

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
ENGENHARIA DE PESCA

SILVANA BARBOSA REZENDE

Caracterização do teste de escolha alimentar e desempenho zootécnico da tilápia-do-Nilo em dietas com adição de prebiótico e probiótico

Toledo

2019

SILVANA BARBOSA REZENDE

Caracterização do teste de escolha alimentar e desempenho zootécnico da tilápia-do-Nilo em dietas com adição de prebiótico e probiótico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca - Mestrado e Doutorado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Ph.D. Nilton Garcia Marengoni

Coorientadora: Dra. Lara Wichr Genovez

Toledo

2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Rezende, Silvana Barbosa

Caracterização do teste de escolha alimentar e desempenho zootécnico da tilápia-do-Nilo em dietas com adição de prebiótico e probiótico / Silvana Barbosa Rezende; orientador(a), Nilton Garcia Marengoni; coorientador(a), Lara Wich Genovez, 2019.

44 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, 2019.

1. Aditivos . 2. Comportamento. 3. Hematologia. 4. Histologia . I. Marengoni, Nilton Garcia . II. Genovez, Lara Wich. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

SILVANA BARBOSA REZENDE

Caracterização do teste de escolha alimentar e desempenho zootécnico da tilápia-do-Nilo em dietas com adição de prebiótico e probiótico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Ph.D. Nilton Garcia Marengoni
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)

Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dra. Daniele Menezes Albuquerque
Universidade Federal da Grande Dourados

Aprovada em: 22 de fevereiro de 2019.

Local de defesa: Sala 74, Unioeste/*Campus* de Marechal Cândido Rondon

DEDICATÓRIA

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial aos meus pais pela confiança e carinho. Minha eterna gratidão a todos!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca (PREP) pela oportunidade em ingressar no mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Ph.D. Nilton Garcia Marengoni pela orientação, ensino e ajuda no conhecimento acadêmico.

À Dra. Lara Wichr Genovez pela coorientação, apoio, paciência e parceria.

Ao Dr. Pitágoras Augusto Piana pela ajuda no delineamento experimental e análise estatística.

Ao Laboratório de Aquicultura pelo espaço fornecido para a execução dos ensaios experimentais.

Aos professores Robie Allan Bombardelli e Danielle Menezes Albuquerque pelas contribuições nas correções e sugestões para melhorar a dissertação.

Ao técnico de laboratório Fernando Dressler pelo apoio e disponibilização de equipamentos utilizados nos ensaios experimentais.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca Carla Regina Meurer e Uilian Simões pelo suporte e apoio durante a realização do mestrado.

Aos meus pais por todo apoio, confiança e carinho.

Aos meus amigos Sidney Tavares, Jhony Ferry Mendonça da Silva, José Rafael e Auriele Machado pela ajuda e compreensão ao longo do mestrado.

Caracterização do teste de escolha alimentar e desempenho zootécnico da tilápia-do-Nilo em dietas com adição de prebiótico e probiótico

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a predileção da tilápia-do-Nilo por uma dieta que contenha adição de probiótico ou prebiótico e verificar os efeitos dos aditivos na escolha do alimento, desempenho zootécnico, hematologia e histologia do fígado, intestino e músculo. O teste comportamental de escolha alimentar utilizou três dietas (probiótico, prebiótico e controle) constituído por um peixe por aquário totalizando 10 unidades experimentais e observações em dois turnos (manhã e tarde) durante 56 dias. Simultaneamente, foi utilizado o ensaio com três dietas e quatro réplicas, sendo um peixe por aquário totalizando 12 unidades experimentais para avaliar o desempenho zootécnico, hematologia e histologia. Os valores médios da frequência de visitas ao comedouro e da quantidade de péletes ingeridos pelas tilápias alimentadas com as dietas probiótica e prebiótica foram inferiores ($P < 0,05$) aos peixes submetidos à dieta controle. A quantidade de péletes ejetados e tempo médio de alimentação das tilápias não apresentaram diferenças significativas, independente do turno avaliado ($P > 0,05$). A utilização dos aditivos não apresentou diferenças ($P > 0,05$) no desempenho zootécnico, número de eritrócitos e neutrófilos, número de vilos, altura da vilosidade intestinal, comprimento e peso do intestino dos juvenis de tilápia-do-Nilo entre as três dietas. A quantidade de leucócitos, linfócitos, monócitos nos peixes alimentados com dieta controle foram superiores aos encontrados nos peixes alimentados com as dietas probiótica e prebiótica ($P < 0,05$). O valor médio da área dos hepatócitos das tilápias alimentadas com dieta probiótica foi superior aos encontrados nas dietas prebiótica e controle, enquanto os maiores valores de diâmetro de fibras e frequência na classe de diâmetro ($> 40 \mu\text{m}$) foram observados nos peixes submetidos a dieta prebiótica. A adição de prebiótico ou probiótico à ração comercial, nas condições do teste de escolha alimentar para juvenis de tilápia-do-Nilo, influencia a frequência de visita ao comedouro e quantidade de péletes ingeridos, independente do turno avaliado. As respostas comportamentais de escolha alimentar da dieta probiótica aumenta a área dos hepatócitos enquanto a dieta prebiótica promove o incremento do diâmetro das fibras musculares das tilápias.

Palavras-chave: Aditivos, Comportamento, Hematologia, Histologia, *Oreochromis niloticus*

Characterization of the food choice test and zootechnical performance of Nile tilapia in diets with prebiotic and probiotic addition

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the predilection of Nile tilapia for a diet containing probiotic or prebiotic addition and to verify the effects of the additives in the choice of food, zootechnical performance, hematology and histology of the liver, intestine and muscle. The behavioral test of food choice used three diets (probiotic, prebiotic and control) consisting of one fish per aquarium totalizing 10 experimental units and observations in two shifts (morning and afternoon) for 56 days. At the same time, the test was used with three diets and four replicates, one fish per aquarium totalizing 12 experimental units to evaluate the zootechnical performance, hematology and histology. The mean values of the frequency of visits to the feeder and the quantity of pellets ingested by tilapia fed with the probiotic and prebiotic diets were lower ($P < 0.05$) than the fish submitted to the control diet. The quantity of pellets ejected and mean tilapia feed time did not show significant differences, independently of the evaluated turn ($P > 0.05$). The use of the additives did not show differences ($P > 0.05$) in the zootechnical performance, number of erythrocytes and neutrophils, number of villi, intestinal villus height, intestinal length and intestinal weight of juvenile Nile tilapia among the three diets. The quantity of leukocytes, lymphocytes, and monocytes in fish fed with control diet were higher than those found in fish fed probiotic and prebiotic diets ($P < 0.05$). The mean value of the hepatocyte area of the tilapia fed with probiotic diet was higher than that found in the prebiotic and control diets, while the highest values of fiber diameter and diameter class ($> 40 \mu\text{m}$) were observed in fish submitted to a prebiotic diet. The addition of prebiotic or probiotic to the commercial diet, under the conditions of the food choice test for juveniles of Nile tilapia, influences the frequency of visit to the feeder and quantity of ingested pellets, independently of the evaluated turn. The behavioral responses of dietary choice of the probiotic diet increases the area of the hepatocytes while the prebiotic diet promotes the increase of the diameter of the muscular fibers of the tilapia.

Keywords: Additives, Behavior, Hematology, Histology, *Oreochromis niloticus*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Níveis de garantia da ração comercial (Kowalski [®] , 2018) utilizada na alimentação da tilápia-do-Nilo.....	13
Tabela 2	Valores médios, erro padrão (EP), intervalo de 95% de confiança (95% IC) e número de observações (N) para frequência de visitas ao comedouro (FQ), quantidade de péletes ingeridos (GI) e ejetados (GE) e tempo médio de alimentação, mensuradas nos turnos de manhã e tarde, nas tilápias submetidas às dietas probiótica (PROB), prebiótica (PREB) e controle (CONT).....	22
Tabela 3	Valores médios e desvio padrão para cada variável resposta: PI = peso inicial; PF = peso final; SO = sobrevivência; GP = ganho em peso; GPD = ganho em peso diário; CR = consumo de ração; CA = conversão alimentar; EF = eficiência alimentar; BF = biomassa final; TCE = taxa de crescimento específico; IVS = índice viscerossomático e IHS = índice hepatossomático, das tilápias submetidas às dietas probiótica (PROB), prebiótica (PREB) e controle (CONT).....	25
Tabela 4	Valores médios e erro padrão (número μL^{-1}) do número total de eritrócitos, leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos dos juvenis de tilápia-do-Nilo, alimentadas com adição de probiótico ou prebiótico na dieta.....	26
Tabela 5	Valores médios da área dos hepatócitos (μm^2), peso dos fígados (g) e índice hepatossomático (%) para tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas probiótica ou prebiótica por 56 dias.....	28
Tabela 6	Número de vilosidades por segmento, valores médios e desvio padrão da altura das vilosidades (μm), do comprimento e do peso do intestino de tilápia-do-Nilo submetidas às dietas probiótica, prebiótica e controle.....	29
Tabela 7	Valores médios e desvio padrão do diâmetro de fibras musculares e frequência de distribuição em três classes de diâmetros ($<20 \mu\text{m}$, entre 20 e $40 \mu\text{m}$ e $> 40 \mu\text{m}$) em juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com dieta probiótica, prebiótica e controle.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Disposição das dietas dentro dos comedouros inseridos nos aquários durante avaliação do teste de escolha alimentar.....	15
Figura 2	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de juvenil de tilápia-do-Nilo representando local da medição da área total da célula hepatócita (PG). Corte corado em hematoxilina e eosina. Aumento de 10x.....	18
Figura 3	Fotomicrografia de corte histológico de intestino de juvenil de tilápia-do-Nilo, representando local das medidas de altura das vilosidades (L). Corte corado em hematoxilina e eosina. Aumento de 10x.....	19
Figura 4	Fotomicrografia de corte histológico de músculo de juvenil de tilápia-do-Nilo, indicando local das medidas do menor diâmetro das fibras musculares (L). Corte corado em hematoxilina e eosina. Aumento de 4x.....	20
Figura 5	Médias \pm 95% de intervalo de confiança para os valores indexadores \bar{E} frequência de visita ao comedouro (A), quantidade de péletes ingeridos (B), quantidade de péletes ejetados(C) e tempo médio de alimentação (D) pela tilápia, referente às dietas probiótica (PROB), prebiótica (PREB) e controle (CONT). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)	24
Figura 6	Fotomicrografia de corte histológico de fígado de juvenil de tilápia-do-Nilo. A = dieta com probiótica; B = dieta probiótica e C = dieta controle. Letras B e C presença de vacuolização dos hepatócitos. Corte corado em hematoxilina e eosina. Aumento de 10 vezes.....	28
Figura 7	Fotomicrografia de corte histológico de intestino de juvenil de tilápia-do-Nilo. A = dieta probiótica; B = dieta prebiótica e C = dieta controle. Corte corado em hematoxilina e eosina. Aumento de 10 vezes.....	29
Figura 8	Fotomicrografia de corte histológico de musculo de juvenil de tilápia-do-Nilo. A = dieta probiótica, B = dieta prebiótica e C = dieta controle. Letra B com maior diâmetro de fibras musculares. Corte corado em hematoxilina e eosina. Aumento de 4 vezes.....	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1	Local do experimento e adaptação.....	13
2.2	Inclusão dos aditivos na dieta dos peixes	13
2.3	Distribuição dos peixes	14
2.4	Delineamento experimental	14
2.4.1	Teste de escolha alimentar.....	14
2.4.2	Análise de desempenho zootécnico, hematológicos e histológicos.....	16
2.4.2.1	Desempenho zootécnico	16
2.4.2.2	Análise hematológica	17
2.4.2.3	Histologia.....	17
2.4.2.3.1	Histologia do fígado	18
2.4.2.3.2	Histologia do intestino.....	19
2.4.2.3.3	Histologia da fibra muscular.....	19
2.4.2.4	Análises estatística	20
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4	CONCLUSÕES	32
5	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

O território hídrico brasileiro favorece o desenvolvimento do empreendimento aquícola, especialmente a criação de peixes em águas continentais. A produção aquícola é o setor que mais cresce diante de outras atividades agropecuárias, sendo a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) uma das espécies com maior destaque no cultivo mundial, totalizando 4,5 milhões de toneladas (FAO,2018). O Brasil mantém a quarta posição na produção mundial de tilápia, perdendo destaque apenas para a China, Indonésia e Egito. O estado do Paraná lidera a produção de tilápia, com 123 mil toneladas/ano (29,3% total da produção nacional de peixe de água doce), considerando a produção de peixes em geral, a participação paranaense alcança o segundo lugar no país, com 15% de todo o pescado de água doce produzido no Brasil (Peixe BR, 2019).

O avanço da intensificação da produção de peixes e a inserção da conscientização das condições do bem-estar destes indivíduos têm despertado a necessidade de estudos que associam melhores condições para relação entre produtor e animal. O conhecimento do comportamento alimentar dos peixes na aquicultura é importante para que os alimentos e as técnicas de alimentação possam ser projetados para estimular o consumo e, portanto, a sobrevivência e o crescimento, minimizando o gasto de energia metabólica na alimentação (Jobling et al., 1995).

A ausência da procura dos peixes pela dieta, somado aos efeitos do manejo diário podem desencadear a ocorrência de situações estressantes, afetando a homeostase e tornando-os susceptíveis à baixa do sistema imunológico e transgredindo às condições de bem-estar dos peixes. Volpato (2007) definiu que o estado de bem-estar é estabelecido quando o indivíduo apresenta condições de livre escolha, o que transmuta paradigmas na caracterização externa do estado, para a definição interna que emerge do próprio animal “escolha e/ou preferência” propiciando condição de conforto em um determinado momento.

Pereira-da-Silva e Pezzato (1999) observaram a determinação do grau de atrato-palatabilidade em diferentes ingredientes, por meio do teste de escolha alimentar para tilápia-do-Nilo, na qual, foi possível concluir que as respostas comportamentais de escolha da tilápia variam de acordo com o ingrediente oferecido e que parece existir uma correlação positiva entre o grau de atrato-palatabilidade de um ingrediente e a ocorrência de confrontos agonísticos entre os indivíduos.

No cultivo intensivo de tilápias em viveiros a ração é a principal fonte de alimento e responsável pelo maior custo da produção, sendo importante formular dieta equilibrada para maximizar a absorção dos nutrientes pelos peixes e diminuir o desperdício dos alimentos (Oliveira et al., 2014). Contudo, uma ração balanceada perde seu valor nutricional se os peixes não a consumirem em pouco tempo, então a capacidade de atração e palatabilidade são essenciais para uma alimentação eficiente em cultivos aquáticos (Jaime-Ceballos et al., 2007; Tantikitti, 2014).

A expansão das práticas da piscicultura com o avanço de estratégias de produção em sistema intensivo, tem causado estresse e redução da imunidade dos animais, tornando-os vulneráveis a doenças infecciosas (Kubitza, 2011; Amarante et al., 2018; Khati et al., 2018), podendo levar ao surgimento de enfermidades (Khati et al., 2018), resultando em perdas econômicas (Jahangiri e Esteban, 2018).

Nesse contexto, os antibióticos são utilizados como forma de tratamento de doenças ou como promotor de crescimento na criação. Segundo Jatobá et al. (2008); Amarante et al. (2018) a utilização de antibióticos de forma inadequada pode afetar o sistema imunológico dos peixes, causando naturalmente ao aumento da resistência bacteriana.

Devido aos problemas expostos com a utilização de antibióticos tem-se buscado alternativas tais como aditivos alimentares que diminuam a utilização de quimioterápicos na aquicultura, sem causar perdas de produtividade e qualidade final do pescado, garantindo o desenvolvimento sustentável da atividade (Dawood et al., 2018).

Atualmente, os aditivos mais comumente avaliados são os probióticos e os prebióticos, ingredientes estes que possuem microrganismos e fortalecem a microbiota intestinal, podendo assim prevenir doenças e conseqüentemente estimula o sistema imunológico.

Os probióticos são microrganismos benéficos que entram no trato digestivo dos animais, mantêm-se vivos e possuem a habilidade de melhorar a eficiência alimentar, o sistema imunológico e/ou o balanço da relação de bactérias benéficas e patogênicas (Mouriño et al., 2012). Os benefícios resultam na redução das enfermidades, eliminação das bactérias patogênicas e estimulação do sistema imunológico do hospedeiro (Wang et al., 2013), contribuindo com a sanidade dos peixes e com a segurança alimentar (Sahu et al., 2008; Nayak, 2010; Mohapatra et al., 2013). Há evidências da melhora no desempenho zootécnico graças à eficiência na digestibilidade e absorção de nutrientes (Verschuere et al., 2000; Nayak, 2010; Ibrahim, 2015), beneficiando a conversão alimentar e reduzindo o custo ao produtor (Marengoni et al., 2015). Além destes benefícios os aditivos possuem múltiplos mecanismos de

ação direto no hospedeiro ou indiretamente por meio da melhoria da qualidade ambiental, ou da combinação de ambos (Zorriehzahra et al., 2016; Das et al., 2017).

Os prebióticos são compostos alimentares não-digestíveis que estimulam seletivamente o crescimento de bactérias endógenas que beneficiam o hospedeiro (Solis de los Santos et al., 2005). Estudos realizados com prebióticos revelaram resultados promissores em caso de resistência às doenças, desempenho de crescimento, regulação hormonal e estimulação imunológica (Ringo et al., 2014).

O comportamento alimentar dos peixes é complexo e tem sido estudado extensivamente em peixes cultivados. Várias respostas comportamentais foram associadas a métodos de alimentação, hábitos alimentares, frequência de alimentação, mecanismos de detecção de alimentos e preferências alimentares (Kasumyan e Sidorov, 2010). Porém, há necessidade de avaliar se a adição de probiótico ou prebiótico na dieta influencia na escolha alimentar e consequentemente afetam saúde, higidez e bem-estar dos juvenis de tilápia-do-Nilo.

Desta forma, o objetivo desse estudo foi caracterizar por meio de teste comportamental de escolha alimentar da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) a predileção por uma dieta que contenha adição de probiótico ou prebiótico e avaliar os efeitos dos aditivos na escolha do alimento, desempenho zootécnico, contagem total de eritrócitos e contagem total e diferencial de leucócitos e histologia do fígado, intestino e músculo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento e adaptação

O ensaio experimental foi conduzido no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Campus de Toledo no período de 30 de julho a 23 de setembro de 2019. Inicialmente, 30 juvenis machos de tilápia-do-Nilo, com média de $45 \pm 5,3$ g, foram transferidos para uma caixa d'água de 500 L, onde permaneceram durante sete dias para ambientação às condições laboratoriais. Durante essa fase foram alimentados à vontade com uma ração comercial extrusada (Ração Peixes Kowalski[®]) contendo 35% PB (Tabela 1) pela manhã (8h30) e à tarde (14h00).

Tabela 1. Níveis de garantia da ração comercial (Kowalski[®], 2018) utilizada na alimentação da tilápia-do-Nilo.

Ingrediente	Níveis de Garantia (g kg ⁻¹)
Proteína bruta (Max)	350,0
Extrato etéreo (Min)	50,0
Matéria fibrosa (Max)	50,0
Matéria mineral (Max)	80,0
Cálcio (Min)	10,5
Fósforo (Min)	15,0

Composição por kg do suplemento vitamínico-mineral: Vit. C 5.000,0 mg; Vit. A 450,0 mg; Vit. D3 8.000,0 UI; Vit. E 2.100,0 UI; Vit. K3 100,0 UI; Vit. B1 3,0 mg; Vit. B2 2,0 mg; Vit. B6 6,0 mg; Vit. B12 10,0 mg; Biotina 0,5 mg; Antioxidante 120,0 mg; Ác. Nicotínico 30,0 mg; Ác. Pantotênico 10,0 mg; Ác. Fólico 0,5 mg; Fe 40,0 mg; Co 8,0 mg; Mn 70,0 mg; Zn 50,0 mg; Iodo 1,2 mg; Selênio 0,12 mg; Se 0,12 mg.

2.2 Inclusão dos aditivos na dieta dos peixes

Utilizou-se ração comercial com 35% de proteína bruta e 3000 kcal de energia digestível kg⁻¹ de proteína bruta (Tabela 1). Os aditivos foram incorporados à ração por meio do método de aspersão, utilizando uma mistura composta de 2% de óleo vegetal com 5% de aditivo probiótico ou prebiótico, seguindo as recomendações técnicas para compor a dieta com aditivos (Nakandakare et al., 2013) e para dieta controle utilizou a ração comercial com 2% de óleo vegetal. Após este processamento, as dietas foram acondicionadas em potes plásticos, identificados e armazenados adequadamente. O probiótico AquaStar[®] Hatchery (Biomim

Animal Nutrition GmbH) possui em sua composição amido de mandioca, dextrose, *Bacillus subtilis* ($5,0 \times 10^{11}$ UFC kg⁻¹), *Enterococcus faecium* ($1,25 \times 10^{12}$ UFC kg⁻¹), *Lactobacillus reuteri* ($5,0 \times 10^{10}$ UFC kg⁻¹) e *Pediococcus acidilactici* ($1,25 \times 10^{12}$ UFC kg⁻¹). O prebiótico ActiveMOS (*Biorigin Arte em Ingredientes Naturais*) é composto por carboidratos (55%), mananoligosacáridos MOS (25%), β-glucanos (30%), proteína (25%) e fibra crua (3%).

2.3 Distribuição dos peixes

Após o período de aclimação foram selecionados 22 juvenis de tilápia-do-Nilo macho sexualmente revertidos para serem distribuídos em dois ensaios experimentais, sendo 10 juvenis de massa ($46,78 \text{ g} \pm 3,97 \text{ g}$) e tamanho ($13,5 \text{ cm} \pm 2,10 \text{ cm}$), separados para avaliação do teste de escolha alimentar e 12 juvenis machos de massa ($48,52 \pm 3,78 \text{ g}$) tamanho ($14,71 \pm 4,13 \text{ cm}$) para coleta de amostras utilizadas nas análises histológicas, hematológicas e desempenho zootécnico. Os peixes foram separados e transferidos para aquários de vidro com capacidade de 37 L (45 x 35 x 24 cm) contendo um animal por aquário para evitar o efeito hierárquico da tilápia. Utilizou aeração contínua artificial e temperatura da água a 27 °C controlada por meio de termostato durante 56 dias de ensaios. Os aquários foram sifonados todos os dias para retirar acúmulos de resíduos de ração e fezes, garantindo o controle da qualidade de água.

2.4 Delineamento experimental

2.4.1 Teste de escolha alimentar

O teste de escolha alimentar foi realizado contendo um peixe por aquário totalizando 10 unidades experimentais. Três comedouros confeccionados com mangueira siliconada 2 mm, com marcações para identificação dos alimentos foram soltos aleatoriamente sobre a borda da água no aquário (Figura1). Os peixes foram alimentados uma hora antes do início do teste de escolha alimentar com ração comercial a fim de saciar sua fome (Gill e Hart, 1998) e após este período iniciava-se o manejo alimentar dos peixes com as dietas testes sendo oferecidas no mesmo instante aos comedouros identificados. A localização dos comedouros foi sorteada de forma aleatória nos períodos da manhã e tarde para a oferta simultânea de 15

péletes. Imediatamente após a oferta da dieta foram registrados a frequência de visitas aos comedouros, o número de péletes ingeridos, o número de péletes ejetados (Pereira-da-Silva e Pezzato, 1999) e o tempo médio de alimentação durante 10 minutos cronometrados. Considerou-se péletes ejetados aqueles que após apreensão foram devolvidos ao ambiente permanecendo até o final das observações. Decorridos 10 minutos da observação eram realizadas as retidas e contagens de sobra de alimento de cada comedouro referentes às três dietas.

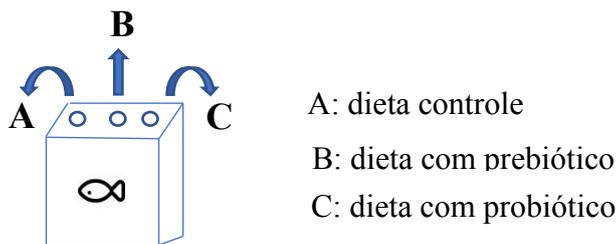


Figura 1. Letras A, B e C indicam a disposição das dietas dentro dos comedouros inseridos nos aquários durante a avaliação do teste de escolha alimentar.

Avaliou-se as variáveis respostas ocasionadas em relação à frequência de visitas aos comedouros, número de péletes ingeridos, número de péletes ejetados e tempo médio de alimentação nos turnos de manhã e tarde, durante 56 dias consecutivos, e em cada um dos 10 indivíduos utilizados. Procedeu-se o seguinte modelo estatístico para obtenção por valores residuais:

$$VR_{i,j,k,l} = \mu_i + \alpha_{ijk} \text{Turno}_j(\text{Dia}_k) + \beta_{ik} \text{Dia}_k + \delta_l \text{Indivíduo} + \varepsilon_{ijkl}$$

Onde:

VR_i = corresponde as variáveis respostas: (I) tempo médio de alimentação em cada dieta, (II) quantidade de pélete ingerido em cada dieta (III), frequências de visitas aos comedouros e (IV) e quantidade de pélete ejetado em cada tratamento.

μ_i = média geral observada em cada variável resposta i ;

$\alpha_{ijk} \text{Turno}_j(\text{Dia}_k)$ = efeito hierárquico do turno j dentro do dia k para cada variável resposta i ;

$\beta_{ik} \text{Dia}_k$ = efeito do Dia k sobre cada variável resposta i ;

δ_l . indivíduo = efeito do Indivíduo l sobre cada variável resposta i ; e

ε_{ijkl} = resíduo observado para cada variável resposta i , removidos os efeitos de Turno j , Dia k e indivíduo l . Desta forma o ε_{ijkl} representa as variações ocorridas que não explicadas pelos fatores envolvidos no modelo.

Assim aplicou-se a investigação da possibilidade de influência dos tratamentos sobre estes valores residuais por meio de análise multivariada de variância (MANOVA), seguida de análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Por meio dos testes de Shapiro-Wilks e Levene pode-se assumir que os resíduos apresentaram distribuição aproximadamente normal e variâncias homogêneas.

2.4.2 Análises de desempenho zootécnico, hematológicos e histológicos

O ensaio para avaliar as análises histológicas, hematológicas e desempenho zootécnico foi constituído aleatoriamente com três dietas e quatro réplicas, sendo um peixe por aquário totalizando 12 unidades experimentais. Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia às 8h, 11h30, 14h e 17h30 até a saciedade aparente, por um período total de 56 dias.

Diariamente no período da tarde e antes do sifonamento dos aquários foram medidos o oxigênio dissolvido ($5,35 \pm 0,30 \text{ mgL}^{-1}$), pH ($7,8 \pm 0,26$) e temperatura ($27 \pm 0,50 \text{ }^\circ\text{C}$) da água dos aquários com uso de sonda multiparâmetro digital YSI 556. Os peixes foram monitorados para verificar eventuais sinais que indicasse diferença no comportamento, tais como, distúrbio natatório, dificuldade em respirar, falta de apetite, letargia entre outros.

2.4.2.1 Desempenho zootécnico

Ao final do período experimental os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas para o esvaziamento do trato gastrointestinal e, posteriormente, foram anestesiados em solução de eugenol contendo 60 mgL^{-1} (Gomes et al., 2001) e abatidos por secção de medula (Pedrazzani et al., 2007). Foram coletadas as medidas individuais de peso (g) com auxílio de uma balança de precisão (0,001g) e do comprimento (cm) com auxílio de um paquímetro metálico, e retirada de sangue para análises hematológicas dos 12 peixes. Os mesmos peixes foram utilizados para coletas de fígados, intestinos e músculos utilizando materiais cirúrgicos (tesoura, pinça e bisturi) e armazenados para as análises histológicas.

As variáveis de desempenho zootécnico avaliados foram o peso final médio (g); comprimento final médio (cm); ganho em peso (GP) = peso corporal final – peso corporal inicial; sobrevivência (SO) = $100 \times (\text{n}^\circ \text{ de peixes no final} / \text{número de peixes inicial})$; ganho em peso diário (GPD) = $(\text{peso corporal final} - \text{peso corporal inicial}) / \text{dia}$; biomassa final (BF) = $\text{n}^\circ \text{ de peixes final} \times \text{peso médio final dos peixes}$; conversão alimentar (CA) = dieta

consumida/ganho em peso; taxa de crescimento específico (TCE) = $100 \times (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{tempo de experimento}$; eficiência alimentar (EA) = $100 \times (\text{ganho de peso} / \text{consumo de ração})$; índice hepatossomático = $100 \times (\text{peso do fígado} / \text{peso corporal final})$; índice viscerossomático = $100 \times (\text{peso das vísceras} / \text{peso corporal final})$.

2.4.2.2 Análise hematológica

Os peixes foram anestesiados em solução de eugenol (60 mg L^{-1}) para a retirada de uma alíquota de 2,0 mL de sangue coletado por punção do vaso caudal com seringa de 3 mL e agulha hipodérmica 20 x 0,55 mm contendo solução anticoagulante Hemstab EDTA 10% (Tavares-Dias e Moraes, 2003). Duas lâminas por peixe foram empregadas para confecção do esfregaço do sangue para posterior análises.

O número de eritrócitos foi determinado pelo método do hemocítômetro em câmara de Neubauer, utilizando-se azul de toluidina (Merck®) a 0,01%, diluído em solução fisiológica (0,9%) em pipeta automática na proporção de 1:200. A obtenção do número de eritrócitos foi realizada logo que retirado o sangue de cada peixe.

Para a contagem diferencial dos leucócitos foram confeccionadas duas lâminas por peixe de cada tratamento. Realizou-se o esfregaço do sangue e posteriormente aplicou-se a coloração com May-Grünwald Giemsa. A contagem foi efetivada em microscópio utilizando-se aumento de 100x e percorrida toda extensão da lâmina em movimento de “zigzag”, conforme descrito por Tavares-Dias e Moraes (2003). Foram contadas 200 células, estabelecendo-se o percentual de linfócito, neutrófilo e monócito.

A contagem total de leucócitos foi realizada por toda extensão da lâmina por meio da relação eritrócito/leucócito. Foram contadas 2000 células marcando-se o número de leucócitos (Ranzani-Paiva et al., 2013).

2.4.2.3 Histologia

As amostras de fígados, intestinos e músculos foram fixadas em formol tamponado 10% durante 24 horas, e posteriormente transferidas para solução de álcool a 70%. Após esse período, o material foi desidratado pela passagem em séries crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 100% I, 100% II, 100% III, diafanizados em xilol e incluídos em parafina histológica,

armazenados em local arejado até a secagem total das amostras e posteriormente realizado os cortes histológicos.

Com o auxílio de um micrótomo (Microm HM 340 E, Thermo Scientific, Alemanha) realizou-se os cortes histológicos transversais semisseriados. Os materiais histológicos foram submetidos à coloração com hematoxilina–eosina (HE) e analisados em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200), acoplado a câmera TrueChrome IIS para capturar os campos de observação. Para captura das imagens utilizou-se o sistema de análise de imagens Image-Pro Plus versão 4.5.

2.4.2.3.1 Histologia do fígado

Foram confeccionadas duas lâminas contendo cinco cortes histológicos transversais de seis micrômetros (μm). Em cada corte histológico foram mensuradas a área total de 40 células aleatoriamente totalizando 200 imagens de hepatócitos por lâmina, utilizando a objetiva de 10x (Figura 2).

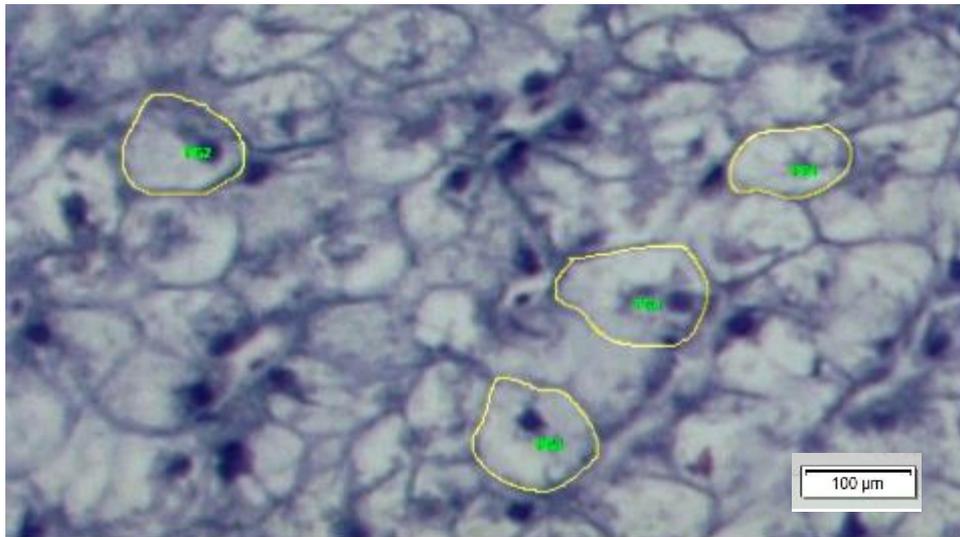


Figura 2. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de juvenil de tilápia-do-Nilo representando local da medição da área total da célula hepatócita (PG). Corte corado em hematoxilina e eosina. Aumento de 10x.

2.4.2.3.2 Histologia do intestino

Os intestinos coletados foram mensurados quanto ao peso e tamanho. A medida do comprimento total do intestino foi realizada abaixo da junção do estômago até o reto. Na sequência foram fracionadas porções de aproximadamente 10 centímetros de comprimento do intestino médio (Gomes et al., 2001) e submetidos a preparação histológica. Os cortes histológicos transversais foram de 5 μm . Utilizou-se objetiva de 10x para capturar os campos de observação e mensurar a altura das vilosidades intestinais e contagem dos números de vilos (Figura 3).

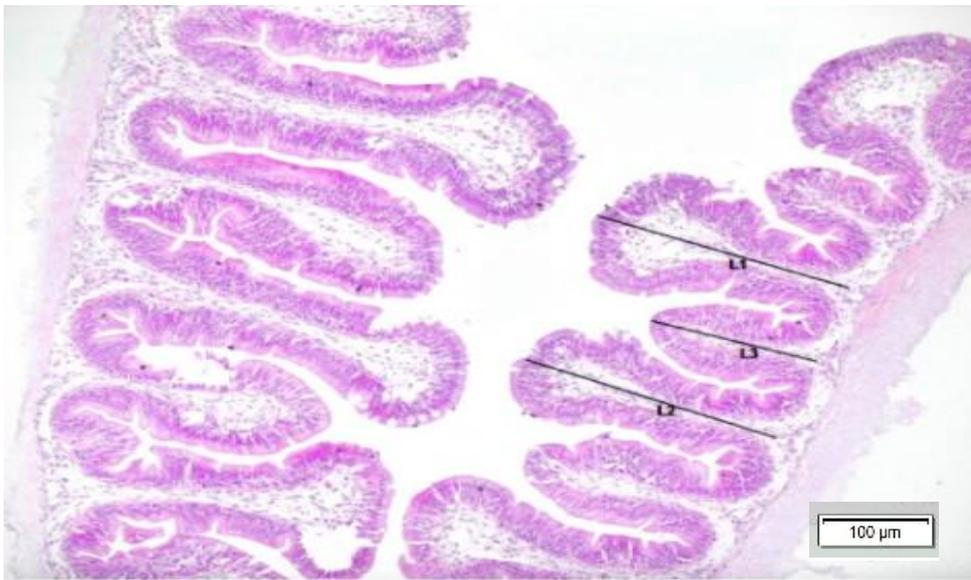


Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de intestino de juvenil de tilápia-do-Nilo, representando local das medidas de altura das vilosidades (L). Corte corado em hematoxilina e eosina. Aumento de 10x.

2.4.2.3.3 Histologia da fibra muscular

Para a avaliação da morfometria das fibras musculares, retirou-se com o auxílio de um bisturi uma amostra do músculo branco dorsal direito, acima da linha lateral. Foram confeccionadas duas lâminas com quatro cortes histológicos transversais de seis micrômetros (μm). Utilizou-se o sistema de análise de imagens capturadas com objetiva de 4x em campos aleatórios. Posteriormente foi determinado o menor diâmetro de 50 fibras musculares por corte

sendo 200 fibras por lâmina (Figura 4), totalizando 800 fibras por dieta. Os dados obtidos foram agrupados em classes de diâmetros (<20, 20-30 e >40 μm) para avaliar a contribuição hiperplasia e hipertrofia para o crescimento muscular em casa dieta utilizada (Almeida et al., 2010).

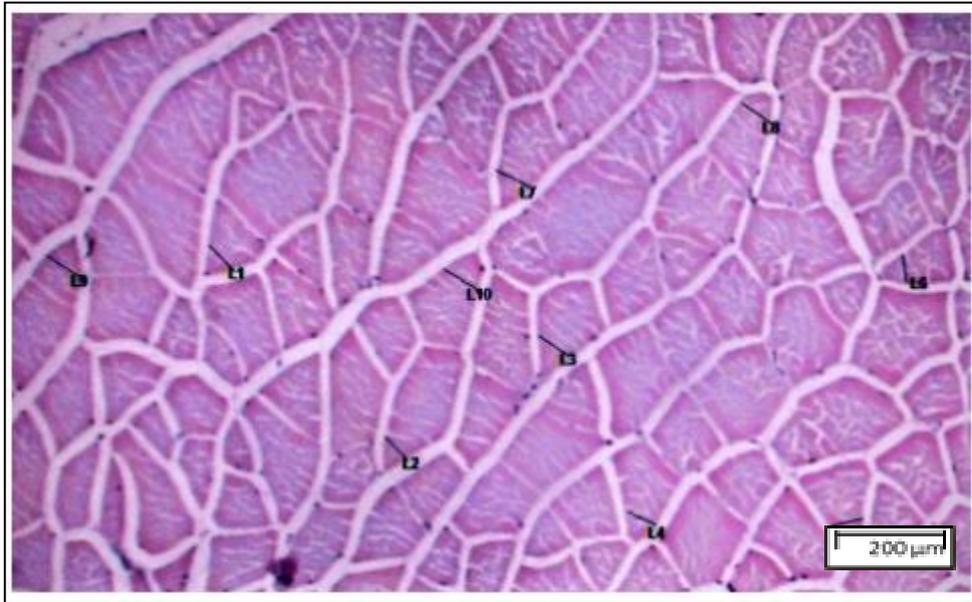


Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico de músculo de juvenil de tilápia-do-Nilo, indicando local das medidas do menor diâmetro das fibras musculares (L). Corte corado em hematoxilina e eosina. Aumento de 4x.

2.4.2.4 Análise estatística

Os indicadores de desempenho zootécnico (peso inicial, peso final, sobrevivência, ganho em peso, ganho em peso diário, consumo de ração, conversão alimentar, eficiência alimentar, biomassa final, taxa de crescimento específico, índice viscerossomático e índice hepatossomático), hematológicos (contagem do número total de eritrócitos, leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos) e histológicos para fígado (área dos hepatócitos, peso dos fígados e índice hepatossomático), intestino (altura das vilosidades, comprimento e do peso do intestino) e músculo (diâmetro de fibras musculares e frequência de distribuição), obtidos no final do experimento foram avaliados pelo modelo de análise de variância:

$$VR_{IDR} = \mu_{i+} \delta_{iD} D_D + \epsilon_{IDR}$$

Onde:

VR= representa cada indivíduo I, acima citado, obtido as dietas D (probiótica, prebiótica e controle), réplicas R (4 para cada tratamento).

Os indicadores significativos ao nível de significância de 5% foram aplicados o teste de comparação múltipla de médias de Tukey. Em cada modelo os resíduos foram checados e atingidos pelos testes de Levene para homogeneidade de variância e Shapiro-Wilks para distribuição normal. Todas as análises foram realizadas pelo software Statistica 7.0[®].

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios da frequência de visita ao comedouro (%), número de péletes ingerido, número de péletes ejetados e tempo médio de alimentação obtidos no teste de escolha alimentar para as tilápias em relação aos turnos de manhã e tarde não diferiram significativamente entre as três dietas avaliadas (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios, erro padrão (EP), intervalo de 95% de confiança (95% IC) e número de observações (N) para frequência de visitas ao comedouro (FQ), quantidade de péletes ingeridos (GI) e ejetados (GE) e tempo médio de alimentação, mensuradas nos turnos de manhã e tarde, nas tilápias submetidas às dietas probiótica (PROB), prebiótica (PREB) e controle (CONT).

Variável	Turno	Dieta	Média	EP	"-95%IC"	" +95%IC"	N
FQ (%)	Manhã	PROB	3,09	0,07	2,94	3,23	560
		PREB	3,06	0,07	2,91	3,21	560
		CONT	3,31	0,08	3,15	3,46	560
	Tarde	PROB	3,29	0,00	3,15	3,43	560
		PREB	3,20	0,07	3,06	3,34	560
		CONT	3,45	0,07	3,31	3,59	560
QI (nº péletes)	Manhã	PROB	10,07	0,26	9,56	10,57	560
		PREB	9,92	0,26	9,41	10,44	560
		CONT	10,57	0,25	10,07	11,07	560
	Tarde	PROB	10,69	0,25	10,21	11,18	560
		PREB	10,29	0,25	9,79	10,78	560
		CONT	11,10	0,24	10,63	11,57	560
QE (nº péletes)	Manhã	PROB	0,04	0,01	0,09	0,06	560
		PREB	0,03	0,01	0,02	0,05	560
		CONT	0,01	0,01	0,00	0,02	560
	Tarde	PROB	0,01	0,01	0,00	0,02	560
		PREB	0,01	0,00	0,00	0,02	560
		CONT	0,01	0,00	0,00	0,02	560
TP (segundos)	Manhã	PROB	62,29	3,69	55,05	69,53	560
		PREB	59,07	3,38	52,42	65,72	560
		CONT	66,30	3,71	59,01	73,60	560
	Tarde	PROB	59,22	3,22	52,89	65,56	560
		PREB	63,42	3,58	56,40	70,45	560
		CONT	61,95	3,57	54,94	68,95	560

Considerando que não foi observada diferença ($P > 0,05$) na frequência média das visitas aos comedouros pode-se inferir que não houve efeito de atratividade para o peixe entre as três dietas. Os atrativos são classificados como compostos com capacidade de direcionar o peixe até o alimento e estimular o consumo, auxiliando na orientação, detecção e natação até fonte alimentar (Pastore et al., 2013). Entretanto, os palatabilizantes auxiliam na iniciação e na continuação do consumo dos peixes para um tipo de alimento em particular.

A quantidade de péletes ingeridos pelas tilápias aos 10 minutos de observação nos turnos da manhã e tarde não diferiram ($P > 0,05$) entre as três dietas avaliadas (Tabela 2). Os valores médios de péletes ejetados pelas tilápias também não apresentaram efeitos significativos, entretanto, a dieta controle avaliada no turno da manhã apresentou menor número de péletes ejetados possivelmente devido aos possíveis atributos de palatabilidade na ausência dos aditivos. Estes resultados assemelham-se com os testes de escolha alimentar descrito por Pereira-da-Silva e Pezzato (2000), corroborando com estudos encontrados anteriormente por Mearns et al (1987).

O procedimento estatístico adotado para avaliação dos resultados indicou que as dietas tiveram influência ($P > 0,05$) sobre o número de péletes ingeridos pela tilápia-do-Nilo (MANOVA: Wilks = 0,9921; $F_{(8, 6706)} = 3,30$; $P = 0,0009$). A média de péletes ingeridos pelos peixes submetidos à dieta controle foi superior ($P < 0,05$) em relação às dietas com aditivos (Figura 5 B). Os resultados obtidos neste ensaio são similares aos descritos por Pereira-da-Silva e Pezzato (2000) que também encontraram maior consumo na quantidade de péletes ingeridos da dieta controle em relação às demais dietas avaliadas. Nesse contexto, Sado et al. (2008) constataram que a adição de mananoligossacarídeos para tilápia-do-Nilo provocou a redução do consumo de ração, atribuindo este fato a baixa digestibilidade dos carboidratos constituintes nas dietas.

A quantidade de péletes ejetados (ANOVA: $F_{(2, 3356)} = 0,696$; $P = 0,083$) e o tempo médio de alimentação (ANOVA: $F_{(92,33560)} = 0,696$; $P = 0,50$) não apresentaram efeitos significativos em relação as três dietas avaliadas (Figuras 5C e 5D). Os resultados não evidenciam a comprovação da hipótese que o aumento da frequência de visitas ao comedouro e a quantidade de péletes ingeridos resultariam em menor quantidade de péletes ejetados e tempo de alimentação.

Na Figura 5A verifica-se que ocorreram diferenças relevantes na frequência de visita ao comedouro (ANOVA: $F_{(2, 3356)} = 8,155$; $P = 0,0003$). A frequência de visitas das tilápias aos comedouros contendo a dieta controle foi superior às observadas dos peixes submetidos às dietas contendo probiótico ou prebiótico. Diferentemente dos resultados encontrados para tilápia foi

observado que o robalo (*Centropomus undecimalis*) não cria predileção por uma dieta, orientando-se em direção a qualquer movimentação na água para obter alimento, devido a plasticidade desta espécie em seu habitat alimentar trófico (Bórquez e Cerqueira, 1998).

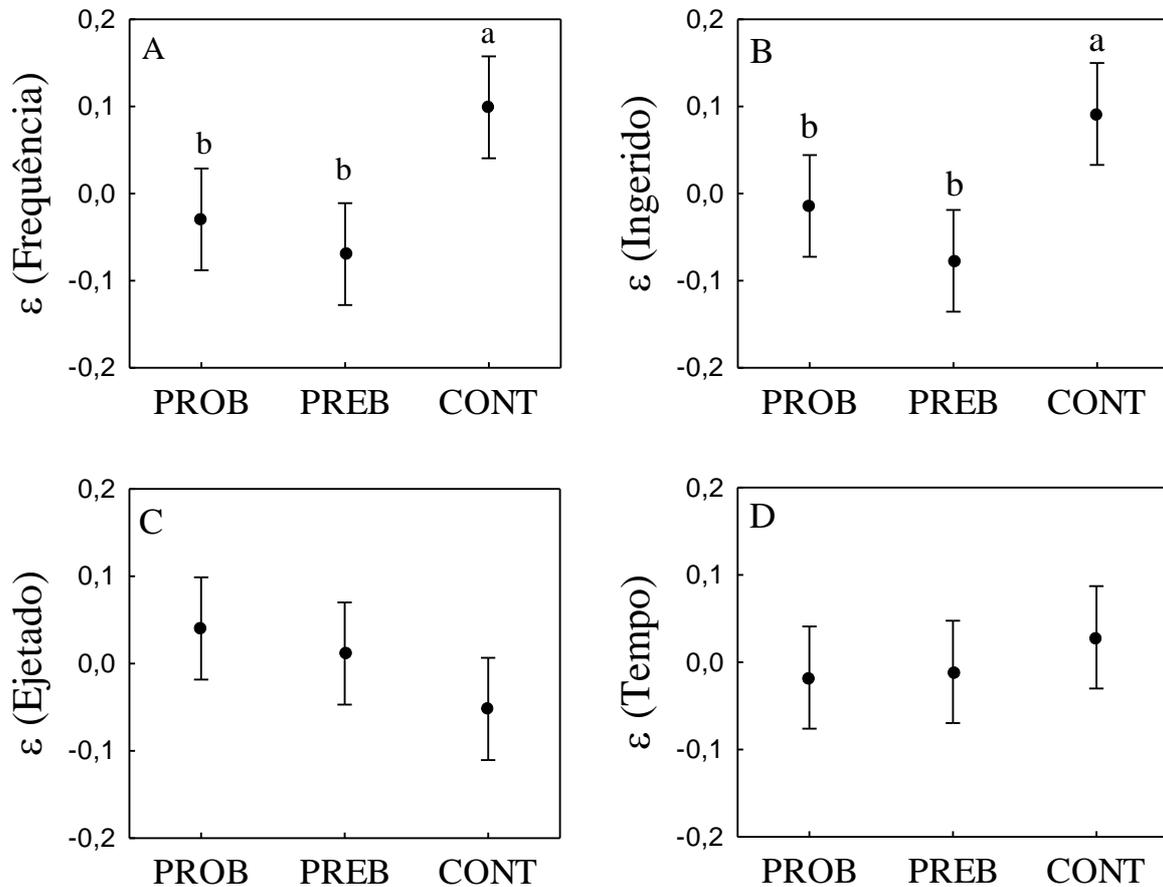


Figura5. Médias \pm 95% de intervalo de confiança para os valores indexadores ϵ frequência de visita ao comedouro (A), quantidade de péletes ingeridos (B), quantidade de péletes ejetados (C) e tempo médio de alimentação (D) pela tilápia, referente às dietas probiótica (PROB), prebiótica (PREB) e controle (CONT). Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Analisando os parâmetros de desempenho zootécnico observou-se que não houve diferenças significativas para peso inicial, peso final, ganho em peso, ganho em peso diário, ganho em peso médio, consumo de ração, conversão alimentar, eficiência alimentar, biomassa final, taxa de crescimento específico, índice viscerossomático e índice hepatossomático, em relação às dietas probiótica, prebiótica e controle para juvenis de tilápia-do-Nilo no período de 56 dias (Tabela 3).

Os resultados encontrados para os parâmetros de desempenho zootécnico de tilápia-do-Nilo, utilizando *B. subtilis* (Nakandakare, 2010), *B. subtilis* ou mananoligossacarídeo (Carvalho

et al., 2011) , MOS (Schwarz et al., 2011; Morschbacher et al., 2014) e probiótico, prebiótico e simbiótico (Azevedo et al., 2015) também não evidenciaram influência sobre os parâmetros zootécnicos assim como neste trabalho. Entretanto, Aly et al. (2008) observaram maior ganho em peso em alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com dieta contendo adição de *B. subtilis* na ração (1×10^7 UFC g^{-1}), em comparação aos alevinos alimentados com dieta controle.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão para cada variável resposta: PI = peso inicial; PF = peso final; SO = sobrevivência; GP = ganho em peso; GPD = ganho em peso diário; CR = consumo de ração; CA = conversão alimentar; EF = eficiência alimentar; BF = biomassa final; TCE = taxa de crescimento específico; IVS = índice viscerossomático e IHS = índice hepatossomático, das tilápias submetidas às dietas probiótica (PROB), prebiótica (PREB) e controle (CONT).

Variável	Dieta			Valor P
	Probiótica	Prebiótica	Controle	
PI (g)	48,52 ± 3,78	46,29 ± 2,06	46,01 ± 1,88	0,39604
PF (g)	135,19 ± 29,39	151,36 ± 36,23	169,43 ± 32,92	0,37316
SO (%)	100	100	100	-
GP (g)	86,67 ± 27,54	105,07 ± 35,13	123,42 ± 32,98	0,31534
GPD (g)	1,55 ± 0,50	1,88 ± 0,63	2,20 ± 0,59	0,31534
CR (g)	202,34 ± 24,15	194,1 ± 14,97	197,11 ± 13,08	0,81508
CA (%)	2,68 ± 1,48	2,07 ± 0,89	1,70 ± 0,49	0,34619
EF (%)	0,17 ± 0,05	0,207 ± 0,06	0,244 ± 0,06	0,27092
BF (g)	135,19 ± 29,39	151,36 ± 36,23	169,43 ± 31,93	0,37316
TCE (%)	1,80 ± 0,37	2,075 ± 0,41	2,30 ± 0,36	0,22571
IVS (%)	2,23 ± 0,46	2,00 ± 0,58	3,36 ± 1,93	0,36177
IHS (%)	2,08 ± 0,88	2,46 ± 0,35	1,28 ± 0,53	0,06552

Os ensaios experimentais foram realizados em ambientes controlados com temperatura $27 \pm 0,50$ °C considerada ótima para a espécie. Os aditivos avaliados não tiveram uma ação significativa no desempenho de juvenis de tilápia-do-Nilo, provavelmente devido à ausência de um efeito desafiador para o probiótico e prebiótico atuarem. Porém, o uso de probióticos na temperatura ideal para trutas resultaram em desempenho favorável ao crescimento e sobrevivência, além de melhorar o bem-estar dos peixes (Merrifield et al., 2010; Bagheri, 2008; Azari et al., 2011).

Estudos realizados por Buentello et al. (2010) têm demonstrado ausência de efeito de dietas prebióticas para peixes em desempenho produtivo, enquanto Azevedo et al. (2015) relataram a melhoria do crescimento de juvenis de tilápia-do-Nilo adicionando prebiótico. Para dietas probióticas também é possível observar uma vasta variação de resultados que podem ser

explicadas por modificações estruturais dos aditivos utilizados nas dietas além da espécie, idade, tamanho, categoria de peso dos peixes ou diferentes condições experimentais (Mehrim, 2009).

Estudos realizados por Ripamonti et al. (2011) reforçaram o conceito que a relação probiótico hospedeiro deve ser de espécie específica, ou seja, que a cepa *B. subtilis* pode não ser uma cepa adequada para ser utilizada como aditivo para a espécie de tilápia-do-Nilo.

A adição de probiótico ou prebiótico nas dietas dos juvenis de tilápia-do-Nilo não influenciou ($P>0,05$) no número de eritrócitos (Tabela 4). Os valores de eritrócitos quando não apresentam diferenças entre dietas avaliadas indicam a integridade na saúde dos peixes (Barros et al., 2009; Harikrishnan et al., 2010). Entretanto, El-Rhman et al. (2009) encontraram valores de eritrócitos maiores em tilápias do grupo controle em experimento com probióticos contendo espécies de *Pseudomonas*. Signor et al. (2010) verificaram que o número de eritrócitos circulantes em tilápia estimuladas ao frio foi influenciado negativamente por níveis de inclusão de probiótico na dieta contendo *S. cerevisiae* autolizada e zinco.

Tabela 4. Valores médios e erro padrão (número μL^{-1}) do número total de eritrócitos, leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos dos juvenis de tilápia-do-Nilo, alimentadas com adição de probiótico ou prebiótico na dieta.

Dieta	Eritrócito	Leucócito	Linfócito	Monócito	Neutrófilo
PROB	1066667±71121	44785±3787b	42744±3230b	663±186b	1376±893
PREB	1245000±14142	72009±62700b	69991±60810b	824±674b	1192±940
CONT	760000±7549	92473±87685a	89213±85054a	1606±1458a	1654±876

PROB = probiótica, PREB = prebiótica e CONT = controle. Letras distintas na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Os valores de leucócitos, linfócitos e monócitos nos peixes submetidos à dieta controle foram superiores aos encontrados nos peixes alimentados com aditivos dietários no período de 56 dias ($P<0,05$), porém não foram encontradas diferenças significativas nos valores das variáveis hematológicas avaliadas entre as dietas probiótica e prebiótica (Tabela 4).

Merrifield et al. (2010) também avaliaram contagem diferencial de leucócitos e contagem total de trombócitos, porém em truta arco-íris suplementada com *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Enterococcus faecium* e não obtiveram resultados significativos das dietas com aditivos em relação à dieta controle. Diferentemente dos estudos hematológicos realizados em juvenis de tilápia-do-Nilo, Talpur et al. (2014) obtiveram resultados significativos no

experimento com *Channa striata* suplementada com *Lactobacillus acidophilus*, observando aumento do número total de leucócitos indicando possível efeito imunestimulante.

A adição de probióticos na alimentação pode aumentar o número de eritrócitos, granulócitos, macrófagos e linfócitos em espécies de peixes (Kumar et al., 2008). Porém, na avaliação hematológica do presente estudo não foi observado efeito significativo no número de células brancas com o fornecimento do probiótico ou prebiótico. Possivelmente a ausência dos efeitos dos aditivos na contagem dos eritrócitos em juvenis de tilápia-do-Nilo deve-se à curta duração dos ensaios em 56 dias, não possibilitando a detecção das mudanças pela metodologia empregada.

O número de linfócitos e monócitos dos juvenis de tilápia-do-Nilo submetidos à dieta prebiótica foram inferiores aos observados à dieta controle. Nesse contexto, a adição de mananoligossacarídeos para carpa (*Cyprinus carpio*) não apresentaram diferenças significativas nos valores de linfócitos e monócitos, em relação ao grupo controle (Jafari et al., 2013). Entretanto, no trabalho com utilização de dietas suplementadas com MOS (0,0; 1,0; 2,0 e 4,0 g kg⁻¹) para alevinos de *Labeo rohita*, por 60 dias, foi encontrado aumento significativo na quantidade de leucócitos totais nos peixes que receberam a dieta com 1,0 g kg⁻¹ de MOS em relação às demais dietas (Andrews et al., 2009).

Neste trabalho não foram encontrados basófilos ou eosinófilos, nem seus precursores no sangue. Estas células normalmente em peixes, ocorrem em número muito baixo, não passando de 1,5% dos leucócitos totais, aparecendo em maior quantidade quando os animais apresentam alguma reação causada por enfermidades ou infecção parasitária (Ranzani-paiva et al., 2013).

A utilização de probiótico na dieta dos peixes pode provocar imunestimulação (Jatobá et al., 2011), recomendando fornecer o aditivo antes de situações de alto estresse ou períodos de incidência de doenças, para o organismo estar preparado às possíveis infecções.

O fígado atua como glândula exócrina liberando secreções em uma superfície externa, e como glândula endócrina, já que também libera substâncias no sangue e nos vasos linfáticos sendo responsável pela fisiologia do animal, formado basicamente por hepatócitos, células com alto potencial mitótico (Costa et al., 2012), que desempenha muitas funções importantes dentro do organismo, tais como o armazenamento e liberação de glicose, metabolismo dos lipídeos, metabolismo das proteínas.

A morfologia do fígado caracterizada pela área total dos hepatócitos de juvenis de tilápia-do-Nilo foi influenciada pela adição de dieta prebiótica (P<0,05). A área do hepatócito dos peixes submetidos à dieta prebiótica apresentou-se superior em relação às demais dietas. Porém,

a área dos hepatócitos dos juvenis alimentados com dietas prebiótica e controle não diferiram entre si (Tabela 5).

Tabela 5. Valores médios da área dos hepatócitos (μm^2), peso dos fígados (g) e índice hepatossomático (IHS, %) para tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas probiótica ou prebiótica por 56 dias.

Variável	Dieta		
	Probiótica	Prebiótica	Controle
Área hepatócito (μm^2)	161 \pm 32,83a	145,01 \pm 36,16b	140,48 \pm 34,37b
Fígado (g)	3,00 \pm 1,61	3,82 \pm 1,34	2,07 \pm 0,57
IHS (%)	2,08 \pm 0,88	2,46 \pm 0,35	1,28 \pm 0,53

Letras distintas na mesma linha diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os peixes submetidos às dietas probiótica, prebiótica e controle não apresentaram lesões nos fígados, porém foram observadas presença de vacuolização dos hepatócitos nos peixes que receberam dietas compostas por prebiótico ou controle (Figuras 6B e 6C). Os dados de vacuolização dos hepatócitos corroboram o deslocamento do núcleo para a periferia, o que pode ser um indicativo de grande presença de gorduras no fígado dos peixes (Graciano et al., 2010). Sendo assim, infere-se que o uso da dieta probiótica atuou de maneira benéfica no organismo das tilápias, impedindo os danos teciduais ao ponto de interferir nas funções hepáticas, aumentando a área de hepatócitos e não apresentando vacuolização.

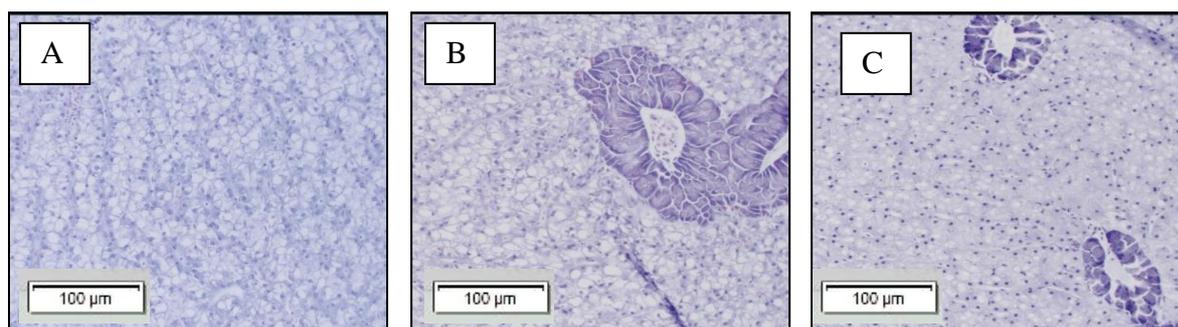


Figura 6. Fotomicrografia de corte histológico de fígado de juvenil de tilápia-do-Nilo. A = dieta com probiótica; B = dieta prebiótica e C = dieta controle. Letras B e C presença de vacuolização dos hepatócitos. Corte corado em hematoxilina e eosina. Aumento de 10 vezes.

As alterações dos hepatócitos podem estar relacionadas à nutrição inadequada (Rašković et al., 2011). Os estudos realizados por Romano et al. (2016), avaliando o uso do ácido orgânico

citrato de sódio durante 50 dias para tilápia, notaram que os animais suplementados apresentaram danos hepáticos como hemorragias, necrose e respostas inflamatórias.

A utilização de probiótico e prebiótico adicionados a ração comercial não influenciou ($P>0,05$) no número de vilos, altura da vilosidade intestinal, comprimento e peso do intestino dos juvenis de tilápia-do-Nilo (Tabela 6).

Tabela 6. Número de vilosidades por segmento, valores médios e desvio padrão da altura das vilosidades (μm), do comprimento e do peso do intestino de tilápia-do-Nilo submetidas às dietas probiótica, prebiótica e controle.

Dieta	Nº de Vilos	Intestino (cm)	Intestino (g)	Altura de vilos (μm)
Probiótica	21	258,88 \pm 85,50	98,65 \pm 31,82	3,09 \pm 1,18
Prebiótica	21	219,70 \pm 96,31	108,01 \pm 23,45	3,13 \pm 1,26
Controle	20	265,73 \pm 72,25	125,25 \pm 26,83	5,60 \pm 3,11

Neste trabalho não houve diferenças na altura de vilos entre os peixes que receberam dietas compostas por probiótico e prebiótico em relação à dieta controle (Figura 7), sugerindo que as dietas impostas aos juvenis não foram capazes de beneficiar ou prejudicar a altura de vilos.

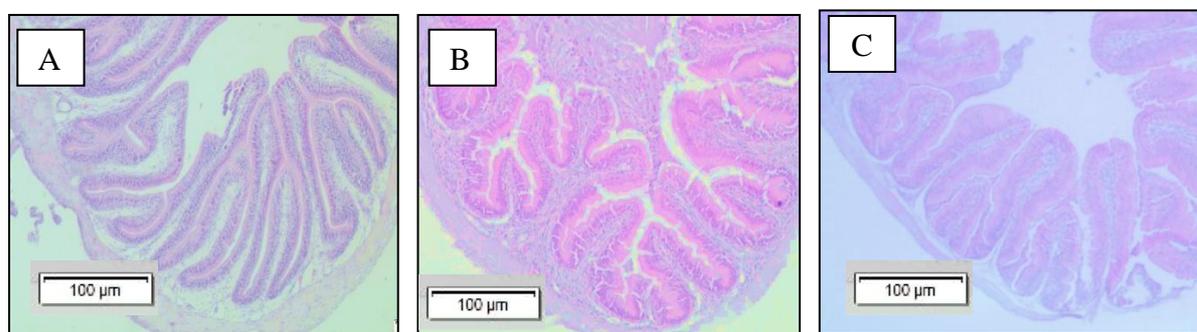


Figura 7. Fotomicrografia de corte histológico de intestino de juvenil de tilápia-do-Nilo. A = dieta probiótica; B = dieta prebiótica e C = dieta controle. Corte corado em hematoxilina e eosina. Aumento de 10 vezes.

A diminuição na altura de vilos poderia resultar em menor absorção de nutrientes (Arruda et al., 2008). O aumento da altura das vilosidades pode ser entendido como a melhora na integridade da mucosa, o que permite um melhor desenvolvimento do intestino. Segundo Wang et al. (2009) as vilosidades dos intestinos quanto mais altas resultam em maior capacidade de absorção dos nutrientes, devido ao aumento da superfície em contato com o alimento.

Resultados diferentes deste trabalho foram encontrados por Carvalho et al. (2011) que ao adicionar uma dieta probiótica ou prebiótica para tilápia-do-Nilo resultou em maior tamanho das vilosidades quando comparado ao controle. Diferenças também foram observadas por Dimitroglou et al. (2010), em que peixes da espécie *Diplodus sargus* suplementados com MOS apresentaram aumento significativo da altura das vilosidades em 12% e a área de absorção em 26%. Zhou et al. (2010) observaram o aumento significativo da altura das vilosidades com a adição de mananoligossacarídeos na dieta para “red drum” (*Sciaenops ocellatus*).

As divergências entre os resultados encontrados em outros estudos e os obtidos das análises histológicas do intestino de juvenis de tilápia podem estar relacionadas à idade do peixe, composição do probiótico utilizado, viabilidade de microrganismos a serem agregados às rações e suas condições de armazenamento, entre outros fatores. Faria Filho et al. (2009) afirmam que vários aspectos como dosagem inadequada dos microrganismos que compõem os probióticos, falta de desafio sanitário em condições experimentais e uma possível competição com o hospedeiro por nutrientes, podem contribuir para a não expressão de respostas favoráveis ao desempenho quando da utilização de probióticos.

O tecido muscular representa a maior parte da massa corporal dos peixes constituído de 24 a 60 % do peso total do animal composta por fibras musculares, localizada abaixo da membrana plasmática (Almeida et al., 2008). Verifica-se que houve efeito significativo das dietas avaliadas para as variáveis diâmetro das fibras e frequência de distribuição em classes de diâmetro de fibras musculares de juvenis de tilápia-do-Nilo (Tabela 7). Os peixes submetidos à dieta contendo a adição de prebiótico apresentaram-se maior diâmetro das fibras mensuradas e maior frequência de distribuição na classe de diâmetro superior a 40 μm em relação às dietas probiótica e controle ($P < 0,05$).

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão do diâmetro de fibras musculares e frequência de distribuição em três classes de diâmetros (<20 μm , entre 20 e 40 μm e > 40 μm) em juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados com dietas probiótica, prebiótica e controle.

Dieta	Diâmetro da fibra (μm)	Classe de diâmetro (μm)		
		<20	20 a 40 μm	>40 μm
Probiótica	27,07 \pm 5,15 b	46a	739 ^a	15b
Prebiótica	31,18 \pm 7,38 a	38a	648b	114a
Controle	29,02 \pm 6,15 b	31a	718a	51b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$), pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

A frequência de fibras na classe de diâmetro inferior a 20 μm não foi influenciada pelas dietas. As maiores frequências de fibras musculares na classe de diâmetro entre 20 a 40 μm foram verificadas nos peixes submetidos às dietas probiótica ou controle em relação à dieta prebiótica ($P < 0,05$). A alta frequência de fibras com diâmetros menores que 40 μm e superiores a 20 μm encontradas em juvenis de tilápia-do-Nilo estão de acordo com a proposta de Neu et al. (2016).

Os peixes alimentados com dieta prebiótica obtiveram maior frequência de distribuição de fibras na classe de diâmetro superior a 40 μm em relação aos peixes submetidos às dietas probiótica e controle ($P < 0,05$), refletindo na menor destruição de fibras encontradas na classe de diâmetros entre 20 μm a 40 μm . Isto pode indicar uma superioridade da dieta com prebiótico no desenvolvimento hipertrófico celular, o que não quer dizer uma vantagem em desempenho, já que este processo hipertrófico da fibra muscular pode estar relacionado com uma estabilização do crescimento precocemente (Melo et al., 2016).

A análise da frequência de classes de fibras musculares para juvenis de tilápia-do-Nilo submetidas às dietas probiótica ou prebiótica foi caracterizada pela ação da hiperplasia e início de hipertrofia ao final do período experimental de 56 dias (Figura 8).

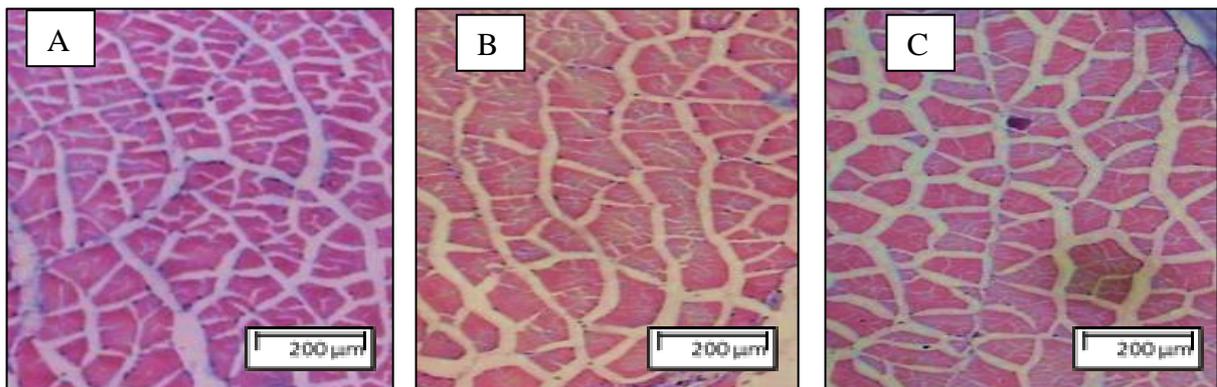


Figura 8. Fotomicrografia de corte histológico de musculo de juvenil de tilápia-do-Nilo. A = dieta probiótica, B = dieta prebiótica e C = dieta controle. Letra B com maior diâmetro de fibras musculares. Corte corado em hematoxilina e eosina. Aumento de 4 vezes.

As fibras menores de 20 μm indicam ocorrência de intensa hiperplasia, que é um processo de crescimento mais evidente durante a fase juvenil do indivíduo. Diâmetros de fibra entre de 20 μm a 40 μm indicam final de hiperplasia com início de hipertrofia que são encontrados em peixes juvenis com início da fase adulta. Fibras maiores de 40 μm caracteriza fase de hipertrofia mais intensa e mais evidente durante a fase adulta (Rowlerson e Veggeti, 2001).

4 CONCLUSÕES

A adição de probiótico ou prebiótico à ração comercial, nas condições do teste de escolha alimentar para juvenis de tilápia-do-Nilo, influencia a frequência de visita ao comedouro e quantidade de péletes ingeridos, independente do turno avaliado, sugerindo possíveis efeitos negativos de palatabilidade e atratividade das dietas com aditivos.

O uso de aditivos não contribui favoravelmente para o desempenho zootécnico e quantidade de vilos e altura de vilosidades do intestino nos juvenis de tilápia-do-Nilo cultivadas em condições laboratoriais durante 56 dias.

A utilização de dieta probiótica promove o aumento da área das células dos hepatócitos, enquanto a prebiótica contribui para o aumento do diâmetro de fibras e na frequência de distribuição das classes de diâmetro.

O aditivo probiótico ou prebiótico não influencia no número de eritrócitos e neutrófilos, porém afeta a quantidade de leucócitos, linfócitos e monócitos dos juvenis de tilápia-do-Nilo indicando a integridade na saúde e o bem-estar dos peixes.

5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F. L. A.; PESSOTTI, N. S.; PINHAL, D.; PADOVANI, C. R.; LEITÃO, N. J.; CARVALHO, R. F.; MARTINS, C.; PORTELLA, M. C.; DAL PAI-SILVA, M. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. **Micron**, v. 41, n. 8, p. 997-1004, 2010.

ALY, S. M.; AHMED, Y. A. G.; GHAREEB, A. A. A.; MOHAMED, M. M. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1-2, p. 128-136, 2008. DOI: [10.1016/j.fsi.2008.03.013](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.013).

AMARANTE, J. F.; KOLLING, L.; FERRONATO, A. I.; VARGAS, A. C.; COSTA, M. M.; AMARANTE, T. A. B. Resistência aos antimicrobianos de bactérias obtidas de carpas (*Cyprinus carpio*) cultivadas em sistema semi-intensivo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, e-34647. p. 1-7, 2018. DOI: [10.1590/1809-6891v19e-34647](https://doi.org/10.1590/1809-6891v19e-34647).

ANDREWS, S. R.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; KUMAR, S. Hematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 1, p. 61-69, 2009. DOI: [10.1111/j.1365-2109.2009.02304.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02304.x).

ARRUDA, A. M. V.; FERNANDES, R. T. V.; SILVA, J. M.; LOPES, D. C. Avaliação morfo-histológica da mucosa intestinal de coelhos alimentados com diferentes níveis e fontes de fibra. **Revista Caatinga**, v. 21, n. 2, p. 1-11, 2008.

AZARI, A. H.; HASHIM, R.; AZARI TAKAMI, G.; FARABI, S. M. V.; DARVISH, M.; SAFARI, R. Effect of (GroBiotic®-A) on the growth performance and intestinal microflora on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Journal of Research in Biology**, v. 1, n. 5, p. 325-334, 2011. DOI: [10.1111/j.1365-2095.2009.00688.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00688.x).

AZEVEDO, R. V.; FOSSE-FILHO, J. C.; CARDOSO, L. D.; MATTOS, D. C.; VIDAL-JÚNIOR, M. V.; ANDRADE, D. R. Economic evaluation of prebiotics, probiotics and

symbiotics in juvenile Nile tilapia. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 1, p. 72-79, 2015. DOI: 10.1590/S1806-66902015000100009.

BAGHERI, T.; HEDAYATI, S. A.; YAVARI, V.; ALIZADE, M.; FARZANFAR, A. Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 8, n. 1, p. 43-48, 2008.

BARROS, M. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PEZZATO, L. E.; FALCON, D. R.; GUIMARÃES, I. G. Hematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) fed diets containing folic acid. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 8, p. 895-903, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02175.x.

BÓRQUEZ, A.; CERQUEIRA, V. R. Feeding behavior in juvenile snook, (*Centropomus undecimalis*). Individual effect of some chemical substances. **Aquaculture**, v. 169, n. 1-2, p. 25-35, 1998. DOI: [10.1016/S0044-8486\(98\)00331-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00331-7).

BUENTELLO, J. A.; NEILL, W. H.; GATLIN, D. M. Effects of dietary prebiotics on the growth, feed efficiency and non-specific immunity of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus* fed soybean-based diets. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 3, p. 411-418, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02178.x.

CARVALHO, J. V.; LIRA, A. D.; COSTA, D. S. P.; MOREIRA, E. L. Desempenho zootécnico e morfometria intestinal de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com *Bacillus subtilis* ou mananoligossacarídeo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 1, p. 176-187, 2011. DOI: 10.1590/S1519-99402014000100024.

COSTA, R. F. R.; SANTOS, I. F.; SANTANA, A. P.; TORTELLY, R. N.; ELMIRO R. F.; RUBENS, T. C.; EULÓGIO, C. Q.; MENEZES, R. C. Caracterização das lesões por (*Cysticercus bovis*), na inspeção post mortem de bovinos, pelos exames macroscópico, histopatológico e pela

reação em cadeia da polimerase (PCR). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 477-484 212, 2012. DOI: [10.1590/S0100-736X2012000600002](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000600002).

DAS, S.; MONDAL, K.; HAQUE, S. A review on application of probiotic, prebiotic and symbiotic for sustainable development of aquaculture. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 5, n. 2, p. 422-429, 2017.

DAWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S.; ABEL-DAIM, M. M.; VAN DOAN, H. Probiotic application for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, 2018. DOI: [10.1111/raq.12272](https://doi.org/10.1111/raq.12272)

DIMITROGLOU, A.; DAVIES, S. J.; SWEETMAN, J.; PASCAL, D.; CHATZIFOTIS, S. Dietary supplementation of mannanoligosaccharide on white sea bream (*Diplodus sargus* L.) larvae: effects on development, gut morphology and salinity tolerance. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 9. p. 245-251, 2010. DOI: [10.1111/j.1365-2109.2010.02513.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02513.x).

EL-RHMAN, A. M.; KHATTAB, Y. A.; SHALABY, A. M. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 175-180, 2009. DOI: [10.1016/j.fsi.2009.03.020](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.020).

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture** – meeting the sustainable development goals. Rome: FAO, 2018. 227 p.

FARIA FILHO, D. E.; TORRES, K. A. A.; FARIA, D. E.; CAMPOS, D. M. B.; ROSA, P. S. Probiotics for broiler chickens in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 2, p. 89-98, 2006. DOI: [10.1590/S1516-635X2006000200004](https://doi.org/10.1590/S1516-635X2006000200004)

GILL, A. B.; HART, P. J. B. Stomach capacity as a directing factor in prey size selection of three-spined stickleback. **Journal of Fish Biology**, v. 53, n. 4, p. 897-900, 1998. DOI: [10.1006/jfbi.1998.0741](https://doi.org/10.1006/jfbi.1998.0741).

GOMES, L. C.; CHIPARI-GOMES, A. R.; LOPES, N. P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui (*Colossoma*

macropomum. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 32, n. 4, p. 426-431, 2001 DOI: [10.1111/j.1749-7345.2001.tb00470.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb00470.x).

GRACIANO, T. S.; NATALI, M. R. M.; VIDAL, L. V.O.; MICHELATO, M.; RIGHETTI, J. S.; FURUYA, W. M. Performance and hepatic morphology of Nile tilapia juveniles fed methionine and choline supplemented diets. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 7, p. 376-381, 2010. DOI: 10.1590/S0100-204X2010000700015.

HARIKRISHNAN. R.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. S. Supplementation diet containing probiotics, herbal and azadirachtin on hematological and biochemical changes in *Cirrhina mrigala* against *Aphanomyces invadans*. **Fisheries and Aquaculture Journal**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2010. DOI: [10.4172/2150-3508.1000004](https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000004)

IBRAHEM, M. D. Evolution of probiotics in aquatic world: potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 6, p. 765-791, 2015. DOI: [10.1016/j.jare.2013.12.004](https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.004).

JAIME-CEBALLOS, B. R.; CIVERA-CERECEDO, H.; VILLARREAL, J.; GALINDO-LÓPEZ; L. PÉREZ-JAR. Uso de la harina de *Spirulina platensis* como atrayente em el alimento para el camarón *Litopenaeus schmitti*. **Hidrobiológica**, v. 17, n. 2, p. 113-117, 2007.

JAHANGIRI, L.; ESTEBAN, M. Administration of probiotics in the water in finfish aquaculture systems: A review. **Fishes**, v. 3, n. 3, p. 1-13, 2018. DOI: 10.3390/fishes3030033.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; NETO, C. B.; SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; JERÔNIMO, G. T.; MARTINS, M. L. Utilização de bactérias ácido-lácticas isoladas do trato intestinal de tilápia-do-Nilo como probiótico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1201-1207, 2008. DOI: 10.1590/S0100-204X2008000900015.

JATOBÁ, A.; VIEIRA, F. N.; BUGLIONE, C.; SILVA, B. C.; MOURIÑO, J. L. P.; SILVA, B. C.; SEIFTER, W. Q.; ANDREATTA, E. R. Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 725-732, 2011. DOI: [10.1007/s10695-011-9472-5](https://doi.org/10.1007/s10695-011-9472-5).

JOBLING, M.; ARNESEN, A. M.; BAARDVIK, B. M.; CHRISTIANSEN, J. S.; JORGENSEN, E. H. Monitoring feeding behaviour and food intake: methods and applications. **Aquaculture Nutrition**. v. 1 n. 3, p. 131-143, 1995. DOI: [10.1111/j.1365-2095.1995.tb00037.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.1995.tb00037.x)

KASUMYAN, A. O.; SIDOROV, S. S. Taste preferences and behavior of testing of food by Stone Loach *Barbatula barbatula* (Balitoridae, Cypriniformes), **Journal of Ichthyology**, v. 50, n. 5, p. 708–720, 2010. DOI: [10.1134/S0032945210080138](https://doi.org/10.1134/S0032945210080138).

KHATI, A.; CHAUHAN, R. S.; NAZIR, I.; ARYA, P. Improved fish health: Key to successful aquaculture. **Journal of Entomology and Zoology Studies**; v. 6, n. 2, p. 898-902, 2018.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 2. ed., Jundiaí: F. Kubitza, 2011. 316 p.

KUMAR, R.; MUKHERJEE S. C.; RANJAN.; NAYAK, A. K. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, n. 2, p. 168-172, 2008. DOI: [10.1016/j.fsi.2007.10.008](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.10.008).

MARENGONI, N. G.; WEISS, L. A.; ALBUQUERQUE, D. M.; MOURA, M. C. Influência de probióticos na prevalência parasitária e níveis de glicose e cortisol em tilápia do Nilo. **Archivos de Zootecnia**, v. 64, n. 245, p. 63-69, 2015.

MEARNS, K. J. Sensitivity of brown trout (*Salmo trutta* L.) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry to amino acids at the start of exogeneous feeding. **Aquaculture**, v. 55, n. 3, p. 191-200, 1986. DOI: [10.1016/0044-8486\(86\)90114-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90114-6).

MEHRIM, A. Effect of dietary supplementation of Biogen® (commercial probiotic) on mono-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under different stocking densities. **Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 4, n. 6, p. 261–273, 2009. DOI: 10.3923/jfas.2009.261.273.

MELLO, H.; MORAES, J. R. E.; NIZA, I. G.; MORAES, F. R.; OZÓRIO, R. O. A.; SHIMADA, M. T.; ENGRACIA FILHO, J. R.; CLAUDIANO, G. S. Efeitos benéficos de

probióticos no intestino de juvenis de tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 724-730, 2013. DOI: 10.1590/S0100-736X2013000600006.

MERRIFIELD, D. L.; DIMITROGLOU, A.; FOEY, A.; DAVIES, S. J.; BAKER, R. T.; BØGWALD, J.; RINGO, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v. 302, n. 1-2, p. 1-18, 2010. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.02.007

MOHAPATRA, S.; CHAKRABORTY, T.; KUMAR, V.; DEBOECK, G.; MOHANTA, K. N. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. **Journal Animal Physiology Animal Nutrition**, v. 97, n. 3, p. 405-430, 2013. DOI: [10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x).

MORSCHBACHER, E. F.; MARENGONI, N. G.; ALBUQUERQUE, D. M. Mananoligossacarídeo durante a reversão sexual de tilápia do Nilo. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 4, p. 1168-1176, 2014.

MOURIÑO, J. L. P.; JATOBÁ, A.; SILVA, B. C.; VIEIRA, F. N.; MARTINS, M. L. Probióticos na aquicultura. **Patologia e Sanidade de Organismos Aquáticos**. v. 1, p. 381–404, 2012, DOI: [10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01301.x).

NAKANDAKARE, I. B. Inclusão de probióticos durante o processamento de ração para tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, variação Gift. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Pesca). Instituto de Pesca, São Paulo. 74p. 2010

NAKANDAKARE, I. B.; IWASHITA, M. K. P.; DIAS, D. D. C.; TACHIBANA, L., RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ROMAGOSA, E. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilápias-do-Nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 39, n. 2, p. 121-135, 2013.

NAYAK, S. K. Probiotics and immunity: a fish perspective. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 1, p. 2-14, 2010. DOI: [10.1016/j.fsi.2010.02.017](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.017).

NEU, D. H.; BOSCOLO, W. R.; ZAMINHAM, M.; ALMEIDA, F. L.; SARY, C.; FURUYA, W. M. Growth performance, biochemical responses, and skeletal muscle development of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), fed with increasing levels of arginine. **Journal World Aquaculture Society**, v. 47, n. 2, p. 248-259, 2016. DOI: [10.1111/jwas.12262](https://doi.org/10.1111/jwas.12262).

OLIVEIRA, M. M.; RIBEIRO, T.; ORLANDO, T. M.; OLIVEIRA, D.G.; DRUMOND, M. M.; FREITAS, R. T.; ROSA, P. V. Effects crude protein levels on female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reproductive performance parameters. **Animal Reproduction Science**, v. 150, n. 1-2, p.62-69, 2014. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2014.08.006](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.08.006)

PASTORE, S. C. G.; GAIOTTO, J. R.; RIBEIRO, F. A. S.; NUNES, A. J. P. Formulações de rações e boas práticas de fabricação, In: FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. (Eds.), **Nutriaqua: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2012. p. 295-346.

PEDRAZZANI, A. S., MOLENTO, C. F. M., CARNEIRO, P. C. F.; CASTILHO, M. F. **Panorama da Aquicultura: Senciência e bem-estar de peixes: uma visão de futuro do mercado consumidor**, v. 107, n. 102, p. 24-29, 2007

PEIXE BR – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA – **Anuário Peixe BR da Piscicultura**, p. 28-29, 2019.

PEREIRA-DA-SILVA, E. M.; PEZZATO, L. M. Respostas da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) à atratividade e palatabilidade de ingredientes utilizados na alimentação de peixes.

Revista Brasileira de Zootecnia, v. 29, n. 5, p. 1273-1280, 2000. DOI: 10.1590/S1516-35982000000500003.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Eduem: Maringá. 1. ed., 2013. 140 p. DOI: 10.7476/9788576286530

RAŠKOVIÉ, B. S.; STANKOVIÉ, M. B.; MARKOVIÉ, Z. Z.; POLEKSIÉ, V. D. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 56, n. 1, p. 87-100, 2011. DOI: 10.2298/JAS1101087R

RINGO, E.; OLSEN, R. E.; JENSEN, I.; ROMERO, J.; LAUZON, H. L. Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. **Fish Biology and Fisheries**, v. 24, n. 4, p. 1032, 2014. DOI: 10.1007/s11160-014-9361-y.

RINGO, E.; OLSEN, R. E.; GIFSTAD, T. O.; DALMO, R. A.; AMLUND, H.; HEMRE, G. I.; BAKKE, A. M. Prebiotics in aquaculture: a review. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, n. 2, p. 117-136, 2010. DOI: [10.1111/J.1365-2095.2009.00731.X](https://doi.org/10.1111/J.1365-2095.2009.00731.X).

RIPAMONTI, B.; AGAZZI, A.; BERSANI, C.; DEA, P.; PECORINI, P.; PIRANI, S.; REBUCCI, R.; SAVOINI, G.; STELLA, S.; STENICO, A.; TIRLONI, E.; DOMENEGHINI, C. Screening of species-species lactic acid bacteria for veal calves' multi-strain probiotic adjuncts. **Anaerobe**, v. 17, n. 3, p. 97-105, 2011. DOI: [10.1016/j.anaerobe.2011.05.001](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.05.001).

ROMANO, N.; CHONG, C. M.; SIMON, W.; KAMARUDIN, M. S.; EBRAHIMI, M. Dietary sodium citrate improved oxidative stability in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) but reduced growth, health status, intestinal short chain fatty acids and induced liver damage. **Aquaculture**, v. 458, n. 1, p. 170-176, 2016. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2016.03.014](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.014).

ROWLERSON, A.; VEGGETI, A. Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: JOHNSTON I. A. (Ed). Muscle development and growth. **Fish Physiology**. v. 18, n. 1, p.103-140, 2001. DOI: [10.1016/S1546-5098\(01\)18006-4](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(01)18006-4).

SADO, R. Y.; BICUDO, A. J. A.; CYRINO, J. E. P. Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, n. 6, p. 821-826, 2008. DOI: [10.1111/j.1749-7345.2008.00219.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00219.x).

SAHU, M. K.; SWARNAKUMAR, N. S.; SIVAKUMAR, K.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p.299-308, 2008. DOI: [10.1007/s12088-008-0024-3](https://doi.org/10.1007/s12088-008-0024-3).

SCHWARZ, K.; FURUYA, W. M.; NATALI, M. R. M.; GAUDEZI, M. C.; LIMA, P. A. G. Mananoligossacarídeos em dietas para larvas de tilápia. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 40, n. 12, p. 2634-2640, 2011. DOI: [10.4025/actascianimsci.v32i2.7724](https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v32i2.7724).

SOLIS DE LOS SANTOS, F.; FARNELL, M. B.; TÉLLEZ, G.; BALOG, J. M.; ANTHONY, N.B.; TORRES-RODRIGUEZ, A.; HIGGINS, S.; HARGIS, B.M.; DONOGHUE, A.M. Effect of prebiotic on gut development and ascites incidence of broilers reared in a hypoxic environment. **Poultry Science**, v. 84, n. 7, p. 1092-1100, 2005. DOI: [10.1093/ps/84.7.1092](https://doi.org/10.1093/ps/84.7.1092).

SIGNOR, A.; PEZZATO, L. E.; FALCON, D. R.; GUIMARÃES, I. G.; BARROS, M. M. Parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo: efeito da dieta suplementada com levedura e zinco e do estímulo pelo frio. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 32, p. 509-519, 2010. DOI: [10.5216/cab.v11i3.6016](https://doi.org/10.5216/cab.v11i3.6016).

TALPUR, A. D.; MUNIR, M. B.; MARY, A.; HASHIM, R. Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. **Aquaculture**, v. 426–427, p. 14–20, 2014. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2014.01.013](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.013)

TANTIKITTI, C. Feed palatability and the alternative protein sources in shrimp feed. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 51-55, 2014.

TAVARES-DIAS, M. E.; MORAES, F. R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em pesque e pague de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v.19, n. 1, p 107-114, 2003.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, n. 4, p. 655-671,2000. DOI: [10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000](https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000).

VOLPATO, G. L.; GONÇALVES. F, CASTILHO, M. Insight into the concept of fish welfare. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 75, n. 84, p. 165-171, 2007. DOI: 10.3354/dao075165.

WANG, M.; LIU, G.; LU, M.; KE, X.; LIU, Z.; GAO, F.; YU, D. Effect of *Bacillus cereus* as a water or feed additive on the gut microbiota and immunological parameters of Nile tilapia. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 6, p. 3163-3173, 2017. DOI: [10.1111/are.13146](https://doi.org/10.1111/are.13146).

ZHOU, T.; GUI, L.; LIU, M.; LI, W.; HU, P.; DUARTE, D. F.; CHEN, L. Transcriptomic responses to low temperature stress in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 84, n. 1, p. 1145-1156, 2018. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.10.023.

ZORRIEHZAHRA, M. J.; DELSHAD, S. T.; ADEL, M; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; DHAMA, K; LAZADO, C. C. Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 36, n. 4, p. 228-241, 2016. DOI: 10.1080/01652176.2016.1172132.