,00	340,00
Energia bruta, kcal kg <sup>-1</sup>	4.600	4.658	4.621	4.574	4.630
Energia digestível <sup>7</sup> , kcal kg <sup>-1</sup>	3.273	3.273	3.273	3.273	3.273
Extrato etéreo	75,10	71,10	74,70	71,90	75,60
Matéria mineral	57,40	58,30	56,80	56,30	56,20
<b>Composição do VILIGEN™, g kg<sup>-1</sup> da matéria seca</b>					
Proteína bruta	324,10				
Energia bruta, kcal kg <sup>-1</sup>	4,633				
Extrato etéreo	42,50				
Matéria mineral	191,30				
Butirato de sódio	3,50				
Zinco	11,97				

<sup>1</sup>Fornecido por Agrotterra Agropecuária (Florianópolis, Brasil).

<sup>2</sup>Fornecido por Nicoluzzi Rações Ltda (Penha, Brasil).

<sup>3</sup>Fornecido por Kabsa S.A (Porto Alegre, Brasil).

<sup>4</sup>Fornecido por Cargill (Toledo, Brasil), composição por kg de produto: 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 ferroso 8.000 mg, iodato de cálcio 92 mg, sulfato de manganês 3.500 mg, niacina 8.333 mg, selenito 100 mg, vitamina (vit.) A 1.666.670 IU, vit. B<sub>1</sub> 2.083 mg, vit. B<sub>12</sub> 5.000 µg, vit. B<sub>2</sub> 4.166 mg vit. B<sub>6</sub> 3.166 mg, ácido ascórbico equivalente 66.670 mg, vit. D<sub>3</sub> 666.670 IU, vit. E 1.666 IU, vit. K<sub>3</sub> 833 mg, sulfato de zinco 23.330 mg, inositol 50.000 mg, e propionato de cálcio 250.000 mg.

<sup>5</sup> 600 g colina kg<sup>-1</sup>.

<sup>6</sup>Produzido por Alltech Inc. (Nicholasville, USA) e importado por Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda (Maringá Brasil).

<sup>7</sup>Valores digestíveis estimados com base nos propostos por FURUYA (2010).

## 2.2 PEIXES E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Juvenis de tilápia-do-nilo da linhagem GIFT, invertidos sexualmente para macho, foram obtidos da Piscicultura Pomerode (Pomerode, Santa Catarina, Brasil). Os procedimentos adotados no experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC), sob o protocolo número 2200250219.

Antes do ensaio alimentar, os peixes foram aclimatados às condições laboratoriais por uma semana em três tanques de 1.000 L, conectados a um sistema de recirculação equipado com filtração biológica e mecânica, suprimento de ar e trocador de calor. A temperatura foi ajustada para 28 ° C e o fotoperíodo, para 12 h.

Após a aclimação, grupos de 28 peixes foram alocados aleatoriamente em unidades experimentais ( $n = 30$ ) de 200 L, onde permaneceram por mais uma semana, sendo alimentados com a dieta basal sem a inclusão do aditivo alimentar. Posteriormente, os parâmetros biométricos iniciais foram determinados [peso, 1,98 g  $\pm$  0,04; comprimento total, 4,83 cm  $\pm$  0,04 (média  $\pm$  desvio padrão)].

O fluxo de água de entrada foi de 40 mL s<sup>-1</sup>, proporcionando uma taxa de troca de água diária de 36 vezes o volume total de cada unidade experimental. A temperatura (28,33  $\pm$  0,28 ° C), oxigênio dissolvido (6,35  $\pm$  0,49 mg L<sup>-1</sup>) e pH (6,74  $\pm$  0,19) foram medidos diariamente, enquanto a amônia total (0,15  $\pm$  0,11 mg L<sup>-1</sup>), nitrito (0,03  $\pm$  0,05 mg L<sup>-1</sup>) e alcalinidade (44,28  $\pm$  10,61 mg CaCO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>) foram medidos semanalmente. Os valores dos indicadores de qualidade da água estavam dentro da faixa de conforto conhecidos para a tilápia-do-nilo (POPMA; LOVSHIN, 1995).

## 2.3 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO, EFICIÊNCIA ALIMENTAR E COLETA DE AMOSTRAS

No início e no final do período experimental, os peixes foram anestesiados com Eugenol<sup>®</sup> (Biodynamics Chemical and Pharmaceutical Ltda., Ibitopã, Brasil) na dosagem de 100 mg L<sup>-1</sup>. Sendo pesados e medidos individualmente em balança de precisão (0,001 g) e ictiômetro, respectivamente. A composição corporal inicial foi obtida da média de três amostra de 50 peixes, os quais foram sacrificados com Eugenol<sup>®</sup> (200 mg L<sup>-1</sup>).

As seguintes variáveis foram calculadas a partir dos dados biométricos e do consumo de ração: ganho em peso (GP, g = peso final - peso inicial), ganho em peso diário (GPD, g dia<sup>-1</sup> = ganho em peso/dias), eficiência alimentar (EA, ganho de peso/consumo de ração), taxa de

crescimento específico [TCR, % dia<sup>-1</sup> = (ln peso final - ln peso inicial/dias) × 100], sobrevivência [SOB, % = (número final de peixes/número inicial de peixes)×100] e taxa de retenção proteica aparente {TRPA, % = [(peso final× concentração final de proteína corporal) – (peso inicial × concentração inicial de proteína corporal)/ingestão de proteína]×100}.

Ao final do ensaio de alimentação, três peixes por unidade experimental foram anestesiados com Eugenol<sup>®</sup> (100 mg L<sup>-1</sup>) e amostras de sangue foram coletadas para posterior análise das respostas imunológicas. Da mesma forma, três peixes por unidade experimental foram coletados para análises de composição corporal e histologia intestinal, após serem sacrificados com overdose de Eugenol<sup>®</sup> (200 mg L<sup>-1</sup>). Amostras de peixes para análise da composição corporal foram armazenadas a -20°C até o processamento. Para histologia intestinal, as amostras foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% por 24 h e as amostras foram armazenadas em álcool 70% até o processamento.

## 2.4 RESPOSTAS IMUNES

Amostras de sangue foram retiradas de três peixes de cada unidade experimental antes e depois do desafio bacteriano para determinar algumas respostas imunes humorais inatas (atividade da lisozima, título de aglutinação e atividade antimicrobiana), bem como uma resposta imune humoral específica (imunoglobulina total). Os peixes foram anestesiados com Eugenol<sup>®</sup> (100 mg L<sup>-1</sup>) e o sangue coletado por punção da veia caudal com seringas de insulina cobertas com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Hemstab<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Brasil). Posteriormente, um *pool* de sangue de três peixes por unidade experimental foi centrifugado a 1.400 × g por 15 min e, após centrifugação, o plasma sanguíneo foi coletado e armazenado a -20°C até a análise.

A proteína plasmática total foi determinada com o auxílio de um kit comercial (Proteína total; Lab Test<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Brasil), utilizando-se albumina bovina para determinação da curva padrão. A concentração total de imunoglobulina foi medida pelo método descrito por Amar et al. (2000), no qual 100 µL de plasma foram misturados com 100 µL de solução de polietilenoglicol (PEG) 12% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), sendo a mistura incubada a 18°C durante 2 h para precipitar as moléculas de imunoglobulina. O precipitado foi removido por centrifugação (5.000 × g a 4°C por 10 min) e o sobrenadante foi usado para determinar a concentração de proteína total. A concentração de imunoglobulina foi obtida a partir da seguinte equação:

$$Ig\ Total = PTP - PTPEG$$

Onde:

Ig: imunoglobulina ( $\text{mg mL}^{-1}$ )

PTP: proteína total do plasma

PTPEG: proteína total no polietileno glicol

A concentração de lisozima plasmática foi determinada usando a metodologia proposta por Sankaran e Gurnani (1972) com algumas modificações: 90  $\mu\text{L}$  de plasma foi transferido para um tubo e 600  $\mu\text{L}$  de 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$  de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi adicionado. Na sequência, as leituras de absorbância inicial e final foram feitas a 492 nm. A taxa de redução da absorbância foi convertida para concentração de lisozima ( $\mu\text{g mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) por miligrama de proteína, usando uma curva padrão feita com lisozima de clara de ovo de galinha (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

O título de aglutinação foi determinado em microplacas, conforme metodologia proposta por Silva et al. (2009). O plasma foi diluído a 1:3 em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) no primeiro poço (150  $\mu\text{L}$  de solução de PBS: 50  $\mu\text{L}$  de plasma) e distribuído em série na proporção de 1:2 em outros poços até o 12º poço. Posteriormente, 50  $\mu\text{L}$  de *S. agalactiae* inativada foram adicionados a todos os poços. A microplaca foi incubada por 24 h a 35°C em câmara umidificada. A aglutinação foi confirmada pela formação de precipitado no fundo do poço e considerada recíproca à última diluição que apresentou aglutinação.

A atividade antimicrobiana do plasma contra a bactéria *S. agalactiae* foi avaliada em uma microplaca de fundo plano de 96 poços, de acordo com Silva et al. (2009). O inóculo de *S. agalactiae* foi cultivado em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 35°C por 24 h, preparado em um padrão de 0,5 na escala de McFarland e diluído 100.000 vezes em meio de caldo pobre (PB). Posteriormente, a diluição do plasma (1:2) no meio PB foi realizada até o 12º poço. Para os controles positivo e branco, a solução salina foi diluída em PB, como foi feito para o plasma. Finalmente, 20  $\mu\text{L}$  de bactéria foram adicionados a cada poço da amostra de plasma diluída e do controle positivo. A microplaca contendo *S. agalactiae* foi incubada a 35°C por 24 h. O crescimento dos microrganismos foi determinado em leitor de microplacas a 550 nm. O título antimicrobiano foi recíproco à última diluição com atividade antibacteriana.

## 2.5 COMPOSIÇÃO CORPORAL E DAS DIETAS

A composição das dietas experimentais e do corpo inteiro dos peixes foi analisada de acordo com as normas da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1999). A umidade foi determinada por secagem a 105°C (método 950.01); o extrato etéreo foi determinado por Soxhlet (método 920.39C); a proteína bruta foi determinada pelo método de Kjeldahl (945.01) e a matéria mineral foi determinada por incineração em mufla a 550°C (método 942.05).

A energia bruta foi determinada em uma bomba calorimétrica (Modelo 6200; PARR), de acordo com as instruções do fabricante. A digestão com ácido nitro-perclórico foi realizada para determinar a composição de zinco nas dietas experimentais. Posteriormente, sua quantificação foi realizada por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). O método de cromatografia líquida (HPLC), utilizando coluna C18 e padrão de butirato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), foi realizado para determinar a concentração de butirato de sódio das dietas experimentais.

## 2.6 HISTOLOGIA INTESTINAL

Porções transversais de aproximadamente 5 cm de comprimento das partes proximal, medial e distal do intestino foram amostradas para determinar a histomorfometria das dobras intestinais. Inicialmente, os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool, clarificados em xilol e incluídos em parafina. Cortes de 3 a 5 µm de espessura (micrótomo PAT-MR10) foram corados com hematoxilina e eosina. Após a coloração, as lâminas foram montadas e analisadas em um microscópio de contraste de fase de interferência Axio Imager 2 (Zeiss, Göttingen, Alemanha). Foram analisados: 1) número de dobras; 2) altura das dobras, correspondente à distância do ápice da dobra até o final da serosa; 3) largura das dobras, medida perpendicularmente à altura; 4) perímetro das dobras, correspondente à soma do contorno das dobras; e 5) número de células caliciformes. Todas as análises foram realizadas com o software Zen Pro (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

## 2.7 DESAFIO COM *S. AGALACTIAE*

Após o ensaio de dose-resposta, os peixes foram desafiados com a bactéria *S. agalactiae*. A bactéria patogênica *S. agalactiae* (S13) foi isolada de tilápias moribundas durante

um surto de mortalidade no Estado do Paraná, Brasil. Essa cepa foi obtida do Laboratório de Bacteriologia de Peixes (LABBEP, Londrina, Brasil) e identificada por identificação molecular (FACIMOTO et al., 2017). Para infecção, as bactérias foram cultivadas em caldo BHI (HiMedia, Mumbai, Índia) a 28°C por 24 h. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 1.500 × g por 10 min e o sobrenadante foi descartado. As bactérias precipitadas foram ressuspensas em solução de PBS (0,04 M de fosfato de sódio monobásico e 0,16 M de fosfato de sódio dibásico; pH 7,2) a uma concentração de  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colônia (UFC) mL<sup>-1</sup>.

Grupos de 10 peixes foram distribuídos aleatoriamente em 24 unidades experimentais. Peixes dos mesmos tratamentos usados no ensaio de dose-resposta foram utilizados no desafio bacteriano. Um *pool* de oito peixes de todos os tratamentos dietéticos, totalizando 40 peixes, foi usado para criar um controle negativo no desafio bacteriano. Esses peixes foram inoculados apenas com solução de PBS, sem bactérias. O novo arranjo para o desafio bacteriano resultou em um total de seis tratamentos com quatro repetições. Antes da infecção bacteriana, os peixes foram anestesiados com Eugenol<sup>®</sup> (100 mg L<sup>-1</sup>) e cada peixe recebeu uma solução de 100 µL contendo *S. agalactiae*, na concentração de  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, que foi inoculada no esôfago dos peixes por gavagem, com auxílio de uma pipeta.

Após a infecção bacteriana, os peixes foram observados por 14 dias. A mortalidade e os sinais clínicos de infecção foram registrados e os peixes mortos foram imediatamente removidos. Após 14 dias de infecção, foi realizada coleta de sangue para análise das respostas imunes mencionadas anteriormente. Os peixes sobreviventes foram anestesiados com Eugenol<sup>®</sup> (100 mg L<sup>-1</sup>) e posteriormente sacrificados pela secção da medula espinhal. A infecção bacteriana foi confirmada pelo re-isolamento de bactérias do fígado, cérebro e fragmentos de rins de peixes mortos, bem como peixes infectados sobreviventes. As amostras foram adicionadas a tubos contendo um meio BHI líquido (HiMedia, Mumbai, Índia) para crescimento. Posteriormente, o conteúdo foi semeado em meio de ágar triptico de soja (HiMedia, Mumbai, Índia) enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e, em seguida, incubado a 28°C por 24 h para a visualização e caracterização de colônias de *S. agalactiae*.

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de regressão para determinar o melhor nível suplementação dietética de VILIGEN<sup>™</sup>, em função das variáveis avaliadas. Os dados do desafio bacteriano foram analisados pelo teste de Kaplan-Meier. Em todos os testes foi adotado

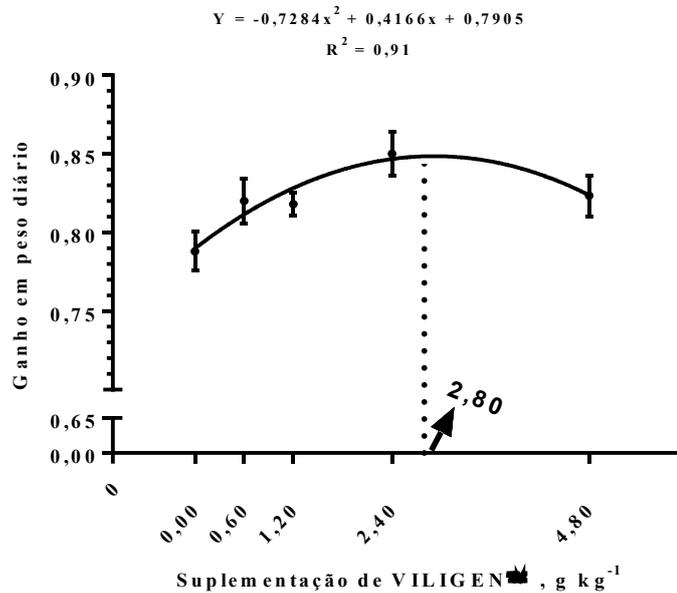
nível de significância de 5,0%. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados usando o software GraphPad Prism 6.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CRESCIMENTO E EFICIÊNCIA ALIMENTAR

A suplementação dietética com VILIGEN™ resultou em um efeito quadrático para o peso final, ganho em peso, ganho em peso diário e taxa de crescimento específico. Através da regressão polinomial, estimou-se o nível ótimo de inclusão alimentar em 2,80 g kg<sup>-1</sup> VILIGEN™ para a maior resposta, em termos de ganho em peso diário (Figura 1), peso final, ganho em peso e taxa de crescimento específico (Tabela 2). Os níveis de inclusão do aditivo não afetaram a eficiência alimentar ou a sobrevivência dos peixes.

**Figura 1.** Ganho em peso diário de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™ por 60 dias. A linha tracejada representa a maior resposta no ganho em peso diário de acordo com a equação polinomial.



**Tabela 2.** Crescimento e sobrevivência de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo diferentes níveis de VILIGEN™ por 60 dias.

Variáveis	Suplementação de VILIGEN™ g kg <sup>-1</sup>					Pooled SEM	Valor de P da regressão
	0,00	0,60	1,20	2,40	4,80		
Peso final, g <sup>1</sup>	48,45	50,46	50,43	52,21	50,50	1,59	0,005 <sup>2</sup>
Ganho em peso, g	46,49	48,49	48,43	50,23	48,52	1,21	0,005 <sup>3</sup>
Eficiência alimentar	0,90	0,93	0,87	0,91	0,89	0,01	0,710
Taxa de crescimento específico, %	5,44	5,49	5,47	5,52	5,49	0,04	0,020 <sup>4</sup>
Sobrevivência, %	88,57	92,86	95,14	92,26	93,45	4,87	0,460

<sup>1</sup>Peso inicial = 1,98 g.

<sup>2</sup>y = -43,659x<sup>2</sup> + 24,95x + 48,594; R<sup>2</sup> = 0,91.

<sup>3</sup>y = -42,977x<sup>2</sup> + 24,578x + 46,639; R<sup>2</sup> = 0,91.

<sup>4</sup>y = -0,8073x<sup>2</sup> + 0,4758x + 5,447; R<sup>2</sup> = 0,73.

### 3.2 COMPOSIÇÃO CORPORAL E TAXA DE RETENÇÃO PROTEICA APARENTE

A composição proteica corporal e taxa de retenção proteica aparente foram influenciadas pelos tratamentos dietéticos de forma quadrática (Tabela 3). O menor conteúdo de proteína corporal foi estimado em 2,60 g kg<sup>-1</sup> de suplementação de VILIGEN™. Por outro lado, a menor taxa de retenção de proteína foi estimada em 2,70 g kg<sup>-1</sup> de suplementação. Não houve diferença significativa na composição corporal para umidade, lipídios e matéria mineral.

**Tabela 3.** Composição corporal inicial e final (expressa como peso úmido) e taxa de retenção aparente de proteína (TRAP) em juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™ por 60 dias (n=18).

Variáveis, %	Suplementação de VILIGEN™, g kg <sup>-1</sup>						Pooled SEM	Valor de P da regressão
	Inicial	0,00	0,60	1,20	2,40	4,80		
Umidade	76,65	69,06	68,81	69,47	69,95	68,86	0,74	0,18
Proteína	12,55	16,17	15,75	15,52	15,33	15,86	0,46	0,01 <sup>1</sup>
Lipídio	7,08	11,90	12,45	12,26	11,52	12,48	0,74	0,71
Matéria mineral	3,21	2,85	2,93	2,81	2,72	2,83	0,18	0,75
TRAP	-	40,44	40,32	37,03	38,03	39,44	1,78	0,04 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>y = 12,125x<sup>2</sup> - 6,4279x + 16,136; R<sup>2</sup> = 0,98.

<sup>2</sup>y = 38,403x<sup>2</sup> - 21x + 40,681; R<sup>2</sup> = 0,79.

### 3.3 HISTOLOGIA INTESTINAL

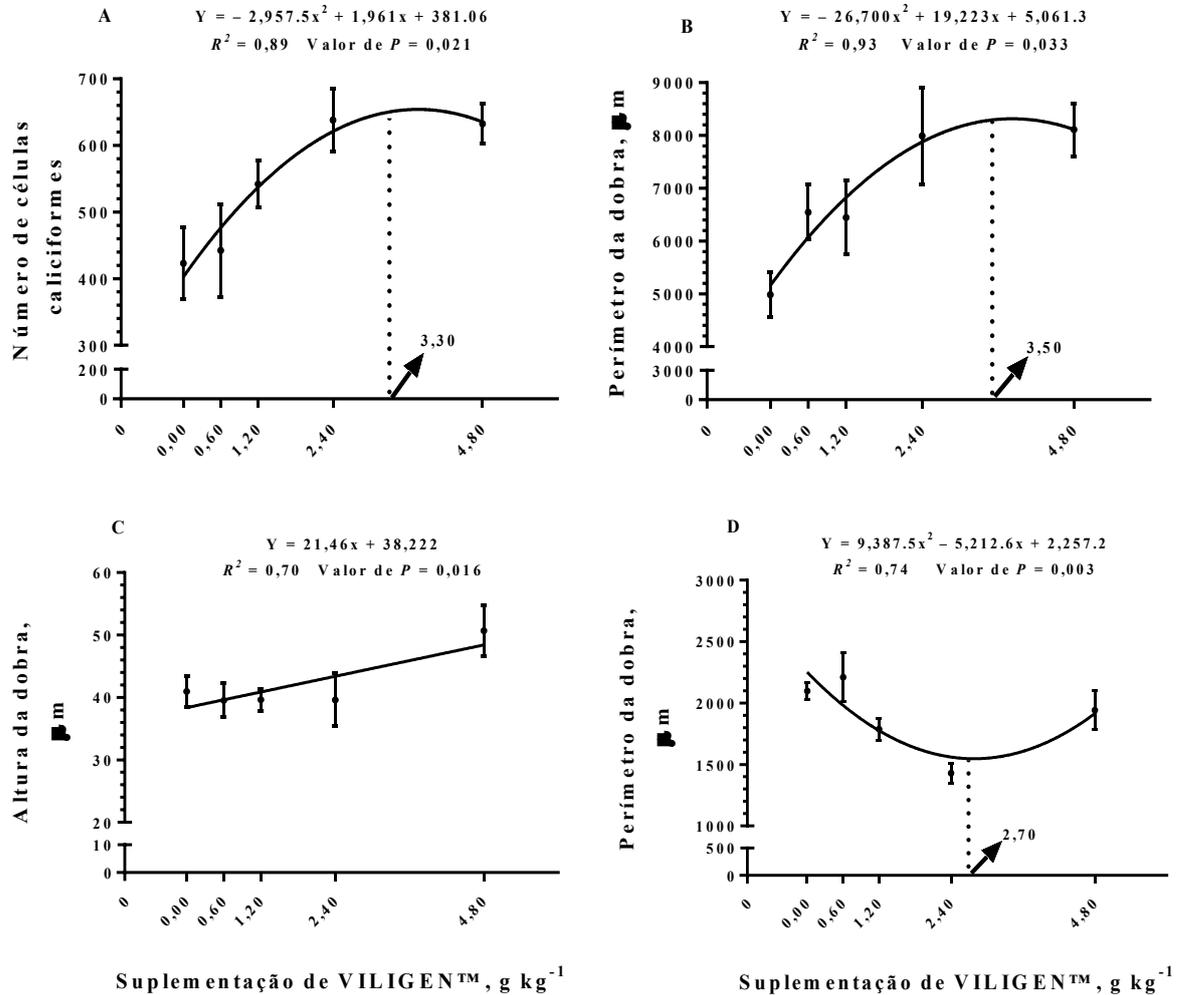
O número de células caliciformes e os perímetros das dobras intestinais da região proximal foram afetados pela suplementação com VILIGEN™; ambas as variáveis resultaram em um efeito quadrático. O maior número de células caliciformes e o maior perímetro foram estimados em 3,30 g kg<sup>-1</sup> (Figura 2A) e 3,50 g kg<sup>-1</sup> (Figura 2B) de inclusão do aditivo na dieta, respectivamente. Na região proximal, as variáveis altura, largura e número de dobras intestinais não foram afetadas pela suplementação dietética de VILIGEN™ (Tabela 4).

A região distal do intestino apresentou diferenças para altura (Figura 2C) e perímetro (Figura 2D) das dobras intestinais. Essas variáveis apresentaram resposta linear e quadrática ao aumento dos níveis dietéticos de VILIGEN™, respectivamente. A largura e o número de dobras, bem como o número de células caliciformes, não foram influenciados pelas dietas experimentais.

**Tabela 4.** Morfometria intestinal, nas diferentes porções intestinais, em juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™ por 60 dias (n = 18 em cada porção intestinal).

Variáveis	Suplementação de VILIGEN™ g kg <sup>-1</sup>					Pooled SEM	Valor de P da regressão
	0,00	0,60	1,20	2,40	4,80		
<b>Proximal</b>							
Altura da dobra, µm	86,14	78,87	85,05	96,00	84,39	11,91	0,26
Largura da dobra, µm	20,74	18,64	18,23	19,29	19,93	1,76	0,09
Número de dobras	38,67	40,33	40,00	39,20	42,33	4,25	0,73
<b>Medial</b>							
Altura da dobra, µm	49,85	40,48	47,77	42,59	45,21	6,59	0,31
Largura da dobra, µm	16,79	15,07	16,20	16,57	17,60	2,38	0,55
Número de dobras	32,33	32,66	30,00	30,00	31,66	2,46	0,58
Número de células caliciformes	369,33	433,67	404,80	506,40	449,00	78,39	0,08
Perímetro dobras, µm	4.138	3.243	3.274	3.457	3.608	566	0,08
<b>Distal</b>							
Altura da dobra, µm	17,65	15,69	16,69	16,56	18,05	2,99	0,41
Número de dobras	17,00	18,33	15,00	10,66	12,80	2,95	0,12
Número de células caliciformes	14,60	37,66	20,66	14,00	31,40	39,34	0,44

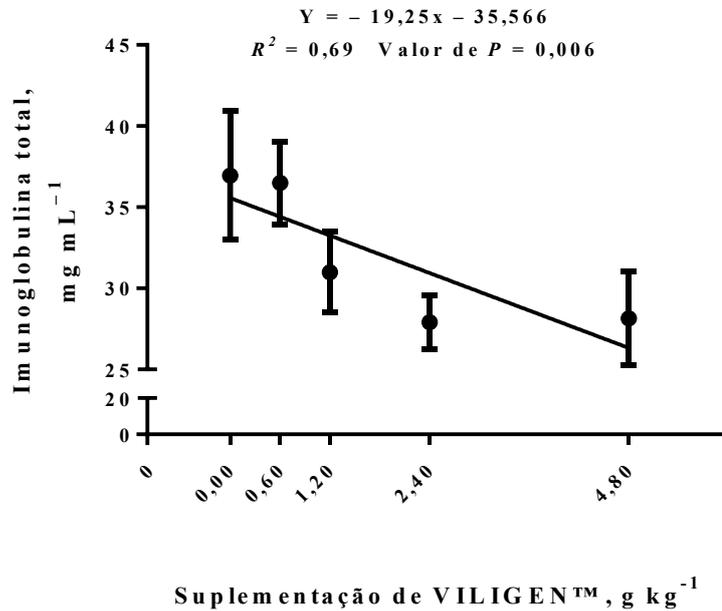
**Figura 2.** Morfometria intestinal de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™. A) número de células caliciformes da região proximal do intestino; B) perímetro de dobra da região proximal do intestino; C) altura da dobra da região distal do intestino; e D) perímetro de dobra da região distal do intestino. As linhas tracejadas representam os valores mais altos ou mais baixos determinados pela equação polinomial (n = 18, dentro de cada porção do intestino).



### 3.4 RESPOSTAS IMUNES

Após o desafio bacteriano, a imunoglobulina total diminuiu de forma linear com a suplementação dietética de VILIGEN™ (Figura 3). No entanto, a suplementação não afetou a proteína total, atividade antimicrobiana, título de aglutinação, nem a atividade da lisozima antes ou após o desafio bacteriano (Tabela 5).

**Figura 3.** Imunoglobulina total no plasma sanguíneo de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™, 14 dias após o desafio bacteriano (n = 18).



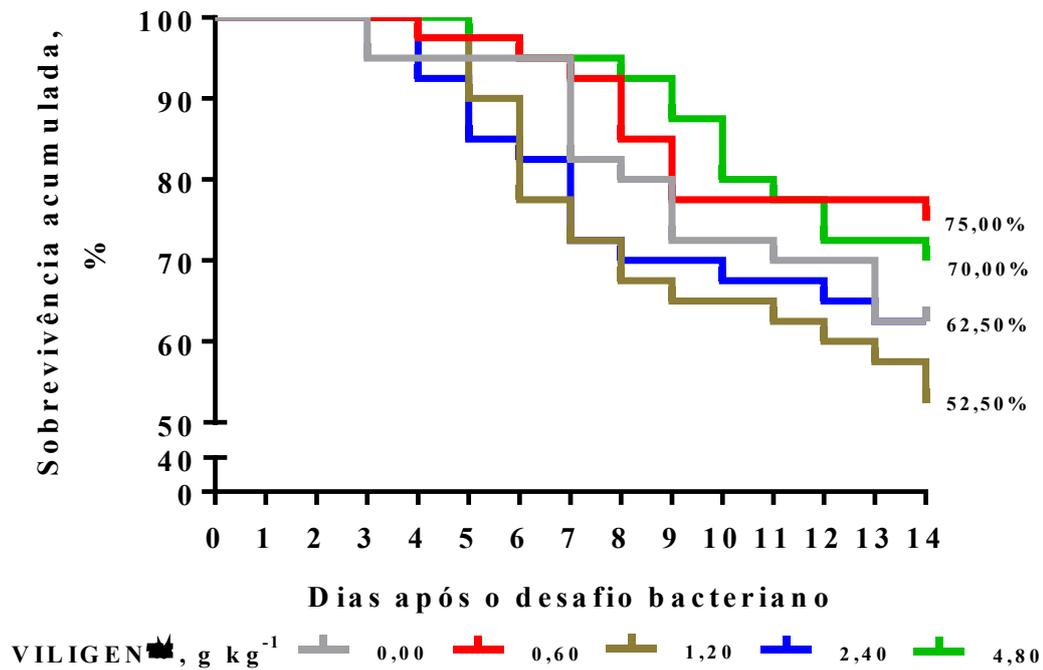
**Tabela 5.** Respostas imunológicas de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™, antes e após o desafio com *Streptococcus agalactiae* (n = 18 desafio anterior n = 12 após o desafio).

Variáveis	Suplementação de VILIGEN™					Pooled SEM	Valor de P da regressão
	g kg <sup>-1</sup>						
	0,00	0,60	1,20	2,40	4,80		
<b>Antes do desafio</b>							
Proteína total, mg mL <sup>-1</sup>	47,77	43,89	50,32	49,56	47,85	3,80	0,18
Imunoglobulina total, mg mL <sup>-1</sup>	31,00	31,10	31,63	32,15	31,57	3,42	0,48
Atividade antimicrobiana, log 2	3,58	3,58	3,60	3,58	3,41	0,30	0,32
Título aglutinante, log 2	6,42	5,58	5,42	5,42	5,58	0,92	0,33
Lisozima, µg mg <sup>-1</sup>	1,59	4,78	1,33	1,05	2,18	1,45	0,81
<b>Depois do desafio</b>							
Proteína total, mg mL <sup>-1</sup>	50,98	51,11	44,18	40,74	42,85	6,59	0,18
Atividade antimicrobiana, log 2	3,33	3,58	3,83	3,58	3,58	0,35	0,48
Título aglutinante, log 2	3,58	3,58	3,60	3,58	3,41	1,24	0,32
Lisozima, µg mg <sup>-1</sup>	1,83	0,54	2,24	1,89	2,38	1,65	0,33

### 3.5 DESAFIO BACTERIANO

As primeiras mortalidades foram verificadas três dias após a infecção bacteriana (Figura 4), quando os peixes começaram a apresentar os sinais clínicos de infecção por *S. agalactiae*, tais como úlceras dérmicas, ascite, hemorragia opercular, nado errático, letargia, opacidade corneana, exoftalmia unilateral e bilateral, além de mudanças na coloração do corpo. Nos dias seis, sete e oito, diferenças na sobrevivência acumulada foram observadas entre os peixes alimentados com diferentes níveis de suplementação de VILIGEN™; peixes alimentados com 4,80 g kg<sup>-1</sup> VILIGEN™ apresentaram a maior taxa de sobrevivência, enquanto peixes alimentados com 1,20 g kg<sup>-1</sup>, apresentaram a menor. No entanto, a partir do décimo dia até o final do desafio bacteriano, não houve diferenças significativas na sobrevivência dos peixes.

**Figura 4.** Sobrevivência cumulativa de juvenis de tilápia-do-nylo após exposição a *Streptococcus agalactiae* a 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup> (n = 40).



## 4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo avaliando a inclusão do aditivo alimentar VILIGEN™ em dietas para peixes. O uso combinado de butirato de sódio, levedura hidrolisada desidratada e proteinato de zinco - os componentes desse aditivo alimentar - afetaram positivamente o

crescimento de juvenis de tilápia-do-nilo. O maior ganho em peso diário foi estimado para ocorrer com a inclusão de  $2,80 \text{ g kg}^{-1}$  de VILIGEN™, representando um aumento de 7,87% quando comparado aos peixes alimentados com dietas sem o aditivo. Além disso, a suplementação de VILIGEN™ na dieta, independentemente do nível de inclusão, sempre resultou em maior crescimento quando comparado ao resultado apresentado pelos peixes alimentados com a dieta sem o aditivo. Houve uma ligeira diminuição na composição proteica corporal e retenção proteica em peixes alimentados com VILIGEN™ a  $1,20 \text{ g kg}^{-1}$ ; no entanto, essa diferença foi de apenas quatro unidades percentuais quando comparada ao maior teor de proteína corporal, registrado nos peixes alimentados com a dieta sem o aditivo.

Dentre os componentes do aditivo VILIGEN™, o butirato é um ácido graxo de cadeia curta que é prontamente absorvido no intestino, sendo metabolizado ainda mais rápido do que a molécula de glicose, fornecendo energia para as células epiteliais (ROBLES et al., 2013). Além disso, a incorporação de butirato nas dietas pode evitar a oxidação de aminoácidos, aumentando a disponibilidade e absorção destes (ROBLES et al., 2013). Os resultados do presente estudo corroboram aqueles encontrados em larvas de tilápia-do-nilo alimentadas com dietas suplementadas com butirato de sódio (JESUS et al., 2019a), as quais apresentaram maior crescimento e melhor conversão alimentar. Os autores levantaram a hipótese de que a melhoria nos resultados de crescimento poderia ser atribuída ao aumento do suprimento de energia ao epitélio intestinal, por meio da suplementação dietética com butirato de sódio. Além dos maiores resultados de crescimento, os peixes alimentados com dietas suplementadas com butirato de sódio também apresentaram aumento da área de superfície de absorção de nutrientes no intestino (JESUS et al., 2019b), o que pode ter contribuído para melhores respostas no crescimento. De fato, o perímetro de dobras intestinais de tilápia-do-nilo foi maior quando alimentados com VILIGEN™, o que apoia a hipótese sugerida por Jesus e colaboradores (2019b).

Além disso, VILIGEN™ contém levedura hidrolisada desidratada, que inclui manano. Manano é um imunomodulador bem conhecido que promove o predomínio da microflora intestinal benéfica (RINGØ et al., 2010), levando a uma melhor assimilação de nutrientes e, conseqüentemente, ao crescimento dos peixes (VAZQUEZ et al., 2006; VOS et al., 2007). Assim, sugere-se que o uso sinérgico do butirato de sódio e da levedura hidrolisada desidratada favorece a absorção e utilização dos nutrientes da dieta, afetando positivamente o crescimento dos peixes. Corroborando com essa hipótese, registramos um aumento do perímetro das dobras intestinais na área proximal, que representa a maior área de absorção de nutrientes pelas microvilosidades intestinais. Para tilápia-do-nilo, a região proximal do intestino é o local onde

as enzimas digestivas apresentam a maior atividade e o principal local de absorção de nutrientes (BUDDINGTON; CHEN; DIAMOND, 1987). Isso também pode ter contribuído para o melhor desempenho dos peixes alimentados com dietas suplementadas com VILIGEN™.

A suplementação dietética com frações ricas em manano (ACTIGEN®) afetou positivamente o crescimento de suínos (EDWARDS et al., 2014) e aves (MATHIS et al., 2012), no entanto, tais descobertas são conflitantes em peixes. Para a tilápia-do-nilo, apesar do aumento da altura das dobras intestinais e da área de absorção do intestino, o crescimento não foi afetado quando ACTIGEN® foi suplementado em baixas doses (0,40, 0,60 e 0,80 g kg<sup>-1</sup>), independentemente de o período de alimentação ser 30 ou 60 dias e (HA et al., 2017). Da mesma forma, o crescimento não foi afetado quando ACTIGEN® foi suplementado em doses maiores (4,00 g kg<sup>-1</sup>) em dietas para tilápia-do-nilo (CAVALCANTE et al., 2020). Estudos com jundiá, *Rhamdia quelen* (ADORIAN et al., 2015), bagre-do-canal, *Ictalurus punctatus* (ZHAO et al., 2015) e “amberjack”, *Seriola dumerili* (FERNÁNDEZ-MONTEIRO et al., 2019) também não conseguiram demonstrar uma resposta positiva ao crescimento quando alimentados com dietas contendo ACTIGEN®. Por outro lado, o robalo europeu, *Dicentrarchus labrax*, apresentou melhor crescimento quando alimentado com ACTIGEN® a 1,6 g kg<sup>-1</sup> por 30 ou 60 dias (TORRECILLAS et al., 2015), mas precisou de um período de alimentação mais longo (90 dias) para mostrar um efeito de crescimento positivo, quando alimentado com uma mistura das duas gerações de prebióticos ACTIGEN® e BIO-MOS® (TORRECILLAS et al., 2018). Portanto, diferenças nas doses de suplementação e períodos de alimentação não podem ser descartadas ao explicar os resultados conflitantes de crescimento em peixes.

O aumento no crescimento dos peixes alimentados com VILIGEN™ no presente estudo, juntamente com as respostas de crescimento conflitantes ao ACTIGEN® nos estudos mencionados anteriormente, são consistentes com uma vantagem potencial de combinar butirato de sódio, proteinato de zinco e levedura hidrolisada desidratada, uma vez que o aditivo ACTIGEN® contém apenas frações ricas em manano. Os componentes presentes na levedura hidrolisada podem modular positivamente as bactérias no intestino, juntamente com o butirato de sódio, que é um substrato de energia facilmente absorvido pelo intestino, propiciando uma condição favorável à absorção de nutrientes e consequente crescimento dos peixes. Além disso, o proteinato de zinco é uma forma orgânica de mineral ligada a proteínas que é mais biodisponível do que as fontes inorgânicas de zinco, além de ser uma molécula mais estável, que não interage com outros nutrientes (IBS; RINK, 2003; LIN et al., 2013). Assim, o zinco na forma orgânica pode ser absorvido de forma mais completa, favorecendo o crescimento e

melhorando os sistemas imunológico e antioxidante dos peixes (IBS; RINK, 2003; APINES-AMAR et al., 2004).

O número de células caliciformes é um importante indicador de resistência à doença entérica, pois essas células são responsáveis pela secreção de muco que recobre o epitélio intestinal, formando a primeira linha de defesa luminal (ADORIAN et al., 2016). Neste estudo, peixes alimentados com dietas suplementadas com VILIGEN™ apresentaram maior número de células caliciformes no intestino proximal do que os peixes do grupo controle, sem o aditivo. O muco fornece proteção química contra toxinas e antígenos e possui propriedades bactericidas que reduzem a população bacteriana em contato direto com a superfície epitelial (CORFIELD et al., 2000; HOEBLER et al., 2006; GAUDIER et al., 2009). Assim, pode-se especular que a mucosa intestinal dos peixes que receberam dietas contendo VILIGEN™ apresentava maior proteção contra infecções. No entanto, estudos futuros avaliando mucinas e propriedades imunológicas do muco seriam necessários para validar essa hipótese.

Quando a infecção de *S. agalactiae* ocorre por via oral, como no presente estudo, ocorre infecção sistêmica nas primeiras horas após o contato com a bactéria, sendo que o cérebro, fígado, baço e rim são os principais órgãos afetados (IREGUI et al., 2016). Nossos resultados de sobrevivência após 14 dias da infecção bacteriana não demonstraram diferenças significativas, mas sugerem que o maior número de células caliciformes e a provável maior produção de muco não foram suficientes para proteger totalmente os peixes contra a infecção bacteriana.

Pode-se especular que ocorreu imunossupressão no sistema imune humoral registrada em peixes alimentados com as doses mais altas de VILIGEN™. De fato, a administração de altas doses de imunostimulantes por longos períodos, como os usados no presente estudo (60 dias), pode não melhorar o sistema imunológico (RODRIGUEZ et al., 2002; COUSO et al., 2003; WELKER et al., 2012) ou mesmo diminuir a resistência a patógenos (WHITTINGTON; LIM; KLESZIUS, 2005). No entanto, isso não ocorreu em peixes alimentados com a maior dose testada (4,80 g kg<sup>-1</sup>), uma vez que apresentaram a segunda maior sobrevivência após o desafio bacteriano, indicando que não há tendência óbvia na sobrevivência que seja consistente com o efeito linear do nível do aditivo sobre as imunoglobulinas. Uma possível explicação para esses resultados em que as menores (0,60 g kg<sup>-1</sup>) e maiores (4,80 g kg<sup>-1</sup>) dosagens testadas apresentam os melhores resultados de sobrevivência após o desafio bacteriano pode estar ligada a alterações na comunidade bacteriana intestinal, que, infelizmente, não foi avaliada neste estudo. Assim, sugerimos que mais estudos sejam realizados para avaliar a dose e a duração ideal da

suplementação dietética de VILIGEN™, bem como para avaliar a influência da diversidade microbiana intestinal sobre a resistência à doença da tilápia do Nilo e respostas imunológicas.

## 5 CONCLUSÃO

O uso de VILIGEN™ em dietas resulta em maior crescimento e mudanças benéficas na morfologia intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo, quando comparados ao grupo controle. No entanto, os resultados de resistência à infecção bacteriana e respostas imunes não foram claros. Ressalta-se que níveis de inclusão acima de 0,60 g kg<sup>-1</sup> quando alimentados por um período de 60 dias resultaram em menor imunoglobulina plasmática total, o que poderia levar à imunossupressão. Mais estudos são necessários para determinar a duração ideal da suplementação dietética com VILIGEN™ para otimizar as respostas imunológicas e a sobrevivência da tilápia-do-nilo após o desafio bacteriano.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil, Código Financeiro 001), que concedeu bolsas para o primeiro, segundo e terceiro autores. Os autores também agradecem ao CNPq, Brasil, pelas bolsas concedidas ao quarto e último autor. Agradecemos às empresas Alltech Inc. (Nicholasville, KY, EUA) pelo apoio financeiro neste estudo e Cargill (Toledo, Brasil), Nicoluzzi Rações Ltda (Penha, Brasil) e Kabsa Exportadora SA (Porto Alegre, Brasil) pela doação ingredientes para a fabricação das dietas experimentais. Agradecemos também à Dra. Scheila Anelise Pereira do Departamento de Aquicultura da UFSC, Brasil, pela revisão do manuscrito.

## REFERÊNCIAS

A.O.A.C. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, 1999.

ADORIAN, T.J. et al. Effect of different dietary fiber concentrates on the metabolism and indirect immune response in silver catfish. **Animal Feed Science And Technology**, v. 215, p. 124-132, maio 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.001>

- ADORIAN, T.J. et al. Dietary fiber in the nutrition of silver catfish: prebiotic or antinutrient? **Animal Feed Science And Technology**, v. 209, p. 167-173, nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.07.017>.
- AMAR, E.C. et al. Effects of dietary beta-carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fisheries Science**, v. 66, n. 6, p. 1068-1075, dez. 2000. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1444-2906.2000.00170.x>.
- APINES-AMAR, M.J.S. et al. Amino acid-chelate: a better source of Zn, Mn and Mu for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 240, n. 1-4, p. 345-358, out. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.032>.
- BARTON, B.A. Salmonid Fishes Differ in Their Cortisol and Glucose Responses to Handling and Transport Stress. **North American Journal Of Aquaculture**, v. 62, n. 1, p. 12-18, jan. 2000. [http://dx.doi.org/10.1577/1548-8454\(2000\)0622.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1577/1548-8454(2000)0622.0.co;2).
- BARUAH, K. et al. Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. **Aquaculture Research**, p. 070116074017002, 16 jan. 2007. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01624.x>.
- BUDDINGTON, R.K.; CHEN, J.W.; DIAMOND, J. Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. **The Journal Of Physiology**, v. 393, n. 1, p. 261-281, 1 dez. 1987. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016823>.
- CAVALCANTE, R.B. et al. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Nile tilapia: growth performance and protection against *aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100343, jul. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100343>.
- CORFIELD, A.P. et al. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. **Gut**, v. 47, n. 4, p. 589-594, 1 out. 2000. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.47.4.589>.
- COUSO, N. et al. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. **Aquaculture**, v. 219, n. 1-4, p. 99-109, abr. 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(03\)00019-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(03)00019-x).
- DENEV, S. et al. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. **International Aquatic Research**, 1, 1–29, 2009. <http://www.intelaquares.com/Doc/1.pdf>
- EDWARDS, M.V. et al. Mannose rich fraction of *Saccharomyces cerevisiae* promotes growth and enhances carcass yield in commercially housed grower–finisher pigs. **Animal Feed Science And Technology**, v. 197, p. 227-232, nov. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.08.004>.
- FACIMOTO, C.T. et al. Whole-Genome Sequence of *Streptococcus agalactiae* Strain S13, Isolated from a Fish Eye from a Nile Tilapia Farm in Southern Brazil. **Genome Announcements**, v. 5, n. 35, p. 1-12, 31 ago. 2017. <http://dx.doi.org/10.1128/genomea.00917-17>.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS -FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Rome, 2018. <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>

FERNÁNDEZ-MONTERO, A. et al. Increased parasite resistance of greater amberjack (*Seriola dumerili* Risso 1810) juveniles fed a cMOS supplemented diet is associated with upregulation of a discrete set of immune genes in mucosal tissues. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 86, p. 35-45, mar. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.034>.

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

GAUDIER, E. et al. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. **Physiological Research**, p. 111-119, 2009. Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.33549/physiolres.931271>.

HA, N. et al. Dietary carbohydrates and protein of yeast modulate the early stages of innate immune response in tilapia (*Oreochromis niloticus*) primarily after LPS inoculation. **Aquaculture International**, v. 25, n. 2, p. 755-776, 3 out. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-016-0073-2>.

HOEBLER, C. et al. MUC Genes Are Differently Expressed During Onset and Maintenance of Inflammation in Dextran Sodium Sulfate-Treated Mice. **Digestive Diseases And Sciences**, v. 51, n. 2, p. 381-389, fev. 2006. <http://dx.doi.org/10.1007/s10620-006-3142-y>.

IBS, K.; RINK, L. Zinc-Altered Immune function. **The Journal Of Nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1452-1456, 1 maio 2003. <http://dx.doi.org/10.1093/jn/133.5.1452s>.

IREGUI, C.A. et al. Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis spp.* **Journal Of Fish Diseases**, v. 39, n. 2, p. 205-215, 16 fev. 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12347>.

JESUS, G.F.A. et al. Protected forms of sodium butyrate improve the growth and health of Nile tilapia fingerlings during sexual reversion. **Aquaculture**, v. 499, p. 119-127, jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.027>.

JESUS, G.F.A. et al. Use of protected forms of sodium butyrate benefit the development and intestinal health of Nile tilapia during the sexual reversion period. **Aquaculture**, v. 504, p. 326-333, abr. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.018>.

JIMÉNEZ, A.P. et al. *Streptococcus agalactiae*: Hasta ahora el único *Streptococcus* patógeno de tilapias cultivadas en Colombia. **Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia**, 54, 285–294, 2007. <http://www.bdigital.unal.edu.co/15896/1/10628-38445-1-PB.pdf>

LIN, S. et al. Comparison of chelated zinc and zinc sulfate as zinc sources for growth and immune response of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 406-407, p. 79-84, ago. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.04.026>.

LÜCKSTÄDT, C. The use of acidifiers in fish nutrition. **Cab Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 3, n. 044, 1 abr. 2008. <http://dx.doi.org/10.1079/pavsnmr20083044>.

MATHIS, G.F. et al. Effects of Dietary Antibiotics, Actigen® Yeast Cell Wall Derivative, or Both on Broiler Chicken Live Performance in a Fifty-Two Day Pen Trial on Built-up Litter. **The Journal Of Poultry Science**, v. 49, n. 4, p. 313-318, 2012. <http://dx.doi.org/10.2141/jpsa.0110175>.

MUNIR, M.B. et al. Dietary prebiotics and probiotics influence growth performance, nutrient digestibility and the expression of immune regulatory genes in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. **Aquaculture**, v. 460, p. 59-68, jul. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.041>

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, D.C.: National Academy Press, 2011.

NG, W.; KOH, C. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. **Reviews In Aquaculture**, v. 9, n. 4, p. 342-368, 3 mar. 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12141>.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. Bacterioses. In: **Doenças de Peixes: Profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá, 2008. p. 165-220.

POPMA, T.J.; LOVSHIN, L.L. Worldwide prospects of commercial production of tilapia. Auburn: Auburn University, 1995.

RINGØ, E. et al. Prebiotics in aquaculture: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 117-136, abr. 2010. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x>.

RINK, L. et al. Zinc homeostasis and immunity. **Trends In Immunology**, v. 28, n. 1, p. 1-4, jan. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2006.11.005>.

ROBLES, R. et al. Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). **Fish Physiology And Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1567-1580, 5 jun. 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-013-9809-3>.

RODRÍGUEZ, A. et al. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology And Immunopathology**, v. 96, n. 3-4, p. 183-192, dez. 2003. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2003.07.001>.

SANKARAN, K., GURNANI, S. On the variation in the catalytic activity of lysozyme in fishes. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, 9, 162-165, 1972.

SILVA, B.C. et al. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 874-880, nov. 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2009001100002>.

SILVA, B.C. et al. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. **Aquaculture**, v. 384-387, p. 104-110, mar. 2013.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.12.017>.

TIENGTAM, N. et al. The effects of dietary inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tuber on the growth performance, haematological, blood chemical and immune parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 10, p. 5280-5288, 25 abr. 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/are.13341>.

TORRECILLAS, S. et al. Effects of dietary concentrated mannan oligosaccharides supplementation on growth, gut mucosal immune system and liver lipid metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 42, n. 2, p. 508-516, fev. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.11.033>.

TORRECILLAS, S. et al. Feeding European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles with a functional synbiotic additive (mannan oligosaccharides and *Pediococcus acidilactici*): an effective tool to reduce low fishmeal and fish oil gut health effects? **Fish & Shellfish Immunology**, v. 81, p. 10-20, out. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.007>.

TORT, L. et al. Stress and immune modulation in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1366-1375, dez. 2011.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>.

TRICHET, V.V. et al. Nutrition and immunity: an update. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 3, p. 356-372, fev. 2010. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02374.x>.

VAN DOAN, H. et al. Effects of orange peels derived pectin on innate immune response, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured under indoor biofloc system. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 80, p. 56-62, set. 2018.

Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.049>.

VÁZQUEZ, M.J. et al. Enhancing the potential of oligosaccharides from corncob autohydrolysis as prebiotic food ingredients. **Industrial Crops And Products**, v. 24, n. 2, p. 152-159, set. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.03.012>.

VOS, A.P. et al. Immune-Modulatory Effects and Potential Working Mechanisms of Orally Applied Nondigestible Carbohydrates. **Critical Reviews™ In Immunology**, v. 27, n. 2, p. 97-140, 2007.

<http://dx.doi.org/10.1615/critrevimmunol.v27.i2.10>.

WATANABE, W.O. et al. Tilapia Production Systems in the Americas: technological advances, trends, and challenges. **Reviews In Fisheries Science**, v. 10, n. 3-4, p. 465-498, jul. 2002. <http://dx.doi.org/10.1080/20026491051758>.

WELKER, T.L. et al. Use of Diet Crossover to Determine the Effects of  $\beta$ -glucan Supplementation on Immunity and Growth of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 43, n. 3, p. 335-348, jun. 2012.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00569.x>.

- WHITTINGTON, R. et al. Effect of dietary  $\beta$ -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 248, n. 1-4, p. 217-225, jul. 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.013>.
- YANONG, R.P.E., FLOYD, R.F. Streptococcal infections of fish. Circular FA057, Florida Cooperative Extension Service. IFAS, University of Florida. 2002  
<https://pdfs.semanticscholar.org/8b5f/e8c64447a815a5ed0c89dfa32d5d3d056481.pdf>
- ZAMRI-SAAD, M. et al. Pathological Changes in Red Tilapias (*Oreochromis spp.*) Naturally Infected by *Streptococcus agalactiae*. **Journal Of Comparative Pathology**, v. 143, n. 2-3, p. 227-229, ago. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.01.020>.
- ZHAO, H. et al. Impact of feed additives on surface mucosal health and columnaris susceptibility in channel catfish fingerlings, *Ictalurus punctatus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 46, n. 2, p. 624-637, out. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.07.005>.
- ZHENG, Y. et al. Hepatic transcriptome analysis of juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*), fed diets supplemented with different concentrations of resveratrol. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 147, p. 447-454, jan. 2018.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.006>.

### CAPÍTULO III: A SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE VILIGENT™ MODULA A MICROBIOTA INTESTINAL E A FUNÇÃO DIGESTIVA EM JUVENIS DE TILÁPIA-DO-NILO

Jhonis Ernzen Pessini<sup>1</sup>, Delano Dias Schleder<sup>2</sup>, Vitória de Oliveira Daitx<sup>1</sup>, Cristina Rios<sup>3</sup>, Carlos Peres Silva<sup>3</sup>, James Eugene Pettigrew<sup>4</sup>, Débora Machado Fracalossi\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto Federal Catarinense - Campus Araquari, Rodovia 280, Colégio Agrícola, Araquari, Santa Catarina, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

<sup>4</sup> Pettigrew Research Services, Tubac, AZ, USA.

\*Autor correspondente: [debora.fracalossi@ufsc.br](mailto:debora.fracalossi@ufsc.br)

#### RESUMO

Os aditivos para dietas podem atuar modulando positivamente a microbiota intestinal, melhorando a função digestiva e reduzindo a incidência de patógenos no hospedeiro. No presente estudo foi avaliada a influência do aditivo alimentar VILIGENT™ - constituído de butirato de sódio, levedura hidrolisada desidratada e proteinato de zinco - no perfil da comunidade microbiana do intestino e na atividade de enzimas digestivas em juvenis de tilápia-do-nilo. Doses crescentes (0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg<sup>-1</sup>) foram adicionadas à dieta controle e distribuídas aleatoriamente a seis grupos, contendo 28 peixes cada, totalizando 30 unidades experimentais. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente duas vezes ao dia, durante 60 dias. O sequenciamento da região V3-V4 do gene 16S rRNA das bactérias presente no intestino de tilápias gerou 1.003.306 sequências, agrupadas em 74 unidades taxonômicas operacionais. Peixes alimentados com dietas contendo VILIGENT™ apresentaram maior diversidade alfa de espécies, enquanto peixes alimentados com dietas contendo 0,60 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> apresentaram um perfil de comunidade bacteriana intestinal distinto (diversidade beta) quando comparados aos peixes alimentados com a dieta controle. No geral, os filos mais abundantes foram: Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, Patescibacteria, Chloroflexi, Chlamydiae, Firmicutes, Dependientiae e Planctomycetes. Já os gêneros mais abundantes foram *Legionella*, *Mycobacterium*, *Aurantimicrobium*, *Cetobacterium*, *Hyphomicrobium*,

*Rhodobacter*, *Nordella*, *Rombustia* e *Bacillus*. Houve um aumento na atividade da tripsina na porção medial do intestino e uma redução na atividade da lipase na porção proximal do intestino em peixes alimentados com dietas suplementadas com VILIGEN™. Este é o primeiro estudo em peixes, particularmente na tilápia-do-nilo, que demonstra o efeito benéfico de VILIGEN™ na modulação positiva do microbioma intestinal por meio de um aumento na diversidade alfa e beta de espécies bacterianas no intestino, sugerindo menor suscetibilidade à disbiose microbiana.

**Palavras-chave:** microbiota; tilápia-do-nilo; enzimas digestivas; aditivo alimentar.

## 1 INTRODUÇÃO

Recentemente, a influência da dieta na microbiota intestinal tem chamado a atenção de pesquisadores devido ao seu papel essencial na saúde e bem-estar do hospedeiro (RINGØ et al., 2016). Em peixes, a microbiota intestinal é muito dinâmica e extremamente sensível a mudanças na dieta, ao contrário do que ocorre em animais terrestres (RINGØ et al., 2016). Além disso, também é influenciada por variações sazonais, estresse, particularidades do trato digestório de cada animal, estágio de desenvolvimento da vida, entre outros fatores (ROESELERS et al., 2011; SULLAM et al., 2012).

O uso de aditivos alimentares que modulam positivamente a microbiota intestinal é uma ferramenta importante na aquicultura, uma vez que o trato gastrointestinal é um dos principais pontos de entrada de patógenos (BIRKBECK; RINGØ, 2005). Assim, além de ter como função principal a digestão e absorção de nutrientes (RINGØ et al., 2015; CELI et al., 2017), o trato gastrointestinal tem grande importância no sistema imunológico dos peixes, pois é a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos presentes na água, ração ou trato gastrointestinal (FENG et al., 2015; TRAN-NGOC et al., 2016). Além disso, os aditivos para rações podem estimular o crescimento de bactérias benéficas no intestino, promovendo modulação positiva e minimizando a proliferação de patógenos, conforme relatado anteriormente com a suplementação de probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos e seus sais, aminoácidos, minerais e vitaminas (RINGØ et al., 2015; GHANBARI et al., 2015; RINGØ et al., 2010).

VILIGEN™ (Alltech, Nicholasville, EUA) é um novo aditivo comercial para rações animais, composto por butirato de sódio, levedura hidrolisada desidratada e proteinato de zinco que foi desenvolvido por meio de técnicas nutrigenômicas para melhorar a saúde intestinal de

animais de produção. Entre os componentes do VILIGEN™, o butirato de sódio é um ácido orgânico que favorece o crescimento de bactérias lácticas, as quais podem produzir e estimular a produção de enzimas digestivas no intestino do hospedeiro, beneficiando o crescimento e desenvolvimento do tecido intestinal (BOOTH; STRATFORD, 2003; HOSEINIFAR et al., 2016; BARUAH et al., 2007; LUCKSTADT, 2008; ROBLES et al., 2013). As leveduras são fontes de  $\beta$ -glucanos, mananoligossacarídeos e nucleotídeos (SHURSON, 2018) que podem modular a saúde intestinal e o sistema imunológico dos peixes (SAKAI et al., 2001; GIL, 2002, SONG et al., 2014; AKTER et al., 2014; al., 2016; JAYACHANDRAN et al., 2018; CARBALLO et al., 2019) além de melhorar o desenvolvimento e a funcionalidade do intestino (HAHOR et al., 2019; TIE et al., 2019). Por fim, o proteinato de zinco é um mineral na forma orgânica, a qual é mais biodisponível do que as fontes inorgânicas de zinco, favorecendo o reparo e crescimento tecidual, além da proliferação de células do sistema imunológico (IBS; RINK, 2003; APINES-AMAR et al., 2004; RINK; HAASE, 2007; LIN et al., 2013).

A suplementação dietética de VILIGEN™ para tilápia-do-nilo provou ser eficaz em promover desempenho em crescimento de 8%, além de melhorar a morfologia das dobras intestinais (PESSINI et al., 2021). Esses achados são promissores e levaram à investigação do efeito da suplementação de VILIGEN™ na composição da comunidade microbiana do intestino e nas atividades das enzimas digestivas, em juvenis de tilápia-do-nilo.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 PLANO EXPERIMENTAL, DIETAS E ALIMENTAÇÃO**

A formulação e preparação das dietas, bem como as práticas alimentares, foram relatadas em Pessini et al. (2021). Resumidamente, uma dieta basal foi formulada com ingredientes práticos para atender às necessidades nutricionais da tilápia-do-nilo (NRC, 2011; FURUYA, 2010). O aditivo VILIGEN™ foi suplementado na dieta basal em quatro níveis: 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> em substituição ao milho moído. Além disso, um grupo de peixes foi alimentado com dieta controle sem o aditivo (Tabela 1).

O ensaio de alimentação foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se seis repetições para cada nível testado. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9h00 h e 16h30 h) até a saciedade aparente por 60 dias. Ao final de cada dia, os recipientes usados para armazenar a respectiva dieta experimental de cada unidade experimental, foram pesados para registrar o consumo diário de ração por tanque.

## 2.2 PEIXES, PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS E COLETA DE AMOSTRAS

Todos os procedimentos adotados no experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC), sob o número de protocolo 2200250219.

Peixes, condições e procedimentos experimentais foram os mesmos descritos em Pessini et al. (2021). O peso médio inicial ( $\pm$  desvio padrão) dos peixes foi  $1,98 \pm 0,04$  g; após o término do período experimental, os peixes alimentados com 0,00; 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g  $\text{kg}^{-1}$  de VILIGEN™ atingiram um peso médio final de 48,45 g; 50,46 g; 50,43 g; 52,21 g e 50,50 g, respectivamente (PESSINI et al., 2021).

Ao final do período experimental, os peixes foram mantidos em jejum por 24 h, sendo posteriormente anestesiados com Eugenol® (Química e Farmacêutica Biodinâmica, Ibiporã, Brasil) a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e, em seguida, sacrificados a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  com o mesmo produto.

A coleta das amostras para análise da microbiota intestinal ocorreu em câmara de fluxo contínuo e os instrumentos de coleta foram esterilizados em autoclave e liberados dos fragmentos de RNA e DNA por meio de RNaseZAP™ (Sigma Allrich, St. Louis, EUA). Além disso, entre cada amostragem, a bancada e os instrumentos de coleta foram limpos para evitar contaminação entre as amostras de digesta. O intestino foi coletado de dois peixes por unidade experimental, que tiveram parte da digesta intestinal amostrada. Um *pool* de amostras de digesta de peixe por unidade experimental foi realizado a fim de obter biomassa suficiente de DNA para análises posteriores. Assim, foram obtidas seis amostras de digesta de 200 mg para cada tratamento, as quais foram imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido até o processamento.

Para as análises das enzimas digestivas, o intestino de dois peixes por unidade experimental ( $n = 12$  por tratamento) foi coletado e dividido em três porções de tamanho semelhante: proximal, medial e distal. As amostras foram colocadas em tubos Falcon de 15 mL e armazenadas sob refrigeração a  $-20^\circ\text{C}$  até o processamento.

**Tabela 1.** Formulação e composição das dietas experimentais e composição do aditivo alimentar.

Ingredientes, g kg <sup>-1</sup>	Inclusão de VILIGEN™, g kg <sup>-1</sup>				
	0,00	0,60	1,20	2,40	4,80
Milho moído <sup>1</sup>	432,90	432,30	431,70	430,50	428,10
Farelo de soja <sup>2</sup>	366,00	366,00	366,00	366,00	366,00
Farinha de vísceras de frango <sup>3</sup>	195,00	195,00	195,00	195,00	195,00
Premix vitamínico-mineral <sup>4</sup>	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Cloreto de colina <sup>2,5</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Hidroxitolueno butilado -BHT	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
VILIGEN™ <sup>6</sup>	0,00	0,60	1,20	2,40	4,80
<b>Composição das dietas, g kg<sup>-1</sup> da matéria seca</b>					
Matéria seca	907,00	914,60	845,60	904,30	897,90
Proteína bruta	365,20	365,90	365,60	368,90	367,80
Proteína digestível <sup>7</sup>	340,00	340,00	340,00	340,00	340,00
Energia bruta, kcal kg <sup>-1</sup>	4.600	4.658	4.621	4.574	4.630
Energia digestível <sup>7</sup> , kcal kg <sup>-1</sup>	3.273	3.273	3.273	3.273	3.273
Extrato etéreo	75,10	71,10	74,70	71,90	75,60
Matéria mineral	57,40	58,30	56,80	56,30	56,20
<b>Composição do VILIGEN™, g kg<sup>-1</sup> da matéria seca</b>					
Proteína bruta	324,10				
Energia bruta, kcal kg <sup>-1</sup>	4,633				
Extrato etéreo	42,50				
Matéria mineral	191,30				
Butirato de sódio	3,50				
Zinco	11,97				

<sup>1</sup>Fornecido por Agrotterra Agropecuária (Florianópolis, Brasil).

<sup>2</sup>Fornecido por Nicoluzzi Rações Ltda (Penha, Brasil).

<sup>3</sup>Fornecido por Kabsa S.A (Porto Alegre, Brasil).

<sup>4</sup>Fornecido por Cargill (Toledo, Brasil), composição por kg de produto: 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 ferroso 8.000 mg, iodato de cálcio 92 mg, sulfato de manganês 3.500 mg, niacina 8.333 mg, selenito 100 mg, vitamina (vit.) A 1.666.670 IU, vit. B1 2.083 mg, vit. B12 5.000 µg, vit. B2 4.166 mg vit. B6 3.166 mg, ácido ascórbico equivalente 66.670 mg, vit. D3 666.670 IU, vit. E 1.666 IU, vit. K3 833 mg, sulfato de zinco 23.330 mg, inositol 50.000 mg, e propionato de cálcio 250.000 mg.

<sup>5</sup>600 g colina kg<sup>-1</sup>.

<sup>6</sup>Produzido por Alltech Inc. (Nicholasville, USA) e importado por Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda (Maringá Brasil).

<sup>7</sup>Valores digestíveis estimados com base nos propostos por Furuya (2010).

### 2.3 DIVERSIDADE MICROBIANA INTESTINAL

O DNA obtido e previamente armazenado foi extraído com fenol/clorofórmio, seguindo o protocolo estabelecido pela Neopropectra Microbiome Technologies (Florianópolis, Brasil) e baseado em Moore e Dowhan (2000). A região V3-V4 do gene 16S rRNA foi amplificada por PCR usando os iniciadores 341F (CCTACGGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACCAGGGTATCTAAT) e submetida ao sequenciamento em um sequenciador Illumina MiSeq (2 x 300 bp). As sequências brutas (totalizando 1.527.128 sequências, média de 76.356 por amostra) foram processadas e filtradas para remover (1) *primers* e adaptadores, (2) sequências com Ns, (3) sequências com mais de três (sentido) ou cinco (anti-sentido ou reverso) erros esperados e (4) sequências menores que 50 bp foram finalmente cortadas para um comprimento fixo de 280 bp (Trimmomatic, versão 0.36).

Após filtragem, 90,8% das leituras foram retidas para análise posterior (1.386.587 leituras no total, uma média de 69.329 leituras por amostra). O conjunto de dados de sequenciamento foi processado usando o pipeline USEARCH de 32 bits (versão 11.0.667) e Blastn NCBI<sup>®</sup>. As quimeras foram removidas e as sequências agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTU), utilizando UPARSE (com 97% de similaridade). A atribuição taxonômica das sequências bacterianas foi realizada utilizando o banco de dados SILVA com identidade de 90% (versão 138).

### 2.4 ENZIMAS DIGESTIVAS

Amostras dos intestinos dos peixes foram processadas individualmente e homogeneizadas em 1 mL de água ultrapura. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 12.000 x g, a 4°C. Em seguida, os extratos enzimáticos brutos (sobrenadante) foram armazenados a -20°C. Antes da realização das análises enzimáticas, os extratos brutos foram descongelados e diluídos em água ultrapura, nas seguintes diluições: 200x para análise de amilase e tripsina, 1000x para quimiotripsina e lipase. Todas as leituras foram realizadas em leitor de microplacas TECAN (Infinite Pro., Califórnia, EUA), utilizando-se absorvância de 410 nm para tripsina e 550 nm para quimiotripsina e amilase. A atividade da lipase foi lida na excitação  $\lambda$  a 355 nm e emissão  $\lambda$  a 460 nm, usando um leitor de fluorescência TECAN.

As atividades de tripsina e quimiotripsina foram avaliadas utilizando-se os substratos N- $\alpha$ -Benzoil-DLarginina-4-pnitroanilida (bz-R-pNA) e N-succinil-Ala-Ala-Pro-Leu-p-nitroanilida (suc-AAPL- 4- pNA), respectivamente. Estes foram dissolvidos em

dimetilsulfóxido (DMSO) a 2 mM e diluídos em tampão fosfato (pH 7,5) na proporção de 1:1 (v/v), para se obter a concentração final de 1 mM. As reações foram realizadas utilizando-se 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático misturado com a mesma quantidade de solução de substrato (1:1, v/v). As leituras foram feitas a cada 15 min, por 1 h, a 30°C. Cada unidade enzimática (U) foi expressa como a conversão enzimática de 1  $\mu\text{mol}$  do substrato  $\text{min}^{-1}$ , conforme determinado pela curva padrão de p-nitroanilina (p-A). A atividade específica da tripsina e quimiotripsina foi expressa como o número de unidades de enzima por concentração de proteína total do extrato enzimático ( $\text{U mg de proteína}^{-1}$ ).

A análise da atividade da amilase baseou-se na detecção de grupos de redutores de carboidratos com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Como substrato, foi usada uma solução de amido a 2% em tampão de acetato de sódio (100 mM, pH 6,5). Para as reações, 25  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foram misturados com 25  $\mu\text{L}$  do substrato (1:1, v/v). As amostras foram incubadas em banho-maria a 30 °C por 1 h, sendo que a reação foi interrompida a cada 15 min, adicionando-se 100  $\mu\text{L}$  de DNS. Após a reação ser interrompida, os tubos foram aquecidos a 100 °C por 5 min, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de água destilada e a absorbância lida em microplacas. Cada unidade da enzima (U) foi expressa como a clivagem enzimática de 1  $\mu\text{mol}$  de glicose  $\text{min}^{-1}$ , em comparação com a curva de glicose padrão. A atividade específica da amilase foi expressa como o número de unidades de enzima por concentração do extrato enzimático ( $\text{U mg de proteína}^{-1}$ ).

A atividade da lipase foi analisada usando oleato de umbeliferil dissolvido em acetonitrila a uma concentração final de 1  $\mu\text{M}$  como substrato. Para tanto, 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foram misturados com 50  $\mu\text{L}$  do substrato (1:1, v/v). Posteriormente, a leitura da microplaca foi realizada a cada 2 min, por período de 20 min. Uma unidade da enzima (U) foi expressa como a conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de metilumbeliferona  $\text{min}^{-1}$ , em comparação com a curva padrão. A atividade específica da lipase foi expressa como o número de unidades de enzima por concentração do extrato enzimático ( $\text{U mg de proteína}^{-1}$ ).

A concentração de proteínas solúveis no extrato enzimático bruto foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

## 2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados do microbioma intestinal foram analisados pelo software R (versão 3.5.1). Devido às diferenças na profundidade de sequenciamento entre as amostras (até 9,3x), os dados

de contagem (leituras) foram normalizados usando o pacote 'Bioconductor DESeq2'. As contagens normalizadas DESeq2 foram utilizadas para determinar a diversidade beta, NMDS, PERMANOVA, índice de diversidade alfa e abundância relativa (LOVE et al., 2014). ANOVA *one way* (ambiente R) foi usado para identificar as diferenças nos índices de diversidade alfa de cada tratamento. A análise multivariada foi realizada com base nas matrizes de dissimilaridade de Bray-Curtis, utilizando o pacote 'vegan' (OKSANEN et al., 2019). Modelos Lineares Univariados Generalizados (GLMs; pacote 'mvabund') foram usados para identificar OTUs alterados pela suplementação de VILIGEN™ em dietas. As figuras foram geradas usando o pacote 'ggplot2' (WICKHAM, 2016). Os dados da atividade das enzimas digestivas foram submetidos à análise de regressão no *software* GraphPad Prism 6. O nível de significância adotado foi de 5,0% para todos os testes.

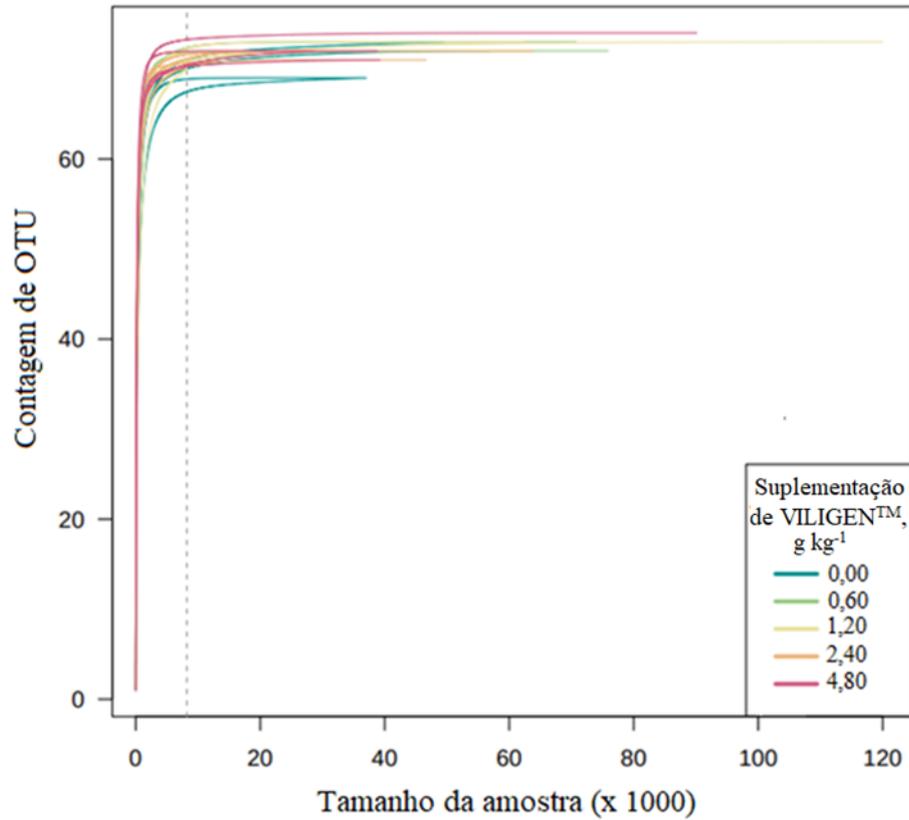
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 MICROBIOMA INTESTINAL

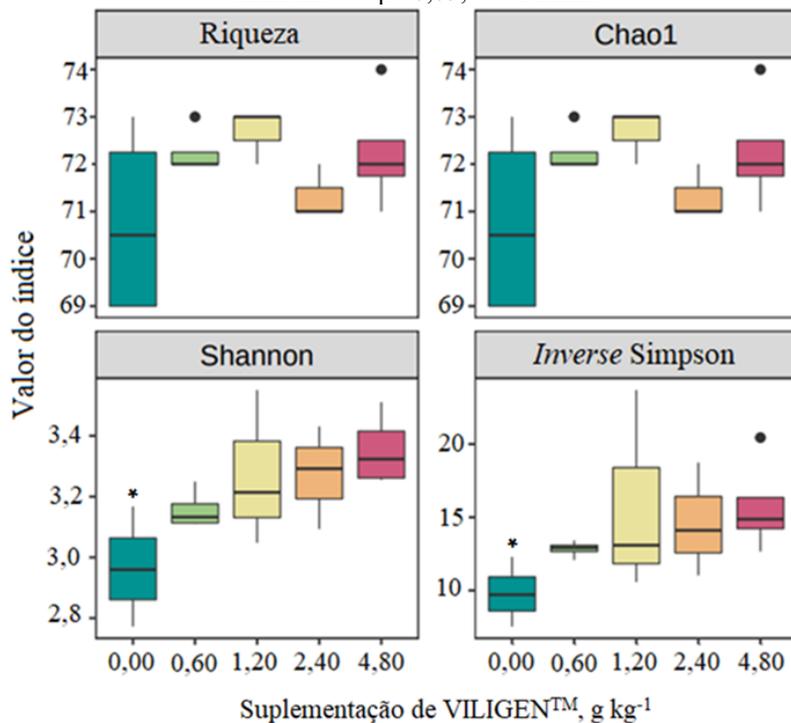
O sequenciamento da microbiota intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo produziu um total de 1.003.306 sequências, as quais foram agrupadas em 74 unidades taxonômicas operacionais (OTU). A curva de rarefação e o índice de cobertura indicaram uma cobertura quase completa da comunidade bacteriana da digesta no intestino (mín = 99,97 e máx = 100,00), pois não há adição de novas espécies após pouco menos de 10.000 sequências por amostra (Figura 1).

A inclusão de VILIGEN™ nas dietas promoveu uma mudança nas comunidades bacterianas intestinais de juvenis de tilápia-do-nilo. Os índices de diversidade alfa, Shannon e Inverse Simpson, indicaram que a diversidade aumentou significativamente com a inclusão de VILIGEN™ nas dietas ( $P < 0,05$ ). No entanto, a riqueza (Riqueza e Chao1) não foi afetada pela inclusão de VILIGEN™ (Figura 2). Além disso, a análise da diversidade beta baseada na distância de Bray-Curtis demonstrou que os peixes alimentados com níveis de inclusão de 0,60 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> apresentaram perfis de comunidade bacteriana intestinal distintos entre si e em comparação com os peixes do grupo controle ( $P < 0,05$ ). Não houve outras diferenças de tratamento no perfil da comunidade bacteriana intestinal (Figura 3).

**Figura 1.** Curva de rarefação da microbiota intestinal em juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> de VILIGEN<sup>TM</sup> e dieta controle sem suplementação



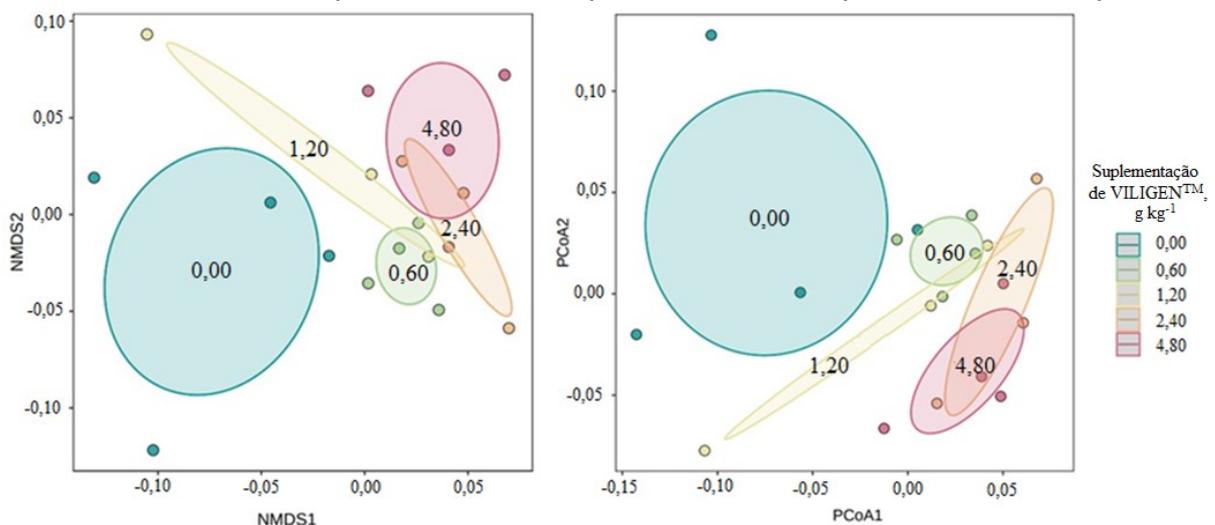
**Figura 2.** Índices de riqueza microbiana (Riqueza e Chao1) e diversidade (Shannon e *Inverse Simpson*) em juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> de VILIGEN<sup>TM</sup> e uma dieta controle sem suplementação. O asterisco indica diferenças estatísticas quando comparado ao grupo controle. \* = p < 0,05; ● = outlier.



O filo mais abundante no intestino da tilápia foi Actinobacteria, que variou de 35,99% em peixes alimentados com a dieta controle a 38,80 - 42,98% em peixes alimentados com dietas contendo VILIGEN™. Proteobacteria foi o segundo filo mais abundante e apresentou o mesmo padrão de comportamento de Actinobacteria, variando de 24,69% nos peixes alimentados com a dieta controle a 27,47 - 32,21% nos tratamentos alimentados com VILIGEN™. Por outro lado, o terceiro mais abundante, Fusobacteria, apresentou 21,59% de abundância relativa nos peixes alimentados com a dieta controle, enquanto nos peixes alimentados com dietas contendo VILIGEN™ variou de 3,87 a 9,80%. Os outros filios encontrados no intestino das tilápias neste estudo foram: Patescibacteria, Chlorofexi, Chlamydiae, Firmicutes, Dependientiae e Planctomycetes (Figura 4A).

As principais famílias microbianas dominantes na digesta de tilápia do Nilo do presente estudo foram Legionellaceae, Mycobacteriaceae, Micbacteriaceae e Fusobacteriaceae, respectivamente. A abundância relativa de Legionellaceae aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ) com a inclusão de VILIGEN™ na dieta (Figura 4B).

**Figura 3.** Composição da comunidade bacteriana intestinal em juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> de VILIGEN™ e uma dieta controle sem suplementação. A escala multidimensional não métrica (NMDS, do inglês *non-metric multidimensional scale*) e os gráficos de análise de coordenadas principais (PCoA, do inglês *principal coordinates analysis*) são baseados na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis e incorporam a abundância de todas as 1.003.306 seqüências (agrupadas em 74 OTUs) no conjunto de dados. Cada ponto corresponde a uma amostra e as elipses definem os intervalos de confiança de 95% para cada grupo. Valor de estresse NMDS = 0,137; PCoA1 = 0,0354 e PCoA2 = 0,0199; PERMANOVA: 0,00 vs 0,60 p = 0,026; 0,00 vs 1,20 p = 0,495; 0,00 vs 2,40 p = 0,067; 0,00 vs 4,80 p = 0,031.



Os gêneros bacterianos encontrados no intestino de tilápia alimentada com as dietas experimentais são mostrados na Figura 4C. O principal gênero bacteriano encontrado no intestino dos peixes de todos os tratamentos foi *Legionella*. Os peixes alimentados com

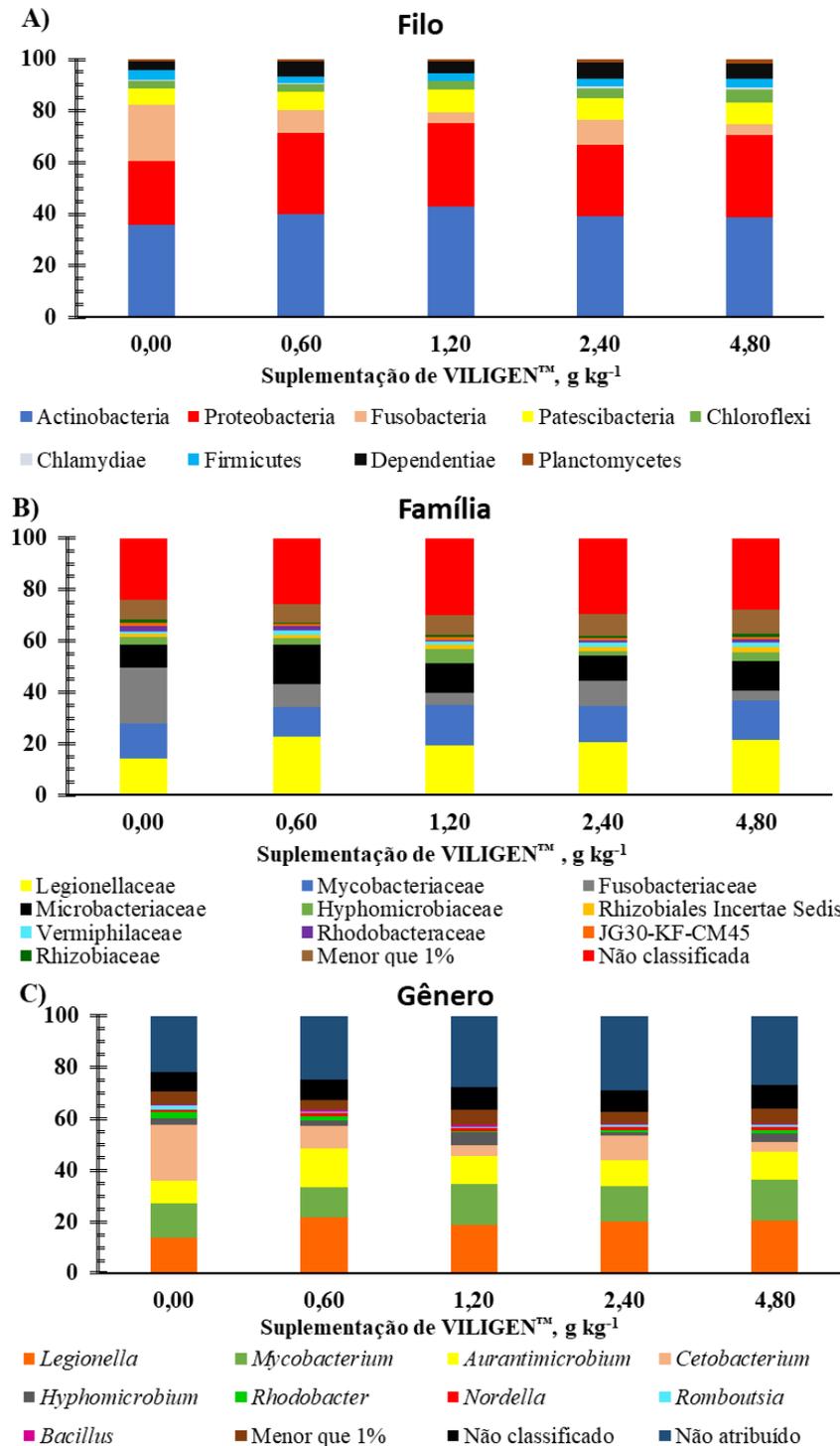
VILIGEN™ apresentaram aumento ( $P < 0,05$ ) na abundância relativa desse gênero bacteriano, variando de 18,71 a 21,87%, quando comparados aos peixes alimentados com a dieta controle (13,62%). *Aquisphaera* e *Gordonibacter* também foram mais abundantes em peixes alimentados com VILIGEN™ do que o grupo controle ( $P < 0,05$ ). Destaca-se que mais de 20% das bactérias presentes no intestino de tilápias-do-nilo não puderam ser classificadas ou atribuídas, independentemente dos tratamentos avaliados (Figura 4C).

A análise univariada complementar usando modelos lineares generalizados (pacote R 'mvabund') revelou oito OTUs cuja abundância foi significativamente afetada pela suplementação com VILIGEN™, seis deles foram maiores em peixes alimentados com todos os níveis do aditivo: OTU 13 (Phylum: Proteobacteria, Família: Não classificado, Gênero: Não atribuído); 28 (Patescibacteria, Não classificado, Não atribuído); 29 (Proteobacteria, Legionellaceae, *Legionella*); 30 (Planctomycetes, Isosphaeraceae, *Aquisphaera*); 51 (Actinobacteria, Eggerthellaceae, *Gordonibacter*) e 67 (Planctomycetes, Gemmataceae, Não classificado). Enquanto isso, OTUs 46 (Proteobacteria, Beijerinckiaceae, Unclassified) e 63 (Proteobacteria, Rhizobiales Incertae Sedis, *Phreatobacter*) foram maiores apenas em peixes alimentados com 1,20 g kg<sup>-1</sup> de VILIGEN™. Análises taxonômicas e agrupamento de mapas de calor mostram os padrões de distribuição dos táxons de bactérias de tilápia quando alimentados com as diferentes dietas experimentais (Figura 5).

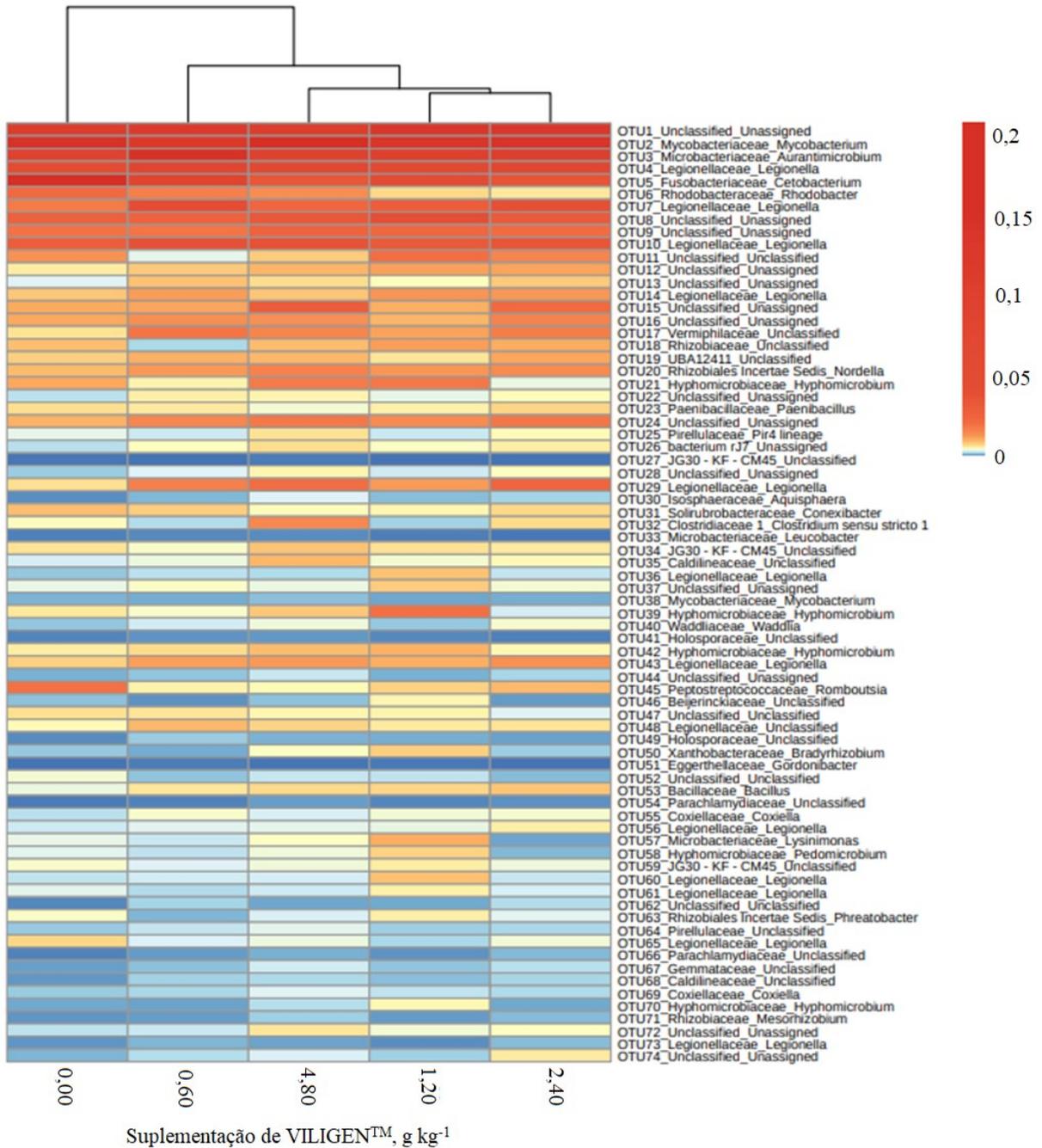
### 3.2 ENZIMAS DIGESTIVAS

Houve efeito quadrático para a atividade específica da lipase apenas na porção proximal do intestino (Tabela 2), onde a menor atividade foi estimada no nível de inclusão de 2,50 g kg<sup>-1</sup> do aditivo. Para a porção medial, houve efeito quadrático para a atividade específica da tripsina, onde a maior atividade foi estimada em 2,50 g kg<sup>-1</sup> de inclusão de VILIGEN™. Não houve diferenças para as demais enzimas digestivas, independentemente da porção intestinal (Tabela 2).

**Figura 4.** A abundância relativa dos filos (A), famílias (B) e gêneros bacterianos (C) mais dominantes no intestino de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> de VILIGEN™ e dieta controle sem suplementação.



**Figura 5.** Representação gráfica (mapa de calor) das 74 OTUs identificadas no microbioma intestinal de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo 0,60 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> de VILIGENT<sup>TM</sup> e uma dieta controle sem suplementação. A cor vermelha escura representa maior abundância, enquanto a cor azul escura representa menos abundância.



**Tabela 2.** Valores médios de atividade específica de enzimas digestivas nas regiões proximal, medial e distal do intestino de juvenis de tilápia-do-nylo, após 60 dias de alimentação com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™. Valores expressos em U mg de proteína<sup>-1</sup>.

Região intestinal/ Atividade enzimática	Suplementação de VILIGEN™, g kg <sup>-1</sup>					Pooled SEM	Valor de P da regressão
	0,00	0,60	1,20	2,40	4,80		
<b>Proximal</b>							
Tripsina	0,045	0,051	0,041	0,054	0,061	0,023	0,89
Quimotripsina	0,900	0,823	0,893	0,760	0,944	0,410	0,61
Amilase	2,672	2,683	2,761	1,934	2,690	0,750	0,35
Lipase	1,181	0,998	0,539	0,451	0,997	0,350	0,01 <sup>1</sup>
<b>Medial</b>							
Tripsina	0,039	0,046	0,072	0,083	0,047	0,028	0,04 <sup>2</sup>
Quimotripsina	0,921	1,095	1,205	1,164	1,085	0,240	0,23
Amilase	2,849	2,681	4,413	3,111	3,113	1,080	0,37
Lipase	1,623	1,561	1,988	1,775	0,752	0,730	0,18
<b>Distal</b>							
Tripsina	0,028	0,027	0,014	0,028	0,015	0,012	0,97
Quimotripsina	0,199	0,396	0,448	0,513	0,498	0,190	0,15
Amilase	2,717	3,394	2,598	3,653	2,202	1,290	0,35
Lipase	0,449	0,554	0,603	1,016	1,868	0,390	0,50

<sup>1</sup> Regressão polinomial:  $y = 11,932x^2 - 6,1746x + 1,2148$ ;  $R^2 = 0,93$ .

<sup>2</sup> Regressão polinomial:  $y = -0,6954x^2 + 0,3599x + 0,0355$ ;  $R^2 = 0,92$ .

#### 4 DISCUSSÃO

Recentemente, o sequenciamento de alto rendimento dos amplicons do gene 16S rRNA tem sido usado para explorar a diversidade e composição do microbioma intestinal em várias espécies de peixes, incluindo espécies de interesse comercial, como a tilápia-do-nylo (TARNECKI et al., 2017). As pesquisas são direcionadas para a modulação da microbiota intestinal, dada a sua grande importância na saúde dos peixes. Uma forma de modular a microbiota intestinal é adicionando-se aditivos nas rações. De fato, os resultados do presente estudo indicam que o uso combinado de butirato de sódio, levedura hidrolisada desidratada e proteinato de zinco afetam a diversidade e o perfil do microbioma intestinal da tilápia, especialmente quando alimentada com dieta suplementada com 0,60 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> de

VILIGEN™. Este é o primeiro estudo avaliando o efeito da suplementação de VILIGEN™ na comunidade bacteriana do intestino em peixes, sendo que os resultados fornecem uma melhor compreensão do efeito desse aditivo na diversidade e composição da microbiota intestinal da tilápia-do-nilo.

A adição de levedura fermentada em dietas para carpa capim, *Ctenopharyngodon idellus*, alterou a diversidade beta da comunidade bacteriana intestinal, quando comparados aos peixes alimentados com dietas sem levedura (LIU et al., 2018). Os resultados com a tilápia-do-nilo confirmam tais achados, uma vez que a análise de Bray-Curtis demonstrou uma separação nos perfis das comunidades bacterianas intestinais nos níveis de inclusão de 0,60 e 4,80 g kg<sup>-1</sup>, que apresentaram perfis diferentes dos demais tratamentos. Além disso, todos os níveis de inclusão do aditivo também promoveram as maiores taxas de diversidade (Shannon e Inverse Simpson) na comunidade microbiana de tilápia-do-nilo.

Actinobacteria, Proteobacteria e Fusobacteriam foram os filos mais dominantes no trato digestivo da tilápia-do-nilo, respectivamente. Anteriormente, tilápias alimentadas com dietas suplementadas com leveduras inativas ou vivas também apresentaram o filo Proteobacteria e Fusobacteria entre os mais abundantes (RAN et al., 2015). No entanto, os autores identificaram o filo Bacteroidetes como um dos mais abundantes, o que não foi encontrado no intestino da tilápia no presente estudo. Essa condição também foi verificada em carpas alimentadas com dietas contendo levedura fermentada: aumento na abundância relativa do filo Actinobacteria, bem como redução do filo Fusobacteria (LIU et al., 2018), que também apresentou baixa abundância no presente estudo nos peixes alimentados com as dietas contendo VILIGEN.

Outro fator que pode ter contribuído para o aumento dos filos Proteobacteria e Actinobacteria pode estar relacionado à presença de butirato de sódio no VILIGEN™, uma vez que tal achado também foi relatado em “turbot”, *Scophthalmus maximus*, quando alimentado com dietas contendo 0,02 g kg<sup>-1</sup> de butirato de sódio (LIU et al., 2019). Provavelmente ambos, butirato de sódio e levedura, favorecem o crescimento de bactérias de tais filos, uma vez que estudos anteriores que avaliaram a suplementação desses compostos isoladamente (LIU et al., 2019; LIU et al., 2018; RAN et al., 2015) ou em combinação, como no presente estudo, também registraram maior abundância relativa de Proteobacteria e Actinobacteria. Os resultados positivos quanto à modulação do microbioma intestinal com butirato de sódio podem estar ligados à sua capacidade acidificante (LUCKSTADT, 2008), reduzindo o pH intestinal e inibindo o crescimento excessivo de bactérias patogênicas, o que acaba favorecendo o crescimento de bactérias benéficas (HOSEINIFAR et al., 2016). A levedura hidrolisada, por

sua vez, é rica em  $\beta$ -glucanos, mananoligossacarídeos e nucleotídeos, que favorecem o sistema imunológico dos peixes (SONG et al., 2014), modulando a saúde intestinal e o microbioma (SAKAI et al., 2001; GIL, 2002, SONG et al., 2014; AKTER et al., 2016; JAYACHANDRAN et al., 2018; CARBALLO et al., 2019), bem como o desenvolvimento e as funcionalidades do intestino (HAHOR et al., 2019; TIE et al., 2019).

Dentro do filo Actinobacteria encontram-se os gêneros *Collinsella*, *Bifidobacterium* (considerada uma bactéria probiótica) (TREMAROLI; BÄCKHED, 2012), *Actinomyces* (degradadores de celulose) (YE et al., 2013), e *Aurantimicrobium*, que foi recentemente descrito e sequenciado (NAKAI et al., 2016; NAKAI et al., 2015). Este último foi um dos gêneros mais abundante do filo Actinobacteria no presente estudo. As bactérias desse filo são conhecidas por serem bactérias quimiorganotróficas obrigatórias, que prosperam em ambientes com disponibilidade de compostos orgânicos, além de produzir uma variedade de compostos bioativos importantes na indústria farmacêutica e de rações, como enzimas, antibióticos, compostos anti-inflamatórios e inibidores de enzimas (SHIVLATA; SATYANARAYANA, 2015). Assim, é possível sugerir que os compostos presentes no VILIGEN™ promoveram o crescimento de bactérias deste filo, principalmente as do gênero *Aurantimicrobium*, por serem mais abundantes em peixes que receberam o aditivo na dieta, exceto naqueles alimentados com 4,80 g kg<sup>-1</sup> de aditivo.

Por outro lado, todos os níveis de inclusão de VILIGEN™ apresentaram diminuição, embora não significativa, na abundância do gênero *Cetobacterium* (OTU 5), único representante do filo Fusobacteria. Esta diminuição foi consequência do aumento geral da abundância relativa dos filios Actinobacteria, Proteobacteria, Planctomycetes e Patescibacteria. Bactérias do filo Fusobacteria, especialmente aquelas do gênero *Cetobacterium*, estão entre as mais abundantes em peixes de água doce, como relatado na carpa cruciana japonesa *Carassius cuvieri*, carpa capim *Ctenopharyngodon idella*, carpa-cabeçuda, *Hypophthalmichthys nobilis* (LI et al., 2014), bagre-do-canal *Ictalurus punctatus*, “bluegill” *Lepomis macrochirus* (LARSEN et al., 2014) jundiá *Rhamdia quelen* (PEREIRA et al., 2020) e tilápia-do-nilo (TSUCHIYA et al., 2007). Este grupo é nativo do intestino dos peixes de água doce e está ligado à produção de vitamina B<sub>12</sub> (SUGITA et al., 1991a, b). Embora *Cetobacterium* tenha mostrado menor abundância relativa geral em peixes alimentados com todos os níveis de VILIGEN™, ainda é a quarta bactéria mais abundante no intestino desses animais, portanto, ainda desempenha um papel importante na microbiota intestinal.

Houve um aumento na abundância da bactéria *Legionella* (Proteobacteria) em peixes alimentados com VILIGEN™. Este gênero compreende mais de 50 espécies, algumas das quais

estão associadas a doenças humanas (BURSTEIN et al., 2016). No entanto, as bactérias do filo Proteobacteria, incluindo o gênero *Legionella*, estão intimamente relacionadas aos ciclos de nitrogênio e fósforo (KEEN; HOFFMAN, 1984; KLOOS et al., 1995). Li et al. (2019) relataram que o uso de substratos artificiais no sistema de criação da carpa-capim aumentou a abundância de bactérias do filo Proteobacteria, envolvidas no ciclo do fósforo e do nitrogênio, como *Legionella*, *Hyphomicrobium*, *Chitinimonas*, *Roseiflexus* e *Planktothrix*. Além disso, os autores relataram melhora no crescimento e conversão alimentar da carpa, mesmo após um aumento na densidade de estocagem de peixes. Bactérias do gênero *Legionella* podem produzir a enzima lipase (ARSLAN-AYDOĞDU; KIMIRAN, 2018; BAINE, 1985), algumas com capacidade de produção intracelular e extracelular (ARAGON et al., 2000). Assim, especula-se que a diminuição da lipase na porção proximal do intestino dos juvenis alimentados com o aditivo alimentar pode estar ligada ao aumento da produção de lipase pela bactéria *Legionella*, a qual apresentou maior abundância relativa nos peixes alimentados com VILIGEN™ e foi o gênero de bactéria mais abundante nos peixes alimentados com o aditivo alimentar, diminuindo assim a necessidade da produção de lipase endógena. No entanto, o efeito do aumento da abundância relativa de bactérias desse gênero na fisiologia e no microbioma intestinal dos peixes não é claro e sugere-se mais investigações, uma vez que, como mencionado acima, algumas espécies de *Legionella* são patogênicas ao homem.

Podem haver uma relação entre o nível de enzimas proteases e carboidrases no intestino e a abundância do gênero *Aquisphaera*, uma vez que este gênero foi encontrado no intestino de tilápia-do-nilo alimentada com dietas contendo proteases exógenas e carboidratos, enquanto sua presença não foi observada em peixes alimentados com dieta controle ou dieta com adição de fitase (ADEOYE et al., 2016). No presente estudo, houve um aumento significativo da tripsina na porção medial do intestino e, em paralelo, na abundância relativa de *Aquisphaera* em tilápia-do-nilo alimentada com VILIGEN™, o que corrobora os achados de Adeoye et al. (2016). De fato, a bactéria *Aquisphaera* demonstrou atividade de tripsina em meio de cultura (BONDOSO et al., 2011), o que poderia explicar a maior atividade de tripsina em peixes alimentados com dietas suplementadas com VILIGEN™. Este aumento na atividade da tripsina pode ter favorecido o maior crescimento relatado anteriormente em peixes alimentados com VILIGEN™ (PESSINI et al., 2021), mas seria importante realizar uma avaliação da suplementação dietética de VILIGEN™ na digestibilidade de nutrientes, enzimas digestivas e microbioma intestinal para confirmar tal hipótese. Além disso, não está clara a relação das bactérias do gênero *Aquisphaera* com a homeostase do microbioma intestinal em peixes. O conhecimento sobre esse gênero, que só foi descrito em 2011, é limitado, sendo isolado de um

aquário de água doce contendo peixes da espécie *Pseudotropheus lombardoi* e a planta ornamental *Anubias barteri* (BONDOSO et al., 2011). Assim, mais estudos são necessários para verificar a atividade de bactérias desse gênero no microbioma intestinal e sua contribuição no processo de digestão em tilápia-do-nylo.

O gênero *Bacillus* também pode ter contribuído para o aumento da atividade da tripsina na porção medial do intestino, uma vez que sua abundância foi aumentada em peixes alimentados com VILIGENT™. Ainda, está bem documentado que este gênero de bactéria é uma fonte importante de enzimas microbianas (RAY et al., 2012) com ação probiótica, que atuam inibindo o crescimento de bactérias patogênicas e secretando enzimas que auxiliam na digestão e, conseqüentemente, melhoram a absorção de nutrientes no intestino (PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2014). Um estudo *in vitro* evidenciou que as bactérias *Bacillus circulans*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus cereus* isoladas de carpa rohu *Labeo rohita*, são produtoras de enzimas proteolíticas (GHOSH et al., 2002). Assim, sugere-se que o aumento da atividade da tripsina na porção medial do intestino da tilápia pode estar relacionado a sua produção exógena pelas bactérias *Bacillus* e *Aquasphaera*, que apresentaram maior abundância nos peixes alimentados com dietas contendo VILIGE™.

O efeito benéfico do uso de minerais orgânicos em dietas para peixes foi evidenciado pela melhora no desempenho e proliferação de células do sistema imunológico (IBS; RINK, 2003; APINES-AMAR et al., 2004; RINK; HAASE, 2007; LIN et al., 2013). No entanto, há conhecimento limitado sobre a influência da suplementação dietética de zinco na microbiota intestinal utilizando-se a técnica de sequenciamento de 16 rRNA. Com o emprego de outras técnicas, parece haver uma relação clara entre altas doses de zinco na dieta e um aumento na abundância de enterobactérias (Proteobacteria) e uma diminuição em *Lactobacillus* (Firmicutes) no intestino de leitões desmamados (HØJBERG et al., 2005; BROOM et al., 2006). Este fato pode explicar a baixa abundância do filo Firmicutes, bem como o aumento de bactérias do filo Proteobacteria no presente estudo. No entanto, vale ressaltar que níveis a partir de 334 mg kg<sup>-1</sup> de zinco nas dietas são prejudiciais à tilápia, reduzindo o crescimento e a absorção de ferro, cálcio e magnésio (HUANG et al., 2015) e, no presente estudo, o zinco variou de 140 mg.kg<sup>-1</sup> na dieta controle a 191 mg.kg<sup>-1</sup> na dieta com maior inclusão de VILIGENT™.

Usando a técnica de sequenciamento de alto rendimento em frangos alimentados com dietas contendo fontes orgânicas (proteinato de zinco) ou inorgânicas (ZnSO<sub>4</sub>) de zinco, foram relatadas maior abundância de bactérias do filo Proteobacteria e diminuição de bactérias do gênero *Lactobacillus* (Firmicutes) em aves alimentadas com proteinato de zinco (BORTOLUZZI et al., 2019). Tal efeito não foi evidente em aves alimentadas com uma fonte

inorgânica, sugerindo que a fonte de zinco afeta o microbioma intestinal (BORTOLUZZI et al., 2019). No entanto, especula-se que este efeito do zinco contra *Lactobacillus* não se aplica a todas as espécies do gênero, mas a algumas específicas, uma vez que apenas a abundância de *Lactobacillus amylovorus* diminuiu, enquanto outras espécies não foram afetadas nos leitões desmamados (STARKE et al., 2013).

As descobertas do presente estudo sugerem que o aditivo pode ser eficaz na modulação do microbioma intestinal e na diminuição da suscetibilidade a infecções causadas por bactérias patogênicas. No entanto, o porquê de apenas as doses extremas testadas foram capazes de modular a microbiota intestinal, permanece obscuro.

## 5 CONCLUSÃO

Este estudo descreve pela primeira vez uma análise de alto rendimento da diversidade do microbioma intestinal de tilápia-do-nilo, quando alimentada com dietas suplementadas com VILIGEN™, demonstrando efeitos benéficos do aditivo na modulação da comunidade bacteriana intestinal. A suplementação do aditivo alimentar foi eficaz para aumentar a diversidade alfa e beta de espécies bacterianas no intestino de tilápia-do-nilo, o que pode indicar menor suscetibilidade à disbiose microbiana. Além disso, os peixes alimentados com VILIGEN™ mostraram maior atividade da tripsina, que pode estar ligada à produção exógena por bactérias presentes no trato intestinal.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil, Código Financeiro 001), que concedeu bolsas para o primeiro, segundo e terceiro autores. Os autores também agradecem ao CNPq, Brasil, pela bolsa concedida a última autora. Agradecemos às empresas Alltech Inc. (Nicholasville, KY, EUA) pelo apoio financeiro neste estudo e Cargill (Toledo, Brasil), Nicoluzzi Rações Ltda (Penha, Brasil) e Kabsa Exportadora SA (Porto Alegre, Brasil) pela doação ingredientes para a fabricação das dietas experimentais.

## REFERÊNCIAS

- ADEOYE, A.A. et al. Supplementation of formulated diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) with selected exogenous enzymes: overall performance and effects on intestinal histology and microbiota. **Animal Feed Science And Technology**, v. 215, p. 133-143, maio 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.002>.
- AKTER, M.N. et al. Dietary supplementation with mannan oligosaccharide influences growth, digestive enzymes, gut morphology, and microbiota in juvenile striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. **Aquaculture International**, v. 24, n. 1, p. 127-144, 28 abr. 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-015-9913-8>.
- ARSLAN-AYDOĞDU, E.Ö.; KIMIRAN, A. An investigation of virulence factors of *Legionella pneumophila* environmental isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 189-199, jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.03.012>.
- APINES-AMAR, M.J.S. et al. Amino acid-chelate: a better source of Zn, Mn and Cu for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 240, n. 1-4, p. 345-358, out. 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.032>.
- ARAGON, V. et al. Secreted Enzymatic Activities of Wild-Type and pilD -Deficient *Legionella pneumophila*. **Infection And Immunity**, v. 68, n. 4, p. 1855-1863, abr. 2000. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.68.4.1855-1863.2000>.
- BAINE, W.B. Cytolytic and Phospholipase C Activity in *Legionella* Species. **Microbiology**, v. 131, n. 6, p. 1383-1391, 1 jun. 1985. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-131-6-1383>.
- BARUAH, K. et al. Dietary microbial phytase and citric acid synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. **Aquaculture Research**, p. 070116074017002, 16 jan. 2007. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01624.x>.
- BIRKBECK, T.H.; RINGØ, E. Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. **Microbial Ecology In Growing Animals**, p. 208-234, 2005. [http://dx.doi.org/10.1016/s1877-1823\(09\)70043-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1877-1823(09)70043-8).
- BONDOSO, J. et al. *Aquisphaera giovannonii* gen. nov., sp. nov., a planctomycete isolated from a freshwater aquarium. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 2844-2850, 1 dez. 2011. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.027474-0>.
- BOOTH, I.R.; STRATFORD, M. Acidulants and low pH. **Food Preservatives**, p. 25-47, 2003. Springer US. [http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9_3).
- BORTOLUZZI, C. et al. Can dietary zinc diminish the impact of necrotic enteritis on growth performance of broiler chickens by modulating the intestinal immune-system and microbiota? **Poultry Science**, v. 98, n. 8, p. 3181-3193, ago. 2019. BV. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez045>.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, maio 1976. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- BROOM, L.J. et al. Effects of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. **Research In Veterinary Science**, v. 80, n. 1, p. 45-54, fev. 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.04.004>.
- BURSTEIN, D. et al. Genomic analysis of 38 *Legionella* species identifies large and diverse effector repertoires. **Nature Genetics**, v. 48, n. 2, p. 167-175, 11 jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3481>.
- CARBALLO, C. et al. Yeast  $\beta$ -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 92, p. 31-39, set. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.044>.
- CELI, P. et al. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science And Technology**, v. 234, p. 88-100, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.09.012>.
- EL-SAYED, A.F.M; KAWANNA, M. Optimum water temperature boosts the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in a recycling system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 6, p. 670-672, 2008. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01915.x>.
- EL-SHERIF, M.S.; EL-FEKY, A.M.I. Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fingerlings. I. Effect of pH. **International Journal Of Agriculture & Biology**, v. 11, n. 3, p. 297-300, 2009.
- FENG, L. et al. Dietary phenylalanine-improved intestinal barrier health in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is associated with increased immune status and regulated gene expression of cytokines, tight junction proteins, antioxidant enzymes and related signalling molecules. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 495-509, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.001>.
- FURUYA, W.M. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Toledo: GFM, 2010. 100 p.
- GIL, A. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. **European Journal Of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 3, p. S1-S4, 30 jul. 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601475>.
- GHANBARI, M.; KNEIFEL, W.; DOMIG, K.J. A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. **Aquaculture**, v. 448, p. 464-475, nov. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>.

GHOSH, K.; SEN, S.K.; RAY, A.K. Characterization of Bacilli Isolated from the Gut of Rohu, *Labeo rohita*, Fingerlings and Its Significance in Digestion. **Journal Of Applied Aquaculture**, v. 12, n. 3, p. 33-42, jun. 2002. [http://dx.doi.org/10.1300/j028v12n03\\_04](http://dx.doi.org/10.1300/j028v12n03_04).

HAHOR, W.; THONGPRAJUKAEW, K.; SUANYUK, N. Effects of dietary supplementation of oligosaccharides on growth performance, gut health and immune response of hybrid catfish (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*). **Aquaculture**, v. 507, p. 97-107, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.010>.

HOSEINIFAR, S.H.; SUN, Y.Z.; CAIPANG, C.M. Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated view. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 4, p. 1380-1391, 30 nov. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/are.13239>.

HUANG, F. et al. Dietary zinc requirement of adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed semi-purified diets, and effects on tissue mineral composition and antioxidant responses. **Aquaculture**, v. 439, p. 53-59, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.018>.

HØJBERG, O. et al. Influence of Dietary Zinc Oxide and Copper Sulfate on the Gastrointestinal Ecosystem in Newly Weaned Piglets. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2267-2277, maio 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.5.2267-2277.2005>.

IBS, K.; RINK, L. Zinc-Altered Immune function. **The Journal Of Nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1452-1456, 1 maio 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jn/133.5.1452s>.

JAYACHANDRAN, M. et al. A critical review on the impacts of  $\beta$ -glucans on gut microbiota and human health. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, v. 61, p. 101-110, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.06.010>.

KEEN, M.G.; HOFFMAN, P.S. Metabolic pathways and nitrogen metabolism in *Legionella pneumophila*. **Current Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 81-88, mar. 1984. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01567708>.

KLOOS, K et al. DNA-probing indicates the occurrence of denitrification and nitrogen fixation genes in *Hyphomicrobium*. Distribution of denitrifying and nitrogen fixing isolates of *Hyphomicrobium* in a sewage treatment plant. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 18, n. 3, p. 205-213, 1995. [https://doi.org/10.1016/0168-6496\(95\)00060-2](https://doi.org/10.1016/0168-6496(95)00060-2)

LARSEN, A.M.; MOHAMMED, H.H.; ARIAS, C.R. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 116, n. 6, p. 1396-1404, 11 mar. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12475>.

- LI, T. et al. Comparative Analysis of the Intestinal Bacterial Communities in Different Species of Carp by Pyrosequencing. **Microbial Ecology**, v. 69, n. 1, p. 25-36, 22 ago. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-014-0480-8>.
- LI, Z. et al. Artificial substrata increase pond farming density of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by increasing the bacteria that participate in nitrogen and phosphorus cycles in pond water. *PeerJ*, v. 7, p. 7906, 14 out. 2019. *PeerJ*. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.7906>.
- LIN, S. et al. Comparison of chelated zinc and zinc sulfate as zinc sources for growth and immune response of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 406-407, p. 79-84, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.04.026>.
- LIU, H. et al. Yeast culture dietary supplementation modulates gut microbiota, growth and biochemical parameters of grass carp. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 551-565, 26 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.13261>.
- LIU, Y. et al. Sodium butyrate supplementation in high-soybean meal diets for turbot (*Scophthalmus maximus* L.): effects on inflammatory status, mucosal barriers and microbiota in the intestine. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 88, p. 65-75, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.064>.
- LOVE, M.I. et al. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, dez. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- LÜCKSTÄDT, C. The use of acidifiers in fish nutrition. **Cab Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 3, n. 044, p. 1-8, 1 abr. 2008. CABI Publishing. <http://dx.doi.org/10.1079/pavsmnr20083044>.
- MOORE, D. D.; DOWHAN, D. Special Protocols for DNA Isolation. In: AUSUBEL, FREDERICK et al. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 1. John Wiley and Sons Inc., 2000.
- NAKAI, R. et al. *Aurantimicrobium minutum* gen. nov., sp. nov., a novel ultramicrobacterium of the family Microbacteriaceae, isolated from river water. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4072-4079, 1 nov. 2015. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.000541>.
- NAKAI, R. et al. Complete Genome Sequence of *Aurantimicrobium minutum* Type Strain KNC T, a Planktonic Ultramicrobacterium Isolated from River Water. **Genome Announcements**, v. 4, n. 3, p. 1, 30 jun. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/genomea.00616-16>.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington, D.C.: National Academy Press, 2011.

OKSANEN, J. et al. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.4-3. **Vienna: R Foundation for Statistical Computing**. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>. 2019

PEREIRA, S.A. et al. The Chelating Mineral on Organic Acid Salts Modulates the Dynamics and Richness of the Intestinal Microbiota of a Silver Catfish *Rhamdia quelen*. **Current Microbiology**, v. 77, n. 8, p. 1483-1495, 31 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-020-01962-z>.

PESSINI, J.E. et al. Dietary supplementation of Viligen™ to Nile tilapia improves growth and gut morphology. **Aquaculture Nutrition**, p. 1, 30 mar. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/anu.13247>.

PÉREZ-SÁNCHEZ, T. et al. Probiotics in aquaculture: a current assessment. **Reviews In Aquaculture**, v. 6, n. 3, p. 133-146, 14 maio 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12033>.

RAN, C. et al. A Comparison of the Beneficial Effects of Live and Heat-Inactivated Baker's Yeast on Nile Tilapia: suggestions on the role and function of the secretory metabolites released from the yeast. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. 0145448, 22 dez. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0145448>.

RAY, A.K.; GHOSH, K.; RINGØ, E. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 465-492, 20 abr. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00943.x>.

RINGØ, E. et al. Prebiotics in aquaculture: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 117-136, abr. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x>.

RINGØ, E. et al. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 219-282, 7 nov. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/anu.12346>.

RINK, L.; HAASE, H. Zinc homeostasis and immunity. **Trends In Immunology**, v. 28, n. 1, p. 1-4, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2006.11.005>.

ROBLES, R. et al. Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). **Fish Physiology And Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1567-1580, 5 jun. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-013-9809-3>.

ROESELERS, G. et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. **The ISME Journal**, v. 5, n. 10, p. 1595-1608, 7 abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.38>.

Sakai, M. et al. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 24, n. 8, p. 433-438, 2001.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00314.x>

SHIVLATA, L.; SATYANARAYANA, T. Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential applications. **Frontiers In Microbiology**, v. 6, 25 set. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01014>.

SHURSON, G.C. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. **Animal Feed Science And Technology**, v. 235, p. 60-76, jan. 2018. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010>.

SONG, S. K. et al. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 40, n. 1, p. 40-48, set. 2014. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.016>.

STARKE, I.C. et al. The impact of high dietary zinc oxide on the development of the intestinal microbiota in weaned piglets. **Fems Microbiology Ecology**, v. 87, n. 2, p. 416-427, 23 out. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12233>.  
 SUGITA, H.; MIYAJIMA, C.; DEGUCHI, Y. The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. **Aquaculture**, v. 92, p. 267-276, jan. 1991a. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90028-6](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(91)90028-6).

SUGITA, H. et al. Vitamin B12-Producing Ability of the Intestinal Microflora of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Agricultural And Biological Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 893-894, mar. 1991. Oxford University Press (OUP).  
<http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1991.10870683>.

SULLAM, K.E. et al. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 13, p. 3363-3378, 4 abr. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.2012.05552.x>.

TARNECKI, A.M. et al. Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 123, n. 1, p. 2-17, 10 maio 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13415>.

TIE, H. et al. Dietary nucleotides supplementation affect the physicochemical properties, amino acid and fatty acid constituents, apoptosis and antioxidant mechanisms in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) muscle. **Aquaculture**, v. 502, p. 312-325, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.045>.

TRAN-DUY, A. et al. Effects of oxygen concentration and body weight on maximum feed intake, growth and hematological parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 275, n. 1-4, p. 152-162, mar. 2008. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.024>.

TRAN-NGOC, K.T. et al. Interaction between dissolved oxygen concentration and diet composition on growth, digestibility and intestinal health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 462, p. 101-108, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.005>.

TREMAROLI, V.; BÄCKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 242-249, set. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11552>.

TSUCHIYA, C.; SAKATA, T.; SUGITA, H. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. **Letters In Applied Microbiology**, p. 43-48, 17 out. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2007.02258.x>.

YE, L. et al. Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish. **The Isme Journal**, v. 8, n. 3, p. 541-551, 17 out. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2013.181>

## CONCLUSÕES GERAIS

A utilização do aditivo alimentar VILIGEN™ promoveu resultados positivos em vários parâmetros avaliados para a tilápia-do-nilo. Houve clara melhora no ganho em peso e taxa de crescimento específico, independente do nível suplementado. Ainda, foi possível estimar o melhor nível de suplementação para o maior ganho em peso, que foi de 2,80 g kg<sup>-1</sup> de VILIGEN™. O mesmo comportamento foi verificado nos parâmetros histomorfométricos do intestino, sendo estimada a suplementação de 3,30 e 3,50 g kg<sup>-1</sup> de VILIGEN™, para o maior perímetro das dobras intestinais e maior número de células caliciformes na região proximal, respectivamente.

Em relação às respostas imunes, apenas a imunoglobulina total, após o desafio bacteriano, foi influenciada pela inclusão do aditivo na dieta, resultando em resposta linear decrescente aos níveis crescentes de inclusão do aditivo. Não houve influência da suplementação dietética com VILIGEN™ nos demais parâmetros imunes avaliados antes e após o desafio contra *Streptococcus agalactiae*, bem como na sobrevivência após o desafio.

A inclusão do aditivo alimentar promoveu maior diversidade alfa na comunidade bacteriana do intestino de juvenis de tilápia-do-nilo. Além disso, os peixes alimentados com as dietas contendo 0,60 e 4,80 g kg<sup>-1</sup> apresentaram perfil microbiano diferente em relação aos peixes alimentados sem o aditivo, indicando menor susceptibilidade à disbiose microbiana intestinal. Destaca-se que muitas espécies de bactérias no intestino de tilápias-do-nilo do presente estudo não estão classificadas ou atribuídas. Por fim, os peixes alimentados com VILIGEN™ apresentaram maior atividade da enzima tripsina na região medial do intestino, possivelmente relacionada à modulação bacteriana intestinal.

Esta tese constitui parte de uma parceria firmada entre a empresa Alltech Inc. (Nicholasville, EUA) e a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC-Brasil), sob coordenação da Professora Débora Machado Fracalossi. Como continuação a este estudo, serão realizados novos experimentos, visando melhor elucidar o efeito do período de suplementação *versus* níveis de inclusão do aditivo nas respostas imunes, microbiota intestinal, crescimento e digestibilidade de nutrientes para tilápia-do-nilo.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABDEL-GHANY, H.M. et al. Dietary lipid sources affect cold tolerance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal Of Thermal Biology**, v. 79, p. 50-55, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.11.009>.
- AKTER, M.N. et al. Dietary supplementation with mannan oligosaccharide influences growth, digestive enzymes, gut morphology, and microbiota in juvenile striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. **Aquaculture International**, v. 24, n. 1, p. 127-144, 28 abr. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-015-9913-8>.
- AL-HARBI, A.H. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). **Aquaculture**, v. 464, p. 515-520, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.036>.
- AMAL, M.N.A.; ZAMRI-SAAD, M. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 34, n. 2, p. 195–206, 2011.
- ASADUZZAMAN, M. et al. Dietary supplementation of inosine monophosphate promotes cellular growth of muscle and upregulates growth-related gene expression in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 468, p. 297-306, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.033>.
- ASHTON, I. et al. Effects of dietary fatty acids on eicosanoid-generating capacity, fatty acid composition and chemotactic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Lipids And Lipid Metabolism**, v. 1214, n. 3, p. 253-262, out. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)90071-x](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2760(94)90071-x).
- AZEVEDO, R.V. et al. Dietary mannan oligosaccharide and *Bacillus subtilis* in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 38, n. 4, p. 347, 7 nov. 2016. Universidade Estadual de Maringá. <http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v38i4.31360>.
- BAIRAGI, A. et al. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. **Aquaculture International**, v. 10, n. 2, p. 109-121, 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1021355406412>.
- BAPTISTA, A.S. **Saccharomyces cerevisiae em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxinas**. Dissertação (Mestrado em ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 84f. 2001.
- BARATO, P et al. Persistence of a single clone of *Streptococcus agalactiae* causing disease in tilapia (*Oreochromis sp.*) cultured in Colombia over 8 years. **Journal Of Fish Diseases**, v. 38, n. 12, p. 1083-1087, 2 fev. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12337>.
- BARBALHO, R.L.C. **Suplementação de levedura hidrolisada (Hilyses®) nas dietas de frangos de corte**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/Universidade de São Paulo, Pirassununga, 59f, 2009.

BARMAN, D. et al. Immunostimulants for Aquaculture Health Management. **Journal Of Marine Science: Research & Development**, v. 03, n. 03, 2013. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9910.1000134>.

BARROWS, F.T. Feed additives. In **Encyclopedia of Aquaculture**, R. R. Stickney, ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, p. 335-340, 2000.

BARTON, B.A. Stress in Fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative And Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517-525, 1 jul. 2002. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/icb/42.3.517>.

BARUAH, K. et al. Interactions of Dietary Microbial Phytase, Citric Acid and Crude Protein Level on Mineral Utilization by Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), Juveniles. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 38, n. 2, p. 238-249, jun. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00092.x>.

BERTO, R.S. et al. Yeast extract on growth, nutrient utilization and haemato-immunological responses of Nile tilapia. **Aquaculture Research**, v. 47, n. 8, p. 2650-2660, 10 fev. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/are.12715>.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; URBINATI, E.C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1484-1506, set. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201420130159>.

BURRELLS, C. et al. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds. **Aquaculture**, v. 199, n. 1-2, p. 171-184, jul. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(01\)00576-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00576-2).

BURY, N.R.; WALKER, P.A.; GLOVER, C.N. Nutritive metal uptake in teleost fish. **Journal Of Experimental Biology**, v. 206, n. 1, p. 11-23, 1 jan. 2003. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.00068>.

CABIB, E; ROBERTS, R; BOWERS, B. Synthesis of the Yeast Cell Wall and its Regulation. **Annual Review Of Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 763-793, jun. 1982. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.51.070182.003555>.

CARBALLO, C. et al. Yeast  $\beta$ -glucans and microalgal extracts modulate the immune response and gut microbiome in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 92, p. 31-39, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.044>.

CARBONE, D; FAGGIO, C. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 54, p. 172-178, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.04.011>.

CAVALCANTE, R. B. et al. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Nile tilapia: growth performance and protection against *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100343, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100343>.

- CELI, P. et al. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science And Technology**, v. 234, p. 88-100, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeeds.2017.09.012>.
- CHEN, M. et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 3-4, p. 526-530, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.035>.
- CHENG, Z.; BUENTELLO, A.; GATLIN, D.M. Dietary nucleotides influence immune responses and intestinal morphology of red drum *Sciaenops ocellatus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, n. 1, p. 143-147, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.09.019>
- CHERRINGTON, C. A. et al. Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* without causing membrane perturbation. **Journal Of Applied Bacteriology**, v. 70, n. 2, p. 161-165, fev. 1991. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb04442.x>.
- CLEMENTS, K.D. et al. Intestinal microbiota in fishes: what's known and what's not. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 8, p. 1891-1898, 17 mar. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.12699>.
- COLLET, S. Nutrição, imunidade e produtividade. In: **10ª Ronda Latino-Americana Alltech – O futuro da alimentação**. Nicholasville: Alltech, p. 20-30, 2000.
- CRUZ, J. B. F.; SOARES, H. F. Uma revisão sobre o zinco. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 207-222, 2011.
- DAWOOD, M.A.O. et al. Interaction effects of dietary supplementation of heat-killed *Lactobacillus plantarum* and  $\beta$ -glucan on growth performance, digestibility and immune response of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 1, p. 33-42, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.033>.
- DAWOOD, M.A.O. et al. The role of  $\beta$ -glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. **Aquaculture**, v. 523, p. 735205, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735205>.
- DIBNER, J.J.; BUTTIN, P. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. **Journal Of Applied Poultry Research**, v. 11, n. 4, p. 453-463, dez. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1093/japr/11.4.453>.
- DIMITROGLOU, A. et al. Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal Of Animal Science**, v. 87, n. 10, p. 3226-3234, 17 jul. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2008-1428>.
- DIVYA, M. et al.  $\beta$ -glucan extracted from eukaryotic single-celled microorganism *Saccharomyces cerevisiae*: dietary supplementation and enhanced ammonia stress tolerance on *Oreochromis mossambicus*. **Microbial Pathogenesis**, v. 139, p. 103917, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103917>.

EID, A.E.; GHONIM, S.I. Dietary zinc requirement of fingerling *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v.119, p.259-264, 1994. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90180-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90180-5).

EL-SAYED, A.M. **Tilapia culture**. Oxfordshire: Cabi publishing, 2006.

EVANS, J.J. et al. Human *Streptococcus agalactiae* Isolate in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 774-776, maio 2009. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1505.080222>.

FAUCONNEAU, B. Partial substitution of protein by a single amino acid or an organic acid in rainbow trout diets. **Aquaculture**, v. 70, n. 1-2, p. 97-106, maio 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90009-9](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(88)90009-9).

FENG, L. et al. Dietary phenylalanine-improved intestinal barrier health in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) is associated with increased immune status and regulated gene expression of cytokines, tight junction proteins, antioxidant enzymes and related signalling molecules. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 495-509, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.001>.

FIGUEIREDO, H.C.P. et al. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 678-680, ago. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-09352006000400036>.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, jul. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-35982008001300002>.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020** - Sustainability in action. Rome, 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Roma: FAO, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **The state of food and agriculture**. Rome, 2005.

FREIMUND, S. et al. A new non-degrading isolation process for 1,3-β-d-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 2, p. 159-171, nov. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0144-8617\(03\)00162-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0144-8617(03)00162-0).

FRUGE, E. et al. Effects of Viligen™ on growth performance of 6 to 13 kg nursery pigs. *Journal of Animal Science*, v. 96, n. Suppl 3, p. 323, 2018.

GAJARDO, K. et al. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a basis for comparative gut microbial research. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1, 3 ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep30893>.

GANNAM, A.L.; SCHROCK, R.M. Immunostimulants in Fish Diets. **Journal Of Applied Aquaculture**, v. 9, n. 4, p. 53-89, dez. 1999. Informa UK Limited.

[http://dx.doi.org/10.1300/j028v09n04\\_06](http://dx.doi.org/10.1300/j028v09n04_06).

GATLIN, D.M.; PHILLIPS, Harold F. Dietary calcium, phytate and zinc interactions in channel catfish. **Aquaculture**, v. 79, n. 1-4, p. 259-266, jul. 1989. Elsevier BV.

[http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90466-3](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(89)90466-3).

GHANBARI, M.; KNEIFEL, W.; DOMIG, K.J. A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. **Aquaculture**, v. 448, p. 464-475, nov. 2015. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, MB. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal Of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1 jun. 1995. Oxford University Press (OUP).

<http://dx.doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>.

GIL, A. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. **European Journal Of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 3, p. 1-4, 30 jul. 2002. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601475>.

GRIMBLE, G. K.; WESTWOOD, M. R. Nucleotides. In: **Nutrition and Immunology: principles and Practice**. Totowa: Humana Press. p. 135-144, 2000.

GÜLTEPE, N. et al. Dietary supplementation with Mannan oligosaccharides (MOS) from Bio-Mos enhances growth parameters and digestive capacity of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 5, p. 482-487, 4 nov. 2010. Wiley.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00824.x>.

GUTIÉRREZ-CASTRELLÓN, P. et al. Immune response to nucleotide-supplemented infant formulae: systematic review and meta-analysis. **British Journal Of Nutrition**, v. 98, n. 1, p. 64-67, out. 2007. Cambridge University Press (CUP).

<http://dx.doi.org/10.1017/s000711450783296x>.

HA, N. et al. Dietary carbohydrates and protein of yeast modulate the early stages of innate immune response in tilapia (*Oreochromis niloticus*) primarily after LPS inoculation.

**Aquaculture International**, v. 25, n. 2, p. 755-776, 3 out. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1007/s10499-016-0073-2>.

HAHOR, Waraporn et al. Effects of dietary supplementation of oligosaccharides on growth performance, gut health and immune response of hybrid catfish (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*). **Aquaculture**, v. 507, p. 97-107, maio 2019. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.010>.

HALAS, Veronika; NOCHTA, Imre. Mannan Oligosaccharides in Nursery Pig Nutrition and Their Potential Mode of Action. **Animals**, v. 2, n. 2, p. 261-274, 23 maio 2012. MDPI AG.

<http://dx.doi.org/10.3390/ani2020261>.

HASSON, K. et al. Streptococcosis in farmed *Litopenaeus vannamei*: a new emerging bacterial disease of penaeid shrimp. **Diseases Of Aquatic Organisms**, v. 86, p. 93-106, 23 set. 2009. Inter-Research Science Center.

<http://dx.doi.org/10.3354/dao02132>.

HERNÁNDEZ, E; FIGUEROA, J; IREGUI, C. Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis* sp., farm: a case study. **Journal Of Fish Diseases**, v. 32, n. 3, p. 247-252, mar. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.00981.x>.

HOSEINIFAR, S.H.; SUN, Y.Z.; CAIPANG, C.M. Short-chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: an updated view. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 4, p. 1380-1391, 30 nov. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/are.13239>.

HOSSAIN, M.A, PANDEY A., SATOH, S. Effects of organic acids on growth and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries Science**, v. 73, p. 1309–1317, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01469.x>

HOVDA, M.B. et al. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v. 272, n. 1-4, p. 581-588, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.045>

HUANG, F. et al. Dietary zinc requirement of adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed semi-purified diets, and effects on tissue mineral composition and antioxidant responses. **Aquaculture**, v. 439, p. 53-59, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.018>.

HUIGE, N.J. Brewery by-products and effluents. In **Handbook of brewing**. PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. p. 656-713. Boca Raton: CRC Press, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019.

JESUS, G.F.A. et al. Protected forms of sodium butyrate improve the growth and health of Nile tilapia fingerlings during sexual reversion. **Aquaculture**, v. 499, p. 119-127, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.027>.

JESUS, G.F.A. et al. Use of protected forms of sodium butyrate benefit the development and intestinal health of Nile tilapia during the sexual reversion period. **Aquaculture**, v. 504, p. 326-333, abr. 2019b. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.018>.

KAYANSAMRUAJ, P. et al. Molecular characterization and virulence gene profiling of pathogenic *Streptococcus agalactiae* populations from tilapia (*Oreochromis* sp.) farms in Thailand. **Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 4, p. 488-495, 19 maio 2014. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1040638714534237>.

KIM, D.H.; BRUNT, J.; AUSTIN, B. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal Of Applied Microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1654-1664, jun. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03185.x>

KIMURA, T.; KAMBE, T. The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: an overview and perspective. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 336, 4 mar. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17030336>.

KISHAWY, A.T. et al. Comparing the effect of diet supplementation with different zinc sources and levels on growth performance, immune response and antioxidant activity of

tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 26, n. 6, p. 1926-1942, 28 ago. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/anu.13135>.

KOH, C.B. et al. Effects of a dietary organic acids blend and oxytetracycline on the growth, nutrient utilization and total cultivable gut microbiota of the red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and resistance to *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture Research**, v. 47, n. 2, p. 357-369, 16 jun. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/are.12492>.

KUBITZA, L. M. M. *Streptococcus* versus tilápias: É preciso se antecipar ao problema. **Panorama da Aquicultura**, v. 11, n.66, p. 33-36, 2001.

KULKARNI, A. D et al. Expression of immune cell surface markers in vivo and immune competence in mice by dietary nucleotides. **Transplantation Proceedings**. 1989. p. 121-124.

KUMAR, G.; KOCOUR, M. Applications of next-generation sequencing in fisheries research: a review. **Fisheries Research**, v. 186, p. 11-22, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fishres.2016.07.021>.

LALL, S.P.; BISHOP, F.J. Studies on mineral and protein utilization by Atlantic salmon (*Salmo salar*) grown in sea water. **Fisheries Marine Service Research Division Technology Report**, n.688, p.16, 1977.

LELEIKO, N.S. et al. De novo purine nucleotide synthesis in the rat small and large intestine: effect of dietary protein and purines. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 2, n. 2, p. 313-319, 1983.

LI, Y.W. et al. Chronic streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), caused by *Streptococcus agalactiae*. **Journal Of Fish Diseases**, v. 37, n. 8, p. 757-763, 17 ago. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12146>.

LIEPMAN, A.H. et al. Functional Genomic Analysis Supports Conservation of Function Among Cellulose Synthase-Like A Gene Family Members and Suggests Diverse Roles of Mannans in Plants. **Plant Physiology**, v. 143, n. 4, p. 1881-1893, 16 fev. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.093989>.

LIM, C.; WEBSTER, C. D. Tilápias: biology, culture and nutrition. New York: Haworth Press, 678 p, 2006.

LIN, S. et al. Comparison of chelated zinc and zinc sulfate as zinc sources for growth and immune response of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 406-407, p. 79-84, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.04.026>.

LIU, B. et al. Effects of mannan oligosaccharide on the physiological responses, HSP70 gene expression and disease resistance of Allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) under *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 1395-1403, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.02.028>.

LIU, L et al. Outbreak of *Streptococcus agalactiae* infection in barcoo grunter, *Scortum barcoo* (McCulloch & Waite), in an intensive fish farm in China. **Journal Of Fish Diseases**, v. 37, n. 12, p. 1067-1072, 7 out. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jfd.12187>.

LIU, W. et al. Effects of dietary microencapsulated sodium butyrate on growth, intestinal mucosal morphology, immune response and adhesive bacteria in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) pre-fed with or without oxidised oil. **British Journal Of Nutrition**, v. 112, n. 1, p. 15-29, 28 abr. 2014. Cambridge University Press (CUP).  
<http://dx.doi.org/10.1017/s0007114514000610>.

LIU, Yang et al. Sodium butyrate supplementation in high-soybean meal diets for turbot (*Scophthalmus maximus* L.): effects on inflammatory status, mucosal barriers and microbiota in the intestine. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 88, p. 65-75, maio 2019. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2019.02.064>.

LU, Z.Y. et al. Mannan oligosaccharides improved growth performance and antioxidant capacity in the intestine of on-growing grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100313, jul. 2020. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100313>.

LÜCKSTÄDT, C. The use of acidifiers in fish nutrition. **Cab Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 3, n. 044, p. 1, 1 abr. 2008. CABI Publishing. <http://dx.doi.org/10.1079/pavsmnr20083044>.

LUSIASTUTI, A.M. et al. The occurrence of *Streptococcus agalactiae* sequence type 261 from fish disease outbreaks of tilapia *Oreochromis niloticus* in Indonesia. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 7, p. 1260-1263, 16 nov. 2012. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/are.12069>.

MARTINS, M.L. et al. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: anostomidae) naturally infected by *goezia leporini* (nematoda). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 5, p. 640-646, out. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-09352004000500011>.

MATEO, C.D.; STEIN, H.H. Nucleotides and young animal health: can we enhance intestinal tract development and immune function. **Nutritional biotechnology in the feed and food industries**, p. 20th, 2004.

MCCLAIN, W.R.; GATLIN III, D.M. Dietary zinc requirement of *Oreochromis aureus* and effects of dietary calcium and phytate on zinc bioavailability. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 19, n. 3, p. 103-108, 1988. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1988.tb00936.x>

MIAN, G.F. et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 180-183, abr. 2009. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.016>.

MILES, R. D.; HENRY, P. R. Relative trace mineral bioavailability. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 73-92, 2000.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução normativa 13 de 30 de novembro de 2004. Diário Oficial, 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA).  
Instrução Normativa nº 44 de 15 de dezembro de 2015. Diário Oficial, 2015.

MOMENI-MOGHADDAM, P. et al. Effects of mannan oligosaccharide supplementation on growth, some immune responses and gut lactic acid bacteria of common carp (*Cyprinus Carpio*) fingerlings. **Veterinary research forum : an international quarterly journal**, v. 6, n. 3, p. 239–44, 2015.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos cultivados. In - **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. TecArt editora. São Paulo, p. 343-383. 2004.

MOUNTFORT, D.O.; CAMPBELL, J.; CLEMENTS, K.D. Hindgut Fermentation in Three Species of Marine Herbivorous Fish. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1374-1380, mar. 2002. American Society for Microbiology.  
<http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.3.1374-1380.2002>.

MUSA, N. et al. Streptococcosis in red hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*) commercial farms in Malaysia. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 5, p. 630-632, mar. 2009. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02142.x>.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, D.C.: National Academy Press, 2011.

NAYAK, Sukanta K. Role of gastrointestinal microbiota in fish. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 11, p. 1553-1573, 16 jun. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Artmed, 2014.

NG, W.K.; KOH, C. B. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. **Reviews In Aquaculture**, v. 9, n. 4, p. 342-368, 3 mar. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12141>.

NIELSEN, H Bjørn et al. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 822-828, 6 jul. 2014. Springer Science and Business Media LLC.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2939>.

OLIVEIRA, R.C. O panorama da aqüicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 2, n. 1, p. 1, 31 Maio 2015. Revinter. <http://dx.doi.org/10.22280/revintervol2ed1.18>.

OWEN, M.A.G. et al. The effect of dietary supplementation of sodium butyrate on the growth and microflora of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). In **International Symposium on Fish Nutrition and Feeding**. France. p 149, 2006.

OYOFO, B.A. et al. Prevention of *Salmonella typhimurium* Colonization of Broilers with D-Mannose. **Poultry Science**, v. 68, n. 10, p. 1357-1360, out. 1989. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.3382/ps.0681357>.

PALM, N.W.; MEDZHITOV, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. **Immunological Reviews**, v. 227, n. 1, p. 221-233, jan. 2009. Wiley.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065x.2008.00731.x>.

PARDO-GAMBOA, B. S. et al. Nutrientes digestíveis da Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) Íntegra e Autolisada para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Veterinária e Zootecnia**, v. 5, n. 1, p. 26–38, 2011.

PARIPATANANONT, T.; LOVELL, R.T. Chelated zinc reduces the dietary zinc requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 133, n. 1, p. 73-82, maio 1995.

Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00404-c](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(94)00404-c).

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. Bacterioses. In: **Doenças de Peixes: Profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá, 2008. p. 165-220.

PEIXE BR. Anuário 2021 Peixe BR da Piscicultura. **Associação Brasileira de Piscicultura**, p. 1–71, 2021.

PELICANO, E. et al. Carcass and cut yields and meat qualitative traits of broilers fed diets containing probiotics and prebiotics. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, n. 3, p. 169-175, set. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-635x2005000300006>.

PELÍCIA, V.C. **Nucleotídeos na dieta de frangos de corte criados no sistema alternativo**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 76 f. 2008.

PEREIRA, U.P. et al. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 1-2, p. 186-192, jan. 2010. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.025>.

PIETRETTI, D. et al. Oxidative burst and nitric oxide responses in carp macrophages induced by zymosan, MacroGard® and selective dectin-1 agonists suggest recognition by multiple pattern recognition receptors. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 3, p. 847-857, set. 2013. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.022>.

PILARSKI, F.; ROSSINI, A.; CECCARELLI, P. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal Of Biology**, v. 68, n. 2, p. 409-414, maio 2008.

<http://dx.doi.org/10.1590/s1519-69842008000200025>.

PILLAY, T.V. R. **Aquaculture Principles and Practices**. Oxford: Blackwell Publishing, 1990.

PRIDGEON, J.W.; KLESZIUS, P.H. RETRACTED: development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* as potential vaccines by selecting for resistance to sparfloxacin. **Vaccine**, v. 31, n. 24, p. 2705-2712, maio 2013. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.066>.

- RAA, J. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. **Reviews In Fisheries Science**, v. 4, n. 3, p. 229-288, jan. 1996. Informa UK Limited.  
<http://dx.doi.org/10.1080/10641269609388587>.
- RAVINDRAN, V; KORNEGAY, E T. Acidification of weaner pig diets: a review. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, v. 62, n. 4, p. 313-322, 1993. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.2740620402>.
- RAWLS, John F. et al. Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-free Recipients Reveal Host Habitat Selection. **Cell**, v. 127, n. 2, p. 423-433, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.043>.
- REDA, R.M. et al. Effect of dietary yeast nucleotide on antioxidant activity, non-specific immunity, intestinal cytokines, and disease resistance in Nile Tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 80, p. 281-290, set. 2018. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.016>.
- REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast technology**. 2. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.
- RICKE, S. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 632-639, abr. 2003. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1093/ps/82.4.632>.
- RINGØ E. Effects of dietary formate and acetate on growth and lipid digestibility in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). **Fiskeridirektoratets Skrifter Serie Ernæring**, v. 5, p.17–24, 1992.
- RINGØ, E. et al. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? **Aquaculture Nutrition**, v. 22, n. 2, p. 219-282, 7 nov. 2015. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/anu.12346>.
- RINGØ, E. et al. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. **Aquaculture**, v. 227, n. 1-4, p. 395-415, nov. 2003. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.05.001>.
- RINGØ, E. et al. Prebiotics in aquaculture: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 117-136, abr. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00731.x>.
- RINGØ, E.; OLSEN, R.E.; CASTELL, J.D. Effect of Dietary Lactate on Growth and Chemical Composition of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. **Journal Of The World Aquaculture Society**, v. 25, n. 3, p. 483-486, set. 1994. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-7345.1994.tb00234.x>.
- RINGØ, Einar. Effects of dietary lactate and propionate on growth and digesta in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. **Aquaculture**, v. 96, n. 3-4, p. 321-333, ago. 1991. Elsevier BV.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90161-y](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(91)90161-y).
- ROBERTS, R. J. The Bacteriology of Teleosts. In: ROBERTS, R. J. **Fish Pathology**. 4. ed. Edinburgh: W. B. Saunders, p. 339-382, 2012.

- ROBINSON, J.A.; MEYER, F.P. Streptococcal Fish Pathogen. **Journal Of Bacteriology**, v. 92, n. 2, p. 512-512, ago. 1966. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.92.2.512-512.1966>.
- ROBLES, R. et al. Effect of partially protected butyrate used as feed additive on growth and intestinal metabolism in sea bream (*Sparus aurata*). **Fish Physiology And Biochemistry**, v. 39, n. 6, p. 1567-1580, 5 jun. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-013-9809-3>.
- ROEDIGER, W.W. the colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? **The Lancet**, v. 316, n. 8197, p. 712-715, out. 1980. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(80\)91934-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(80)91934-0).
- ROESELERS, G. et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. **The Isme Journal**, v. 5, n. 10, p. 1595-1608, 7 abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.38>.
- ROSSI, P.; XAVIER, E. G.; RUTZ, F. Nucleotídeos na nutrição animal. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 1, p. 5–12, 2007. <https://doi.org/10.18539/cast.v13i1.1303>
- RUNGRUANGSAK, K.; UTNE, F. Effect of different acidified wet feeds on protease activities in the digestive tract and on growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Aquaculture**, v. 22, p. 67-79, jan. 1981. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486\(81\)90134-4](http://dx.doi.org/10.1016/0044-8486(81)90134-4).
- RUSSEL, I. Yeast, in Priest, F.G., Stewart, G.G. **Handbook of brewing**. Boca Raton: CRC Press, p. 281-332, 2006.
- SA, M.V.C. et al. Relative bioavailability of zinc in supplemental inorganic and organic sources for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, n. 4, p. 273-281, ago. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.2005.00352.x>.
- SAHA, S. et al. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia, *Oreochromis mossambica* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). **Aquaculture Research**, v. 37, n. 4, p. 380-388, mar. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01442.x>.
- SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n. 1-2, p. 63-92, mar. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(98\)00436-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00436-0).
- SALVADOR, R. et al. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Parana State, Brazil. *Ciência Rural*, v. 35, n. 6, p. 1374-1378, dez. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782005000600023>.
- SANDERSON, I.R.; HE, Y. Nucleotide Uptake and Metabolism by Intestinal Epithelial Cells. **The Journal Of Nutrition**, v. 124, n. 1, p. 131-137, 1 jan. 1994. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1093/jn/124.suppl\\_1.131s](http://dx.doi.org/10.1093/jn/124.suppl_1.131s).

SANTOS, N.G. **Suplementação de prebióticos (Actigen® e Viligen™) em dietas de frango de corte de 1 a 21 dias de idade**. 2020. Monografia (Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal de Sergipe, 31p.

SARKER, S.A.; SATOH, S.; KIRON, V. Supplementation of citric acid and amino acid-chelated trace element to develop environment-friendly feed for red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 248, n. 1-4, p. 3-11, jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.012>.

SARWAR, G; PEACE, R.W.; BOTTING, H.G. Corrected relative net protein ratio (CRNPR) method based on differences in rat and human requirements for sulfur amino acids. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 68, n. 4, p. 689-693, 1985. <https://doi.org/10.1093/jaoac/68.4.689>

SCHRYVER, P. de et al. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1535-1541, 22 jan. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2414-9>.

SCHWARZ, K.K. et al. Mananoligossacarídeo em dietas para juvenis de tilápias do Nilo. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 32, n. 2, p. 197-203, 2010.

SCHWARZ, K.K. et al. Mananoligossacarídeo em dietas para larvas de tilápia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 12, p. 2634-2640, 2011.

SELIM, Khaled M. et al. Effects of nucleotides supplemented diets on growth performance and expressions of ghrelin and insulin-like growth factor genes in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal Of Applied Aquaculture**, v. 32, n. 2, p. 157-174, 28 nov. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10454438.2019.1696911>.

SHINN, A.J. et al. Economic impacts of aquatic parasites on global finfish production. **Global Aquaculture Advocate**, v. 6, p. 58-61, 2015.

SILVA, B.C. da et al. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v. 47, n. 2, p. 612-623, 3 jul. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/are.12520>.

SINGH, S.; SINGH, G.; ARYA, S.K. Mannans: an overview of properties and application in food products. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 79-95, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.130>.

SINGHAL, A. et al. Dietary nucleotides and fecal microbiota in formula-fed infants: a randomized controlled trial. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 6, p. 1785-1792, 1 jun. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/87.6.1785>.

SITUMORANG, M.L. et al. Effect of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate on growth and disease resistance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles. **Veterinary Microbiology**, v. 182, p. 44-49, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.024>.

SKRIVANOVA, E. et al. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. **Veterinárni Medicína**, v. 51, n. 3, p. 81-88, 19 mar. 2012. Czech Academy of Agricultural Sciences. <http://dx.doi.org/10.17221/5524-vetmed>.

SMITH, T.B.; WAHL, D.H.; MACKIE, R.I. Volatile fatty acids and anaerobic fermentation in temperate piscivorous and omnivorous freshwater fish. **Journal Of Fish Biology**, v. 48, n. 5, p. 829-841, maio 1996. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.1996.tb01479.x>.

SONG, S.K. et al. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 40, n. 1, p. 40-48, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.06.016>.

STAYKOV, Y. et al. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, v. 15, n. 2, p. 153-161, 24 mar. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10499-007-9096-z>.

SULLAM, Karen E. et al. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 13, p. 3363-3378, 4 abr. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294x.2012.05552.x>.

TAKAHASHI, N.S. Nutrição de peixes. São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultores e Pesqueiros, 2011. Disponível em: < <http://www.abrapesq.com.br/materias.htm> >.  
TAPIERO, H.; TEW, K.D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 9, p. 399-411, nov. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0753-3322\(03\)00081-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0753-3322(03)00081-7).

TAN, B.; MAI, K. Zinc methionine and zinc sulfate as sources of dietary zinc for juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* Ino. **Aquaculture**, v. 192, n. 1, p. 67-84, jan. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(00\)00435-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(00)00435-x).

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal Of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 4, p. 913-918, 7 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12639-017-0938-y>.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>.

TORRECILLAS, S. et al. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 5, p. 969-981, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2007.03.007>.

TRAN-NGOC, Kim T. et al. Interaction between dissolved oxygen concentration and diet composition on growth, digestibility and intestinal health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 462, p. 101-108, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.005>.

UAUY, R.; QUAN, R.; GIL, A. Role of Nucleotides in Intestinal Development and Repair: implications for infant nutrition. **The Journal Of Nutrition**, v. 124, n. 8, p. 1436-1441, 1 ago. 1994. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1093/jn/124.suppl\\_8.1436s](http://dx.doi.org/10.1093/jn/124.suppl_8.1436s).

VALLADÃO, G.M.R. et al. South American fish for continental aquaculture. Reviews In Aquaculture, v. 10, n. 2, p. 351-369, 20 jun. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/raq.12164>.

VAN IMMERSEEL, F. et al. Invasion of *Salmonella enteritidis* in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 237-248, 25 ago. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00542-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00542-1).

VIELMA, J.; LALL, S. P. Dietary formic acid enhances apparent digestibility of minerals in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 265-268, dez. 1997. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2095.1997.00041.x>.

VOSTI D.C.; JOSLYN, M.A. Autolysis of Baker's yeast. **Journal of Applied Microbiology**, v. 2, p. 70-78, 1954

WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v. 151, n. 1-4, p. 185-207, maio 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486\(96\)01503-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0044-8486(96)01503-7)

WESTWOOD, O.M.R. **The Scientific Basis for Health Care Times Mirror International Publishers**, London: Times Mirror International, 616p, 1999.

WET, L. Organic acids as performance enhancers. **AquaFeeds: Formulation and Beyond**, v. 2, p. 12-14, 2005.

XU, Li et al. Effects of dietary yeast nucleotides on growth, non-specific immunity, intestine growth and intestinal microbiota of juvenile hybrid tilapia *Oreochromis niloticus*♀×*Oreochromis aureus*♂. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 244-251, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.08.006>

YADAV, M.; SCHOREY, J.S. The  $\beta$ -glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 3168-3175, 1 nov. 2006. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-05-024406>.

YAMAMOTO, S. et al. Role of nucleosides and nucleotides in the immune system, gut reparation after injury, and brain function. **Nutrition**, v. 13, n. 4, p. 372-374, abr. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0899-9007\(96\)00376-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0899-9007(96)00376-0).

YE, X. et al. Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China. **Fisheries Science**, v. 77, n. 4, p. 623-632, 10 maio 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12562-011-0365-4>.

ZARKASI, K.Z. et al. Pyrosequencing-based characterization of gastrointestinal bacteria of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) within a commercial mariculture system. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 18-27, 5 maio 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12514>.

ZHU, Y. et al. Combined effects of dietary phytase and organic acid on growth and phosphorus utilization of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*, v. 430, p. 1-8, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.023>.