



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL  
PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO  
RURAL SUSTENTAVEL**

**LUCIANE NEULS**

**EFEITO DA ADIÇÃO DA LEVEDURA *Yarrowia lipolytica* NA DIETA DE TILÁPIA  
DO NILO *Oreochromis niloticus* SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS  
E IMUNES.**

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2020**

**LUCIANE NEULS**

**EFEITO DA ADIÇÃO DA LEVEDURA *Yarrowia lipolytica* NA DIETA DE TILÁPIA DO NILO *Oreochromis niloticus* SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNES.**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para o título de Mestre em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável.  
Orientador: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Luisa Helena Cazarolli

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luisa Helena Cazarolli

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2020**

## UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

*Campus* Laranjeiras do Sul-PR

Rodovia BR 158 - Km 405

CEP 85301-970

Telefone: (42) 3635-0000

Laranjeiras do Sul - PR

Brasil

### **Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Neuls, Luciane

Efeito da adição da levedura *Yarrowia lipolytica* na dieta de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* sobre os parâmetros hematológicos e imunes. / Luciane Neuls. -- 2020.

61 f.

Orientadora: Doutora Luisa Helena Cazarolli

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável, Laranjeiras do Sul, PR, 2020.

1. agroecologia. 2. piscicultura. 3. levedura. I. Cazarolli, Luisa Helena, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

LUCIANE NEULS

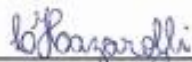
**EFEITO DA ADIÇÃO DA LEVEDURA *Yarrowia lipolytica* NA DIETA DE TILÁPIA DO NILO *Oreochromis niloticus* SOBRE OS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNES.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação *Stricto sensu*, da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, para obtenção do título de Mestra em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável.

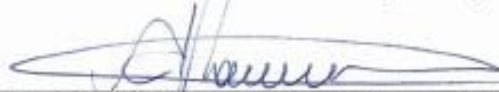
Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

03/08/2020

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dra. Luisa Helena Cazarolli (UFFS – presidente / orientadora)



Prof. Dr. Carlos José Raupp Ramos (UFFS – 1º membro)



Prof.ª Dra. Silvia Romão (UFFS – 2º membro)



Prof.ª Dra. Josimeire Aparecida Leandrini (UFFS – suplente)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos e todas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha família pelo apoio e incentivo em todos os momentos, minha mãe Maria Luci, meu pai Ivanir, meus irmãos Anna Luiza e Thiago, ao meu companheiro Rudinei sem o carinho e compreensão de vocês nada disso seria possível.

À minha orientadora professora Luisa por toda a dedicação e paciência, pelos valorosos ensinamentos e também a professora Silvia pela ajuda e grande contribuição.

Aos colegas pela ajuda Valmir, Milena, Jessica, Luiz, Lucas, Vanderleia, Juliana e André.

Aos colegas da minha turma do mestrado por todo o apoio, aprendi muito com vocês.

## RESUMO

A produção de peixes praticada atualmente em alta densidade pode levar a situações de estresse, o que leva a alterações fisiológicas causando redução no crescimento e maior suscetibilidade a agentes causadores de enfermidades. O uso de leveduras como aditivos na ração de peixes tem potencial por ser fonte de nutrientes, além disso componentes presentes na parede celular das leveduras atuam como imunostimulantes, melhorando a capacidade de resistir a agentes causadores de enfermidades. O aproveitamento de resíduos agroindustriais como a casca de mandioca convertidos por microrganismos e utilizados como aditivo em ração animal se mostra um destino ecologicamente amigável a esses resíduos. O presente trabalho buscou avaliar os efeitos da adição à ração de biomassa fermentada da levedura *Yarrowia lipolytica* sobre os parâmetros zootécnicos (ganho de peso, ganho em comprimento e taxa de sobrevivência), hematológicos (eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, VCM, CHCM, HCM), imunes (níveis de lisozima e mieloperoxidase e concentração de nitrito/nitrato) no plasma e no rim de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Foram utilizados 320 juvenis de tilápia divididos em 4 grupos experimentais com diferentes níveis de adição de biomassa de *Y. lipolytica*: controle (sem adição), T1 (3%), T2 (5%) e T3 (7%) com quatro repetições cada. Após 35 dias de alimentação, 24 animais de cada grupo experimental foram coletados e sacrificados para a realização das análises. O uso da biomassa de *Y. lipolytica* adicionada à ração promoveu alterações nos parâmetros zootécnicos e hematológicos avaliados. A adição promoveu melhora na capacidade de resposta imune inata, pois houve aumento das células de defesa como neutrófilos e monócitos no sangue dos animais; levou ainda a um aumento dos níveis da lisozima, da mieloperoxidase e do conteúdo de nitrito/nitrato plasmáticos correlacionados aos aumentos dos níveis de leucócitos na corrente sanguínea. No rim promoveu aumento dos níveis de mieloperoxidase, mas não alterou os níveis de lisozima e o conteúdo de nitrito/nitrato indicando que os alvos de ação imunostimulatórios principais da levedura estejam na corrente sanguínea. Considerando as respostas fisiológicas dos sistemas hematológico e imune após a suplementação conclui-se que o uso da levedura em concentrações mais baixas como 3 e 5% apresenta efetividade e segurança para aplicação com

imunoestimulantes na dieta de tilápias do Nilo. Ainda, a concentração 7% apresentou os melhores resultados em relação aos parâmetros zootécnicos.

Palavras chave: Imunoestimulantes. Hematologia. Imunologia. Levedura.

## ABSTRACT

The fish production currently performed in high density can lead to stressful situations, leading to physiological changes such as reduced growth and greater susceptibility to parasites. The use of yeasts as additives in fish feed has the potential to be a source of nutrients as well as acting as immunostimulants because of components present in the yeast cell wall, improving the animal's ability to resist infections. The use of agroindustrial residues such as cassava peel converted by microorganisms and used as an additive in animal feed is an ecologically friendly destination for these residues. The present work evaluated the effects of adding fermented biomass of the yeast *Yarrowia lipolytica* on zootechnical parameters (weight gain, length gain and survival rate), hematological (erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, MCV, MCHC, MHC), immune (lysozyme and myeloperoxidase levels and concentration of nitrite / nitrate) in the plasma and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). 320 juveniles of tilapia were used, divided into 4 experimental groups with different levels of biomass addition of *Y. lipolytica*: control (without addition), T1 (3%), T2 (5%) and T3 (7%) with four replicates for each group. After 35 days of feeding, 24 animals from each experimental group were collected and sacrificed for the analysis. The use of *Y. lipolytica* biomass added to the feed promoted significant differences in the evaluated zootechnical and hematological parameters. The addition promoted an improvement in the innate immune response capacity because there was an increase in defense cells such as neutrophils and monocytes in the animals' blood; it also led to an increase in levels of lysozyme, myeloperoxidase and plasma nitrite / nitrate content correlated with increases in leukocyte levels in the bloodstream. In the kidney it promoted an increase in the levels of myeloperoxidase, but did not alter the levels of lysozyme and the nitrite / nitrate content indicating that the main immunostimulatory action targets of the yeast are in the bloodstream. Considering the physiological responses of the hematological and immune systems after supplementation, we can conclude that the use of yeast in lower concentrations, such as 3 and 5%, is effective and safe for application as immunostimulants in the Nile tilapia diet. Also, the 7% supplementation showed the best results to zootechnical parameters.



Keywords: Immunostimulants. Hematology. Immunology. Yeast.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Oreochromis niloticus</i> - tilápia no Nilo .....	19
Figura 2 - Tipos celulares característicos presentes no sangue de <i>O. niloticus</i> .....	22
Figura 3 - Esquema dos principais tipos celulares do sistema imune .....	25
Figura 4 - Esquema da fagocitose.....	25
Figura 5 - <i>Yarrowia lipolytica</i> fotografada com microscópio íon de hélio .....	28
Figura 6 - Foto do Sistema de Recirculação .....	32
Figura 7 - Fluxograma da metodologia do ensaio <i>in vivo</i> .....	36
Figura 8 - Fluxograma dos ensaios imunes .....	38
Figura 9 - (A) Níveis da enzima lisozima em µg/mL no plasma; (B) Níveis da enzima Lisozima em µg/mL no rim de <i>O. niloticus</i> alimentada com ração com diferentes níveis de adição de biomassa de levedura <i>Y. lipolytica</i> . Os valores são expressos como média ± DP; n=16 para cada tratamento.....	48
Figura 10 - (A) Atividade da enzima mieloperoxidase no plasma; (B) Atividade da enzima mieloperoxidase no rim de <i>O. niloticus</i> alimentada com ração com diferentes níveis de adição de biomassa de <i>Y. lipolytica</i> . Os valores são expressos como média ± DP; n=16 para cada tratamento. ....	51
Figura 11 - (A) Concentração de nitrito/nitrato no plasma; (B) concentração de nitrito/nitrato no rim de <i>O. niloticus</i> alimentada com ração com diferentes níveis de adição de biomassa de levedura <i>Y. lipolytica</i> . Os valores são expressos como média ± DP; n=16 para cada tratamento. ....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição relativa da ração fornecida .....	34
Tabela 2 - Parâmetros zootécnicos de <i>O. niloticus</i> submetidos a dieta com diferentes níveis de adição de biomassa de levedura <i>Y. lipolytica</i> . .....	40
Tabela 3 - Parâmetros hematológicos do sangue de <i>O. niloticus</i> alimentada com ração com diferentes níveis de adição de biomassa de <i>Y. lipolytica</i> .....	43
Tabela 4- Contagem total de leucócitos e trombócitos e contagem diferencial de células de defesa do sangue de <i>O. nilotius</i> alimentadas com ração com diferentes níveis de adição de biomassa de <i>Y. lipolytica</i> . .....	45

## LISTA DE SIGLAS

APC's – Células Apresentadoras de Antígeno  
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais  
CGE – Células Granulocíticas Especiais  
CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média  
CO<sub>2</sub> – Gás Carbônico  
ERRO's – Espécies Reativas de Oxigênio  
FDA – *Food and Drug Administration*  
GC – Ganho em Comprimento  
GP – Ganho de Peso  
GRAS – *Generally Regarded As Safe*  
GYP - *Glucose Yeast Peptone*  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio  
HCIO – Ácido Hipocloroso  
HCM - Hemoglobina Corpuscular Média  
MPO – Mieloperoxidase  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NO – Óxido Nítrico  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - Nitrito  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - Nitrato  
NOS – Enzima NO Sintase  
O<sub>2</sub> – Oxigênio  
OD – Oxigênio Dissolvido  
PBS – Tampão Fosfato Salino  
SOD – Enzima Superóxido Dismutase  
TS – Taxa de Sobrevivência  
UFC – Unidades Formadoras de Colônia  
UFFS – Universidade Federal da Fronteira Sul  
VCM - Volume Corpuscular Médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 OBJETIVOS .....	16
1.1.1 Objetivo Geral .....	16
1.1.2 Objetivos Específicos .....	16
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
2.1 AQUICULTURA E TILÁPIA .....	18
2.2 SISTEMA HEMATOLÓGICO E IMUNE DOS PEIXES .....	19
2.3 SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA E PRODUÇÃO DE PEIXES .....	26
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	31
3.1 MATERIAIS .....	31
3.2 LOCAL E INSTALAÇÕES .....	31
3.3 ESTUDO <i>IN VIVO</i> .....	32
3.4 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS .....	35
3.5 COLETA DE SANGUE E PREPARO DE PLASMA .....	35
3.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE LISOZIMA .....	37
3.7 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO/NITRITO .....	37
3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE .....	38
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	39
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
4.1 PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA E ZOOTÉCNICOS .....	40
4.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS .....	42
4.3 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS E TROMBÓCITOS .....	44
4.4 NÍVEIS DE LISOZIMA .....	47
4.5 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE .....	49

4.6 CONCENTRAÇÕES DE NITRATO/NITRITO.....	52
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura, que consiste no cultivo de organismos aquáticos, apresenta grandes potenciais na produção de alimentos e renda. O Brasil, devido às suas características naturais, matriz energética e aumento no consumo interno de peixes tem previsão de grande crescimento na atividade para os próximos anos (ROCHA, 2013).

Não basta, porém, que se tenha um incremento na atividade, mas sim que esta seja praticada de maneira racional, sendo uma alternativa à diversificação das práticas na propriedade. Uma aquicultura de base agroecológica, que maximize o aproveitamento dos recursos e resíduos existentes na propriedade, o uso sustentável dos ecossistemas, a observação e emprego de processos ecológicos vem oferecer uma nova alternativa para os sistemas de produção de peixes.

Dentre as espécies mais utilizadas nos sistemas comerciais de cultivo destaca-se a tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). Isto se deve à suas características tais como rusticidade, boas taxas de crescimento e ganho de peso em diversos sistemas de produção, hábito alimentar onívoro, capacidade de reprodução em cativeiro, tolerância a estocagem em altas densidades, resistência a agentes causadores de doenças e aceitação do mercado consumidor devido às características de sua carne relacionadas ao sabor e à textura (EL-SAYED, 2006).

Considerando-se o cultivo comercial de peixes, a alimentação consiste em um dos maiores custos e, portanto, um manejo alimentar adequado pode minimizar estes custos. Uma ração com um balanço adequado entre a quantidade de proteínas e nutrientes energéticos de acordo com as necessidades de cada espécie vai permitir uma conversão mais eficiente em carne (TOYAMA et al., 2000). Além disso as tilápias apresentam uma boa habilidade em aproveitar diversos tipos de alimentos devido ao hábito onívoro, se adaptando bem a várias fontes de alimentação. Diante deste cenário, vem sendo observado um incremento no interesse e na busca por alternativas para a produção de ração na piscicultura.

Dentre as diversas alternativas que podem ser utilizadas, as leveduras apresentam grande potencial uma vez que já são utilizadas nas rações animais devido ao seu alto teor nutritivo, sendo o exemplo mais conhecido a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esses microrganismos podem ser utilizados para a

suplementação de rações para peixes, tanto como fonte proteica e lipídica, como probiótico, tendo o potencial de melhorar o metabolismo bem como a resposta imune desses animais (IWASHITA, 2012). O estudo do uso da levedura *Yarrowia lipolytica* se apresenta como uma opção à outras espécies de leveduras, pois ocorre naturalmente no ambiente e pode ser facilmente produzida em escala comercial, além de poder alterar sua composição de nutrientes com base no meio em que é cultivada ou até através de manipulação genética (LEDESMA-AMARO; NICAUD, 2016).

O desenvolvimento de práticas e tecnologias de aproveitamento de resíduos é bastante importante para o desenvolvimento de uma aquicultura de base agroecológica. Assim como a substituição de insumos externos e que encarecem os custos de produção. Nesta perspectiva, o uso de leveduras que degradam esses resíduos, os utilizam como fonte de nutrientes e podem ser incorporadas à ração como fonte proteica/probiótico em substituição à insumos caros tem grande potencial.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da adição da levedura *Y. lipolytica* na dieta de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) sobre os parâmetros hematológicos e imunes.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da adição de biomassa da levedura *Yarrowia lipolytica* na dieta de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre o crescimento e sistemas hematológico e imune dos animais.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os parâmetros zootécnicos das tilápias alimentadas com ração que recebeu adição de biomassa da levedura;



- Avaliar a influência da ração com adição de biomassa da levedura sobre os parâmetros hematológicos: conteúdo de hemoglobina, contagem de hemácias, índices hematimétricos, contagem de leucócitos e de trombócitos;
- Avaliar a influência da ração com adição de biomassa da levedura sobre os parâmetros imunes no sangue e rim: atividade da lisozima, mieloperoxidase e conteúdo de nitrito/nitrato;
- Determinar a concentração de levedura mais eficaz para adição na ração para tilápias após tratamento *in vivo* considerando as respostas fisiológicas dos sistemas hematológico e imune e os parâmetros zootécnicos.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 AQUICULTURA E TILÁPIA

Os organismos aquáticos são um recurso importante em termos alimentares para milhões de pessoas ao redor do mundo. O aumento da população mundial e conseqüentemente a demanda por pescados tem levado à uma extração dos recursos pesqueiros naturais mais rápida que a sua capacidade de renovação, tornando-a insustentável (THE, 2016). A aquicultura então, se apresenta como um caminho para um desenvolvimento sustentável.

A produção pesqueira mundial atingiu um máximo de aproximadamente 171 milhões toneladas em 2016, das quais a aquicultura representou 47% do total e 53% se excluir usos não alimentares (incluindo redução para a preparação de farinha e óleo de peixe). O valor total da venda da produção pesqueira em 2016 foi estimado em 362 bilhões de dólares, dos quais US\$ 232 bilhões vieram da produção aquícola (EL, 2018). Além disso vem se observando um aumento considerável em termos de consumo *per capita* de peixe ao longo dos anos passando de 9,0 kg em 1961 para mais de 20 kg em 2017 (EL, 2018) reforçando a importância da aquicultura, mais especificamente da piscicultura, no fornecimento de peixes ao mercado consumidor.

O Brasil tem grande potencial para a aquicultura, pelas condições naturais, pelo clima favorável e pela sua matriz energética. Este potencial está relacionado à sua extensão costeira de mais de oito mil quilômetros, e à sua dimensão territorial, que dispõe de, aproximadamente, 13% da água doce renovável do planeta. Em relação às águas continentais, fazem parte desse volume as áreas alagadas artificialmente pela construção de barragens, contidas em reservatórios de usinas hidrelétricas, bem como áreas particulares para produção em viveiros de terra escavados (ROCHA, 2013).

A piscicultura brasileira produziu 697 mil toneladas de peixes de cultivo em 2017. A tilápia é o tipo de peixe mais importante entre os cultivados do Brasil, sendo a espécie *Oreochromis niloticus* - tilápia no Nilo, a principal. Segundo levantamento da Associação Brasileira da Piscicultura, a espécie representa 51,7% da piscicultura nacional, com aproximadamente 400 mil toneladas em 2017. Ainda segundo o mesmo relatório, o Brasil é o quarto maior produtor mundial da espécie

correspondendo a 6,67% da produção mundial, sendo o estado do Paraná o maior produtor de tilápia do Brasil, com 123 mil toneladas em 2018 (MEDEIROS, 2018).

As tilápias pertencem à família Cichlidae, são originárias da África e do Oriente Médio e as primeiras pesquisas com enfoque na sua criação tiveram início no Congo Belga (atual Zaire) no começo do século XIX. A partir da década de 20, o Quênia intensificou a produção de tilápia, mas a sua difusão para outros locais do mundo ocorreu a partir da Malásia (CAMPO, 2008).

A tilápia apresenta características interessantes, como rusticidade, taxa elevada de crescimento em diversos sistemas de produção, hábito alimentar onívoro, boa conversão alimentar, capacidade de reprodução em cativeiro e aceitação do mercado consumidor (EL-SAYED, 2006). Diante destas características, a tilápia (mostrada na figura 1) se mostra uma espécie de grande interesse e potencial para os cultivos comerciais.

Figura 1 - *Oreochromis niloticus* - tilápia no Nilo



Fonte: MFRURAL, 2018

## 2.2 SISTEMA HEMATOLÓGICO E IMUNE DOS PEIXES

De maneira geral, todos os organismos vivos, em especial os peixes, sempre buscam a homeostase corporal, com os sistemas metabólico, hematológico e imune funcionando em harmonia protegendo os peixes de estresses ambientais e injúrias externas e permitindo respostas e crescimento adequados. Considerando-se o

acompanhamento das condições de saúde dos peixes durante o cultivo, os parâmetros hematológicos podem ser usados como indicadores biológicos para tal finalidade. A hematologia constitui uma importante ferramenta para identificação do estado de saúde dos diversos organismos, tanto em condições fisiológicas basais quanto em condições patológicas e nutricionais pois o sangue reflete de forma rápida e eficiente as alterações que ocorrem nos mesmos (AZEVEDO et al., 2006).

O tecido sanguíneo interage com os demais tecidos do organismo auxiliando em importantes funções, tais como: transporte de gases, excretas e nutrientes, osmorregulação e defesa (ISHIKAWA et al., 2010). O sangue dos peixes é constituído por diferentes tipos de células, como eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Os eritrócitos possuem função de transporte de  $O_2$  e  $CO_2$  na circulação, sendo as células mais numerosas no sangue (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

Os trombócitos atuam no mecanismo de defesa do animal, participando de processos de coagulação e fagocitose celular (NAKANDAKARE et al., 2013). Os trombócitos são células predominantemente elípticas, ocasionalmente arredondadas, de citoplasma hialino sem granulações e núcleo fusiforme (TAVARES-DIAS et al., 2002).

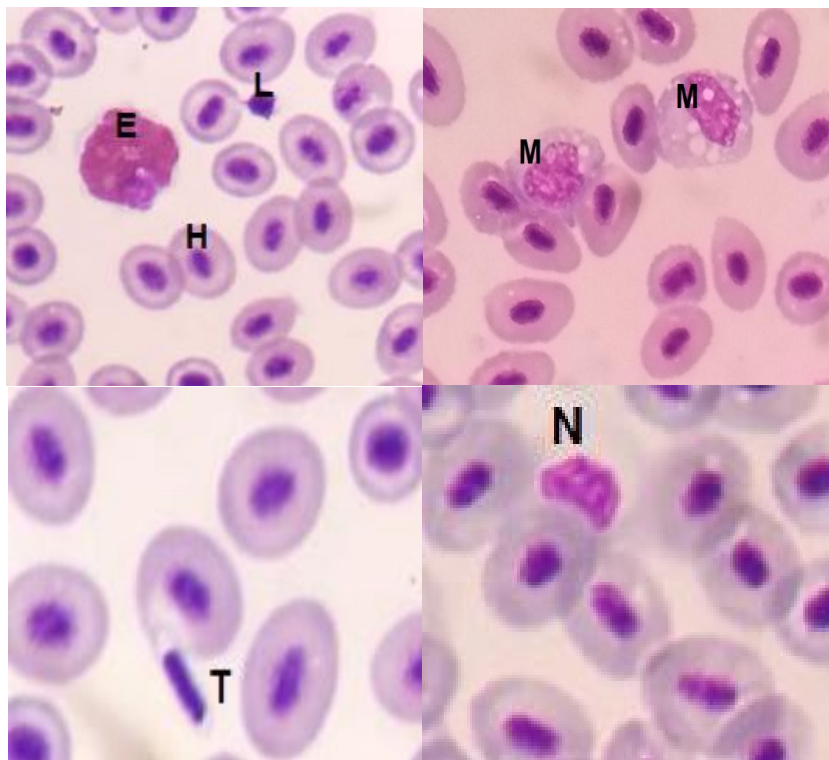
Na série leucocitária, responsável pela defesa do organismo contra agentes estranhos temos a caracterização das seguintes células: os neutrófilos são as células mais importantes de defesa no sangue periférico devido à capacidade fagocítica. São predominantemente arredondados, de citoplasma basofílico e grânulos acidófilos fracamente corados pelo corante ácido ou básico usado. O núcleo tem forma de bastonete ou ocasionalmente segmentado, em geral excêntrico, sendo a cromatina nuclear compacta e sem nucléolo visível (TAVARES-DIAS et al., 2002).

As células granulocíticas especiais (CGE) são grandes e muito semelhantes aos neutrófilos, com citoplasma que se cora fracamente pelo corante ácido- básico. O núcleo é pequeno, excêntrico, contém cromatina densa e não se observa a presença de nucléolo. Os linfócitos são responsáveis pela resposta imune específica humoral e celular, promovendo a produção de anticorpos e aumento da capacidade citotóxica. São células predominantemente arredondadas e de tamanho variado, têm citoplasma basofílico e sem granulações visíveis. O núcleo possui forma arredondada, cromatina densa, sendo grande em relação ao citoplasma (TAVARES-DIAS et al., 2002).

Os monócitos são células predominantemente grandes, de forma arredondada e citoplasma basofílico fracamente corado pelo corante ácido ou básico usado. O núcleo é frequentemente excêntrico, geralmente alongado, ocasionalmente esférico. Estes leucócitos são os principais fagócitos e possuem a habilidade de migração dos vasos sanguíneos, pelo mecanismo denominado diapedese, até o foco inflamatório (RANZANI-PAIVA, 2013). Os eosinófilos são células que intervêm nos processos de inflamação e na defesa celulares relacionadas à infestação por parasitas. São células relativamente pequenas e predominantemente arredondadas. O citoplasma é completamente ocupado por grânulos acidófilos, que se coram de róseo-alaranjado. O núcleo é geralmente excêntrico, com cromatina compacta (TAVARES-DIAS et al., 2002).

Os basófilos se apresentam em pequena quantidade na circulação sanguínea. A função dos basófilos de peixes não está definida e parece estar ligada a processos alérgicos, já que possuem histamina em seus grânulos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). As células imaturas variam de tamanho, podendo assemelhar-se aos linfócitos ou monócitos. A diferença é que apresentam citoplasma de coloração intensamente basofílico (TAVARES-DIAS et al., 2002). A figura 2 mostra Tipos celulares característicos presentes no sangue de *O. niloticus*.

Figura 2 - Tipos celulares característicos presentes no sangue de *O. niloticus*.



Fonte: a autora.

E – eosinófilo, H – hemácia, L – linfócito, M – monócito, T – trombócito, N – neutrófilo.

Nos peixes teleósteos os tecidos com função hematopoiética são principalmente o estroma do baço e o interstício dos rins e, em menor extensão, as áreas peri-portais do fígado, submucosa do intestino e timo (AGIUS; ROBERTS, 2003), haja visto que são desprovidos de medula óssea e de linfonodos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Os peixes apresentam quantidade variável de centros melanomacrófagos ou agregados de macrófagos nos diferentes tecidos, em particular fígado, baço e rim (MESEGUER; LOPEZ-RUIZ; ESTEBAN, 1994). Muitas são as funções atribuídas aos melanomacrófagos, cabendo aqui destacar a fagocitose de patógenos resistentes como esporos de parasitas e processamento de antígenos na resposta imune (AGIUS, 2003). Notadamente portanto, o rim apresenta importante atuação no sistema imune.

A resposta imune dos peixes frente à agentes estressores externos é bastante semelhante à dos vertebrados superiores. O sistema imune é formado por duas partes: o sistema imune inato (não específico) e o adquirido (específico). O sistema imune inato é considerado como a primeira linha de defesa, incluindo

barreiras físicas (pele e muco) e componentes celulares e moleculares (macrófagos, células killer e fatores solúveis de imunidade, como lisozima, proteínas do sistema complemento, peptídeos antimicrobianos, entre outros). Os principais componentes do sistema imune dos peixes são as células brancas do sangue, os leucócitos, produzidos, principalmente, no rim cefálico, timo e baço (TORT; BALASCH; MACKENZIE, 2003). O sistema imune específico ou adquirido, somente será ativado após a exposição a substâncias que são estranhas ao organismo. É caracterizado pela especificidade e memória imunológica, envolvendo os órgãos e tecidos linfóides (primários e secundários), células apresentadoras de antígeno (APCs), linfócitos T e B, imunoglobulinas, anticorpos e moléculas do sistema complemento (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Durante a resposta imune inata, os primeiros tipos celulares a serem ativados são os chamados fagócitos (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) envolvidos no processo de fagocitose. Estas células reconhecem, fagocitam e destroem microrganismos invasores pela liberação, nos vacúolos fagocíticos (fagolisossomo), de enzimas hidrolíticas, proteolíticas e de espécies reativas de oxigênio (EROs). Dentre as enzimas presentes está a mieloperoxidase (MPO) que faz parte de um grupo de enzimas do tipo peroxidases que normalmente catalisam reações de oxidação envolvendo peróxido de hidrogênio, e geração de EROs durante a explosão respiratória (*burst* respiratório) (ARNHOLD, 2004). Essa enzima é encontrada predominantemente nos neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais (LIBBY et al., 2005).

O termo *burst* respiratório refere-se a uma série de eventos metabólicos que ocorrem quando os fagócitos são devidamente estimulados, os quais envolvem o aumento do consumo de oxigênio e produção de EROs, essencial para a destruição dos microrganismos fagocitados (KITAGAWA et al., 2003). Durante o *burst* oxidativo ocorre a redução do  $O_2$  em ânion superóxido que é reduzido a  $H_2O_2$ . A MPO tem ação catalítica na formação de radicais altamente reativos, como o ácido hipocloroso (HClO), a partir de  $H_2O_2$  e íons halogênicos (especialmente o íon cloreto). O ácido hipocloroso tem importante papel nos mecanismos de morte intracelular de bactérias, possivelmente através da oxidação de aminoácidos, lipídios, ácidos nucleicos modificando as propriedades destas biomoléculas (ARNHOLD, 2004).

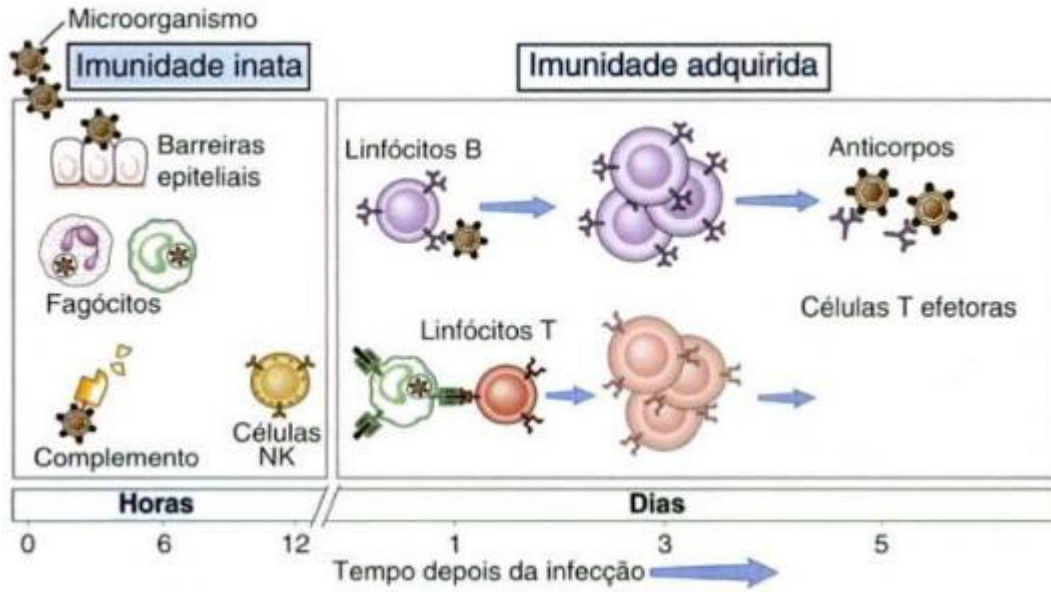
Outra parte importante da resposta de defesa contra patógenos depende da citotoxicidade do óxido nítrico (NO) produzido durante a explosão respiratória. O NO é

uma molécula altamente instável com grande poder oxidativo. É sintetizada a partir de L-arginina e oxigênio pela enzima NO sintase (NOS). Os leucócitos, em especial monócitos e macrófagos, produzem NO após a indução da NOS como parte da resposta imune. O NO como radical livre reage com o ânion superóxido e forma peroxinitrito um potente oxidante que pode destruir os microrganismos invasores. Esta molécula tem uma meia-vida curta *in vivo*, provavelmente menor que 0,1s, após o qual é convertido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e rapidamente oxidado em nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Portanto os níveis de nitrito e nitrato no plasma são utilizados como marcadores para a determinação da produção de NO e da resposta imune (MOSHAGE et al., 1995; ASL; GHASEMI; AZIZI, 2008).

Dentre os componentes moleculares do sistema imune inato que atuam durante a fagocitose, destaca-se também a lisozima, uma enzima produzida principalmente pelos leucócitos (macrófagos, neutrófilos) presentes nos rins e localizada nos lisossomos. Sua atividade catalítica está relacionada à capacidade de lisar a parede celular de bactérias, atuando nas ligações beta 1,4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e o ácido N-acetilglicosamínico. Esta propriedade torna esta enzima capaz de lisar bactérias gram-positivas e, agindo em conjunto com as proteínas do sistema complemento, podem destruir também algumas bactérias gram-negativas (PAULSEN et al., 2003). A figura 3 mostra os principais tipos celulares do sistema imune inato e adquirido. A figura 4 traz os eventos que ocorrem durante a fagocitose.

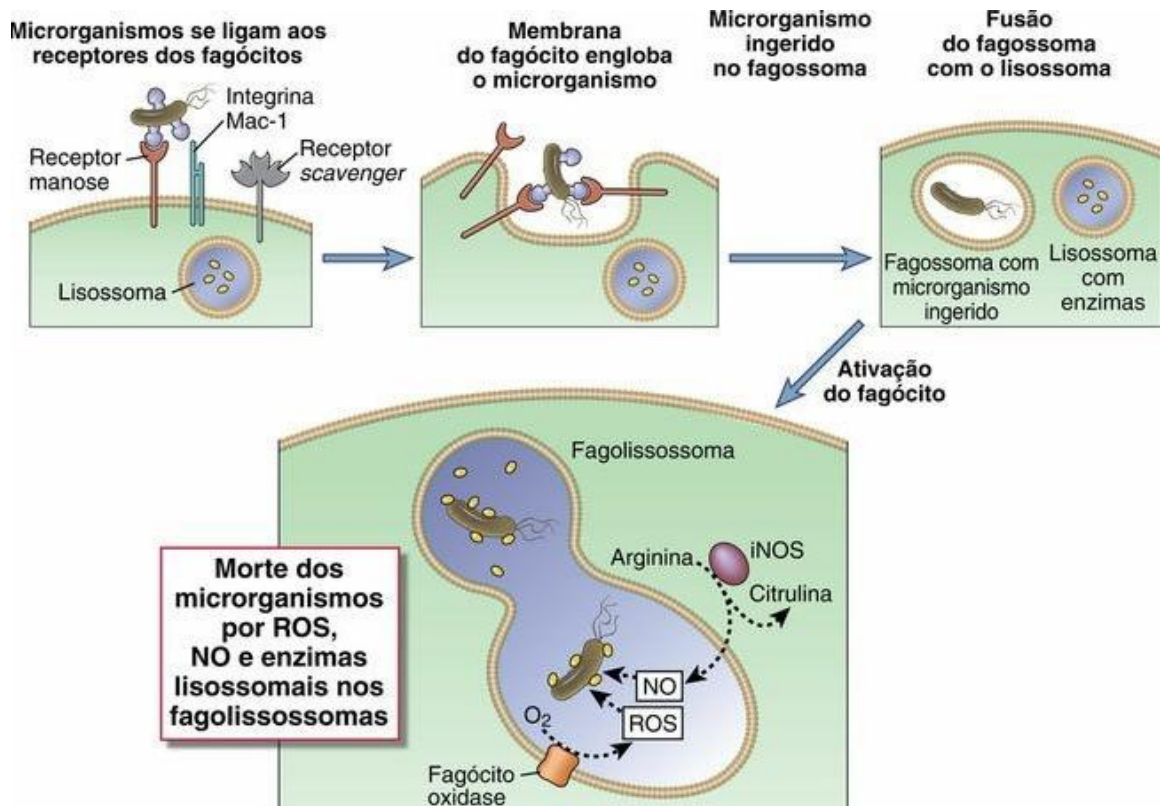


Figura 3 - Principais tipos celulares do sistema imune



Fonte: Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman (2015)

Figura 4 - Fagocitose



Fonte: Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman (2015)

O sistema imunológico dos peixes é diretamente influenciado por fatores ambientais. Além disso, as condições nutricionais também têm papel preponderante sobre o sistema imune. Esse sistema desempenha um papel de grande importância na defesa do organismo contra a invasão de agentes causadores de doenças, de maneira que estimular o sistema de defesa de animais mantidos em um ambiente estressante é uma alternativa eficaz e necessária. Para isso, vêm sendo utilizados desde produtos que contenham microrganismos e seus derivados, denominados próbióticos e prébióticos, extratos de plantas e de animais, até adjuvantes e fatores nutricionais diversos. Estes produtos são conhecidos como imunoestimulantes, e têm propriedades capazes de estimular o sistema imune por conferirem um aumento na atividade das células fagocitárias, na produção de lisossomos e anticorpos, diminuir o estresse do manejo reduzindo assim as perdas causadas pelas enfermidades. Os imunoestimulantes, adicionados à ração de maneira profilática, podem beneficiar a aquicultura, principalmente nas fases iniciais do cultivo, quando os peixes estão mais susceptíveis às enfermidades (RIBEIRO et al., 2012).

### **2.3 SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA E PRODUÇÃO DE PEIXES**

Qualquer atividade a ser realizada pelos animais requer energia provinda dos alimentos. Por esse motivo a dieta é componente essencial durante o cultivo a fim de garantir o bom desempenho dos animais incluindo sua capacidade de resposta imune. A alimentação representa a maior parcela dos custos relacionados à produção animal, correspondendo à cerca de 50 a 80% dos gastos (TOYAMA et al., 2000). Isso se deve à alta exigência proteica desses animais na dieta. Uma das fontes de proteína das rações comerciais é o farelo de soja, pela sua disponibilidade e alto valor nutritivo. Porém, o alto custo do farelo de soja é um dos fatores que encarece os custos com a ração (SOARES et al., 2001). Outra fonte de proteína para as rações é a farinha de peixes extraídos da natureza. A extração de peixes de ambientes naturais para a fabricação de farinha e também de óleo de peixe coloca em risco de diminuição excessiva ou extinção essas espécies. Além disso, derivados das rações podem levar à eutrofização artificial das águas (ZANATTA; CARVALHO,

2012). Portanto, existe a necessidade de se estudar alternativas mais baratas e menos danosas ao ambiente.

Alternativas como adição de enzimas, probióticos, prebióticos, extratos vegetais e nucleotídeos estão sendo utilizadas como forma de substituição e/ou suplementação em rações animais (STEIN; KIL, 2006). Dentre os produtos mais utilizados para adição em rações na indústria da aquicultura incluem probióticos como as bactérias ácido lácticas e as leveduras (KESARCODI-WATSON et al., 2008).

Considerando esta necessidade de se buscar fontes alternativas de proteínas para inclusão nas rações, leveduras são frequentemente utilizadas nas dietas animais pelo alto teor nutritivo, principalmente no que se refere às proteínas. Dentre as características das leveduras como alimento podem ser citadas a elevada quantidade de vitaminas do complexo B, particularmente tiamina, riboflavina, niacina e ácido pantotênico (FURUYA et al., 2000). Quanto à proteína, a levedura é considerada como boa fonte não convencional e sua proteína é considerada de bom valor nutricional quanto à sua composição de aminoácidos (PACHECO, 1997). Em relação aos aminoácidos, as leveduras destacam-se pelo alto teor de lisina, riqueza em leucina e valina, teores elevados de triptofano e treonina (PACHECO, 1997), porém limitada quanto a aminoácidos sulfurados (FURUYA et al., 2000).

O valor nutritivo das leveduras pode variar de acordo com sua composição química, o substrato onde se desenvolve, o método de obtenção, lavagem, secagem e o microorganismo utilizado (BUTOLO, 1997). Pacheco (1997) cita níveis de proteína bruta em leveduras de 45% a 65%, enquanto Butolo (1997) cita valores entre 28,7% a 38,38%.

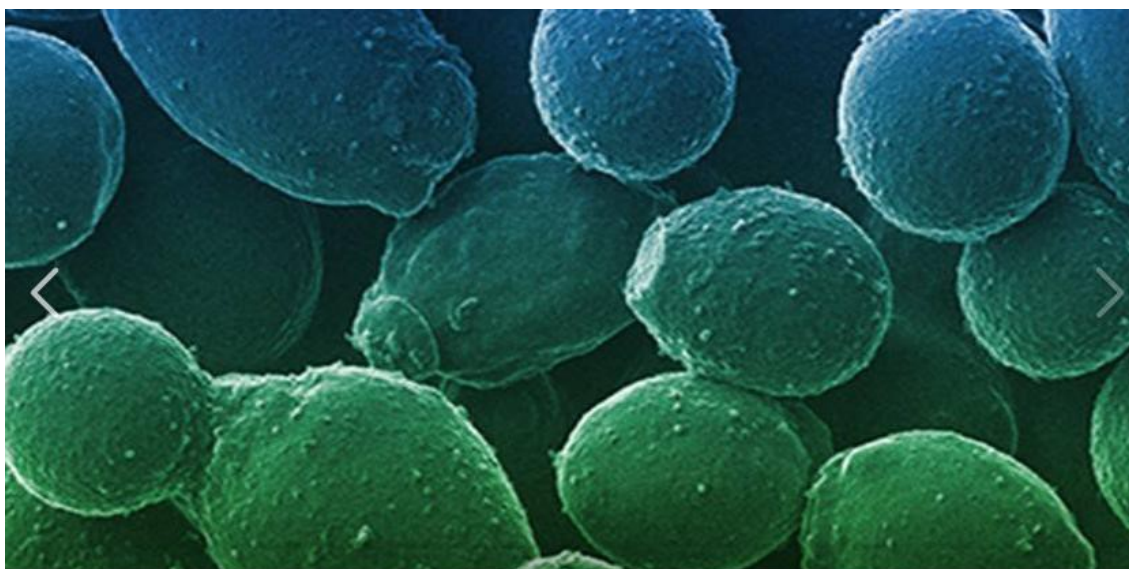
A aplicação de leveduras e bactérias em escala comercial vem sendo muito utilizada especialmente para o aproveitamento de subprodutos de fermentação industrial, sendo o exemplo mais conhecido a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Estudos realizados com esta levedura concluem que a substituição de 25% da proteína bruta na dieta pelos derivados da levedura de cana-de-açúcar, parede celular e levedura autolisada foi eficiente em promover melhor ganho de peso e maior deposição de proteína bruta no músculo de tilápias do Nilo (CARVALHO, 2010). Além disso a levedura desidratada de álcool pode ser usada como fonte de vitaminas hidrossolúveis (BACCARIN; PEZZATO, 2001). Ainda, o uso de leveduras pode melhorar a digestão uma vez que as leveduras vivas se aderem ao muco e epitélio intestinal dos animais auxiliando na digestão de fibras, produzindo ácidos

graxos de cadeias curtas, que são posteriormente utilizados como fonte de energia pela mucosa intestinal (ANDLID; JUÁREZ; GUSTAFSSON, 1995; ANDLID; VAZQUEZ; GUSTAFSSON, 1998).

A adição de leveduras na ração não somente traz benefícios indiretos, como o equilíbrio intestinal, mas pode ser considerado um suplemento proteico interessante e que, dependendo da forma de utilização, auxilia no sistema imunológico. Estudos demonstram que a suplementação com a mistura probiótica contendo *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* e *Aspergillus oryzae* influencia na quantidade de células de defesa de tilápia do Nilo, melhorando assim, seu estado de saúde, além de diminuir os efeitos deletérios do estresse de manejo (IWASHITA, 2012).

Uma das espécies de leveduras que apresenta grande potencial de utilização como suplemento na alimentação de peixes é a *Yarrowia lipolytica*. O termo levedura não tem valor taxonômico, mas se refere a fungos unicelulares que se reproduzem principalmente por brotamento. Muitos fungos apresentam crescimento leveduriforme, sendo a maioria do filo Ascomycetos (RAVEN et. al., 2001) como a *Y. lipolytica*. A figura 5 mostra a levedura *Y. lipolytica*.

Figura 5 - *Yarrowia lipolytica* fotografada com microscópio íon de hélio



Fonte: Environmental Molecular Sciences Laboratory – EMSL (2014)

De acordo com Nicaud (2012) o nome genérico *Yarrowia* foi proposto por Van der Walt e Von Arx em 1980 em reconhecimento de um novo gênero identificado por

David Yarrow do Laboratório de Microbiologia de Delft. O nome da espécie "lipolytica" é originário da capacidade desta levedura para hidrolisar lipídios. O gênero *Yarrowia* pertence à família Hemiascomicetos e foi anteriormente conhecida como *Candida*, *Endomycopsis* ou *Saccharomycopsis lipolytica* (BARTH; GAILLARDIN, 1997).

A *Y. lipolytica* é uma levedura estritamente aeróbia que possui intensa atividade secretora e elevada capacidade de geração de produtos de alto valor agregado, tais como lipases, esterases, proteases, fosfatases, ácido cítrico, além de uma variedade de proteínas extracelulares. É atualmente uma das espécies "não convencionais" mais intensivamente estudadas, sendo classificada como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) (BARTH; GAILLARDIN, 1997). Tem potencial no tratamento de resíduos agroindustriais conforme observado por Lopes e colaboradores (2008) no tratamento de águas residuais de usinas de azeite de oliva, ou por Domínguez e colaboradores (2010) no tratamento de óleo de cozinha usado.

Esta espécie de levedura apresenta uma característica vantajosa em relação a outras espécies, que é a de poder alterar sua composição de nutrientes, com base no meio em que é cultivada ou até através de manipulação genética. Isto coloca a sua utilização na alimentação animal como uma forma não invasiva de alterar a composição da carne, como por exemplo, um melhor balanço entre ácidos graxos ômega 3 e 6 ou melhor relação de aminoácidos essenciais (LEDESMA-AMARO; NICAUD, 2016). Além disso, estudos com Pargo Vermelho do Pacífico apoiam fortemente a ideia de que o isolado da levedura *Y. lipolytica* N-6 pode estimular os parâmetros imunológicos inespecíficos e o mecanismo imune antioxidante em leucócitos do rim cefálico e baço e pode ser usado como potencial imunostimulante (ALAMILLO et al., 2017).

Pelas características já citadas a levedura *Y. lipolytica* mostra grande potencial na busca de um modelo de produção que se baseie na sustentabilidade e na diminuição dos impactos ambientais, podendo ser uma alternativa importante e viável.

Neste sentido os caminhos para se desenvolver a aquicultura com sustentabilidade, perpassam pela mudança nos paradigmas impostos no passado. O incentivo à produção aquícola foi chamado de Revolução Azul, em analogia à Revolução Verde, que prometia aumentar a produtividade da agricultura na década

de 50 do século passado (KIMPARA, 2012). A partir da década de 70, houve uma grande discussão em torno do tipo de modelo de desenvolvimento praticado e a ciência da agroecologia surge com força para propor novas alternativas. Nesse novo conceito, a visão ecossistêmica é preconizada sem degradação além de sua resiliência. Além disso, a aquicultura deve melhorar o bem-estar humano e animal, a equidade para todos os tomadores de decisão e deve ser desenvolvida no contexto de outros setores, políticas e objetivos.

O enfoque agroecológico está ancorado na diversidade, na sinergia, na reciclagem e nos processos de experimentação (ALTIERI, 2004). Os princípios da agroecologia buscam a racionalidade ecológica, usar os recursos causando o mínimo impacto e aproveitando o máximo possível. Agroecologia é ir além das práticas agrícolas alternativas e desenvolver agroecossistemas com dependência mínima de agroquímicos e energia externa (ALTIERI, 2004).

Na busca pelo desenvolvimento de uma aquicultura agroecológica, se faz importante a pesquisa por técnicas e formas de manejo mais sustentáveis, que promovam o bem-estar animal, a substituição de insumos que tornem a criação de peixes em cativeiro menos impactante ao ambiente e com maior potencial para contribuir para a soberania e segurança alimentar.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAIS

Os reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos da Sigma Chemical CO (St. Louis, MO, USA) e Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os reagentes são de grau analítico (P.A). Os kits para dosagens sanguíneas foram adquiridos da Gold Analisa (Belo Horizonte, MG, Brasil).

#### 3.2 Local e instalações

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Experimentação Animal e Bioquímica e Genética e em estufa pertencente à Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, *campus* Laranjeiras do Sul, PR.

A água utilizada foi oriunda do abastecimento da própria universidade. A fim de garantir a qualidade e visando a economicidade da água do meio ambiente, foi utilizado processo de recirculação com biofiltro em fluxo contínuo, utilizando bomba com capacidade de vazão média de 1200 L/h. O biofiltro foi montado em caixa d'água com capacidade para 500 L. No interior do biofiltro foram inseridas pedras britadas e partículas/pedaços de tubulações de eletrodutos, cortados de maneira homogênea, com dimensões de 2 cm. O biofiltro ainda contou com aeração contínua e aquecedor com termostato, visando a manutenção de boas taxas de oxigênio dissolvido (OD) e temperatura da água constante. O sistema de circulação foi formado pelo biofiltro, reservatório e 16 caixas de 150 L, com volume útil de 90 L de água cada. A figura 6 traz uma fotografia do sistema utilizado.

Diariamente foram registrados a temperatura e oxigênio dissolvido (OD) em água bem como semanalmente foram mensurados os parâmetros: amônia, nitrito, alcalinidade, dureza e pH no sistema de cultivo.



Figura 6 - Sistema de Recirculação da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Laranjeiras do Sul.



Fonte: A autora.

### 3.3 Estudo *in vivo*

Para a realização do experimento o projeto foi aprovado no CEUA/UFFS sob o número de protocolo 23205.001157/2018-99 (Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal da Fronteira Sul). Os alevinos de tilápia (*O. niloticus*) ( $n = 320$ ) foram adquiridos de piscicultura comercial, com peso inicial médio de 10 g e comprimento padrão médio de 8 cm. Na chegada ao laboratório, os animais foram submetidos à banho de imersão em NaCl 3% por 10 minutos como profilaxia à agentes patogênicos, conforme recomendação de Pavanelli, Eiras e Takemoto (2008). Os animais passaram por fase de aclimação de 8 dias antes do início do experimento.

O preparo da biomassa fermentada utilizada na ração foi coordenado pelo professor Dr. Thiago Bergler Bitencourt e realizado no laboratório de Química Orgânica da UFFS *campus* Laranjeiras do Sul. Para realizar o preparo do inóculo



contendo as células da levedura, primeiramente foi preparado ágar GYP (Glucose Yeast Peptone) conforme descrito por Csutak et. al (2015) contendo glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e ágar 2%; a levedura foi isolada por esgotamento e incubada a 28 °C por 48 horas (estufa Ethik Technology, 4410-5NDRE). Após o período de incubação, algumas colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina e então realizada leitura da densidade óptica a 500 nm a fim de se obter absorvância de 0,104, que conforme estudo prévio corresponde ao tubo 0,5 da escala padrão de McFarland e  $2 \times 10^6$  UFC/mL de células de *Y. lipolytica* QU69.

Foi utilizado meio de suplementação mineral descrito por Santos et al. (2013) com modificações, composto de 1% de nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ), 0,1% de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 0,05% de sulfato de magnésio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). As fermentações foram realizadas em banho com agitação tipo Dubnoff (Nova Instruments NI 1232) em intervalos de tempo pré-determinados. Foram utilizados frascos erlenmeyer com capacidade de 125 mL, contendo 5% de resíduo de casca de mandioca como fonte de carbono e 50 mL do meio de suplementação. Os frascos contendo o resíduo e o meio mineral foram autoclavados, adicionados de 1 mL da suspensão de células contendo  $2 \times 10^6$  UFC/mL e incubados em banho com agitação de 100 rpm em temperaturas e tempos pré-determinados 9 dias à 35 °C. Após o processo de bioconversão a biomassa obtida foi congelada e submetida ao processo de liofilização, para posterior uso na elaboração da ração.

O preparo da ração e a inclusão das diferentes concentrações de levedura íntegra foram baseados no trabalho de Souza (2018). Os níveis crescentes de inclusão de levedura íntegra substituíram proporcionalmente os níveis de proteína de soja. As matérias-primas e a biomassa de levedura foram pesadas e homogeneizadas, umedecidas com água até um ponto pastoso (50% de água aproximadamente), na sequência foram peletizadas numa máquina de moer carne e levadas a uma estufa com circulação de ar forçada, por um período de 12 horas a 35 °C. Após o processo de secagem e trituração da ração, as dietas foram mantidas e conservadas sob refrigeração de 4 °C durante os 35 dias de experimento.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições (n = 20 por repetição), com os animais divididos em diferentes grupos

experimentais por um período de 35 dias: grupo I (controle) peixes que receberam ração sem suplementação de levedura; grupo II (levedura 3% - T1) peixes que receberam ração com suplementação de levedura a 3%; grupo III (levedura 5% - T2) peixes que receberam ração com suplementação de levedura a 5%; Grupo IV (levedura 7% - T3) peixes que receberam ração com suplementação de levedura a 7%. A ração foi fornecida diariamente às 10 horas e às 18 horas, na proporção de 7% da biomassa durante 15 dias, em seguida o percentual da dieta foi reduzido a 4% da biomassa. Na tabela 1 está a composição relativa da ração fornecida às tilápias.

Tabela 1 - Composição relativa da ração fornecida a *O. niloticus*

<b>Tratamento</b>	Controle	3%	5%	7%
<b>Ingredientes (%)</b>				
<b>Milho</b>	29,00	29,00	29,00	29,00
<b>Farelo de soja</b>	37,00	34,00	32,00	30,00
<b>Levedura</b>	0,00	3,00	5,00	7,00
<b>Farinha de peixe</b>	28,50	28,50	28,50	28,50
<b>Sal</b>	0,50	0,50	0,50	0,50
<b>Óleo de soja</b>	4,00	4,00	4,00	4,00
<b>*Complexo vitam.</b>	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>Composição centesimal (%)</b>				
<b>Proteína bruta</b>	34	34	34	34
<b>Energia bruta</b>	2974,00	2900,00	2.850,70	2.801,40
<b>Etrato etéreo</b>	8,30	8,2	8,10	8,10
<b>Fibra bruta</b>	3,14	2,96	2,84	2,72
<b>Carboidrato</b>	32,80	31,90	31,30	30,07
<b>Cálcio (Ca)</b>	2,02	2,01	2,01	2,02
<b>Fósforo (P)</b>	1,66	1,61	1,6	1,58

Fonte: Souza (2018).

\*Níveis de garantia por porção % VD (\*); Valor Energético 0 kcal=0 kJ; Vitamina A 600 mcg 100\*\*; Vitamina B1 (Tiamina) 1,2 mg 100\*\* Vitamina B2 (Riboflavina) 1,3 mg 100\*\* Vitamina B3 (Niacina) 16 mg 100\*\* Vitamina B5 (Ácido pantotênico) 5,0 mg 100\*\* Vitamina B6 (Piridoxina) 1,3 mg 100\*\* Vitamina B7 (Biotina) 30 mcg 100\*\* Vitamina B9 (Ácido fólico) 240 mcg 100\*\* Vitamina B12 (Cianocobalamina) 2,4 mcg 100\*\* Vitamina C 45 mg 100\*\* Vitamina D 5 mcg 100\*\* Vitamina E 10 mg 100\*\* Cálcio 150 mg 15\*\* Cobre 468 mcg 52\*\* Cromo 18 mcg 52\*\* Ferro 7,3 mg 52\*\* Flúor 2,1 mg 52\*\* Fósforo 98 mg 14\*\* Iodo 68 mcg 52\*\* Magnésio 44 mg 17\*\* Manganês 1,2 mg 52\*\* Molibdênio 23 mcg 52\*\* Selênio 18 mcg 52\*\* Zinco 3,6 mg 52\*\*.

### 3.4 Avaliação de parâmetros zootécnicos

No início e no final do experimento foi realizada uma biometria total mensurando peso, comprimento total, comprimento padrão dos peixes. Estas variáveis foram determinadas utilizando uma balança digital e um ictiômetro.

Foram calculadas a taxa de crescimento para ganho de peso  $GP = [(Peso\ final - Peso\ inicial) / tempo] \times 100$ , além do ganho em comprimento (GC), obtido pela diferença entre a medida final e a inicial (cm); e a taxa de sobrevivência (TS), obtida a partir do quociente de animais estocados e animais vivos ao final de cada tratamento  $(animais\ vivos) / (total\ de\ animais\ estocados) \times 100$ .

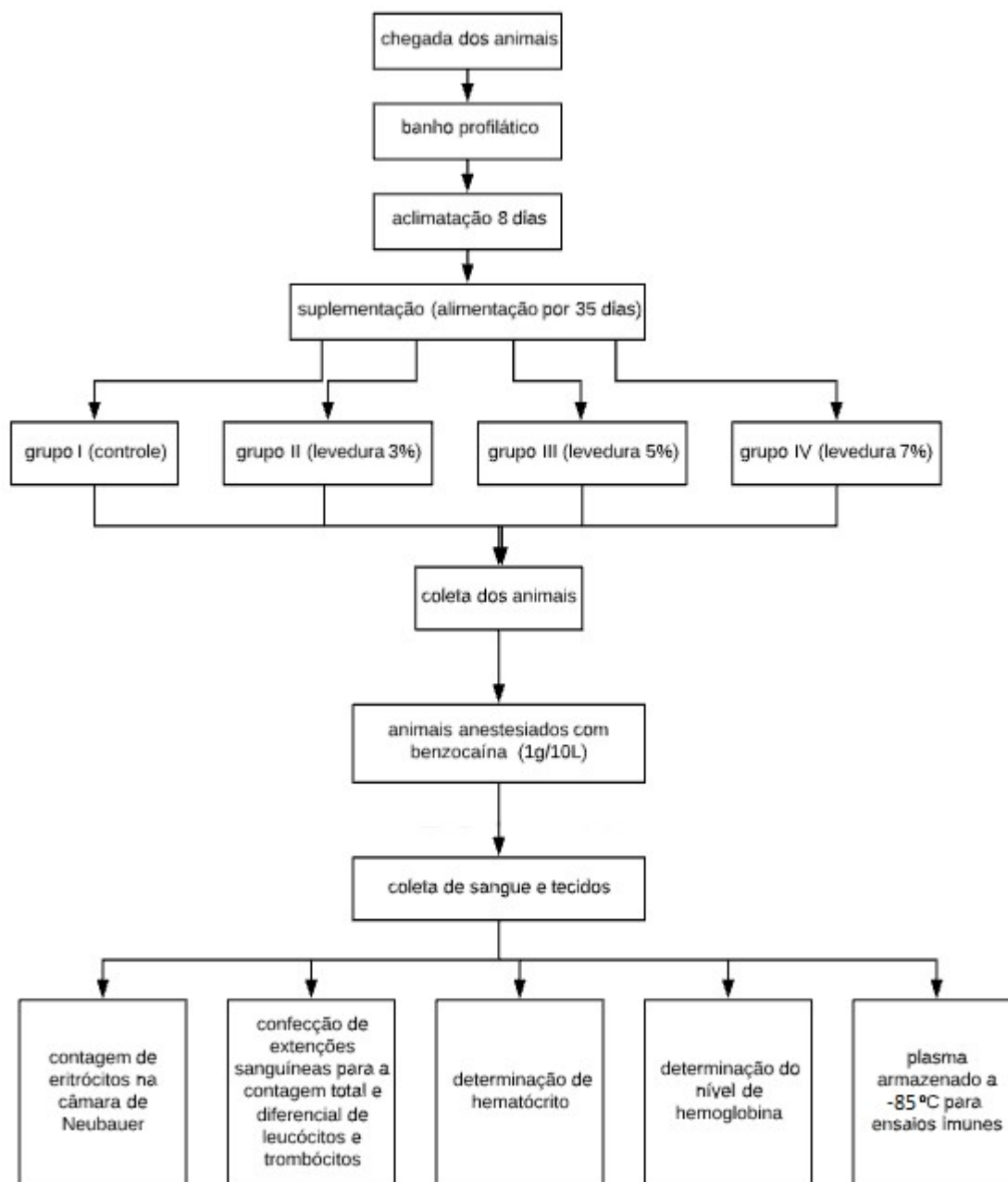
### 3.5 Coleta de sangue e preparo de plasma

Ao final do período de suplementação os animais foram coletados, anestesiados com benzocaína (1 g/10 L) para coleta de sangue por punção do vaso caudal utilizando seringa contendo solução de anticoagulante heparina e sacrificados por aprofundamento do estado anestésico com benzocaína (3 g/10 L) para posterior remoção de tecidos para avaliações imunes.

O sangue coletado foi separado em alíquotas para as seguintes análises: contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer e confecção de extensões sanguíneas em triplicata posteriormente coradas com May-Grunwald/Giemsa pelo método de Rosenfeld (ROSENFELD, 1947) e utilizadas para contagem total e diferencial de leucócitos e contagem total do número de trombócitos (BECKER, 2018). Para a contagem dos leucócitos totais e trombócitos foi realizada a contagem das células (hemácias, leucócitos e trombócitos) em esfregaço até atingir 200 leucócitos e após, foram identificadas as porcentagens de leucócitos e trombócitos em relação ao número total das células contadas. Ainda, uma alíquota foi armazenada em capilares de microhematócrito para determinação do percentual de hematócrito (GOLDENFARB et al., 1971). Foi realizada a determinação do conteúdo de hemoglobina através de kit colorimétrico (Bioclin). Além disso, parte do sangue coletado foi armazenado em microtubos e centrifugado a 3000 xg durante 10 minutos. O plasma recolhido foi armazenado a -20 °C até a utilização para os ensaios imunes.

Os rins coletados foram homogeneizados em tampão PBS, pH 7,2 e centrifugados a 5000  $\times g$  por 10 minutos. O sobrenadante dos homogenatos foi armazenado a  $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a utilização para os ensaios imunes. A figura 7 mostra o fluxograma da metodologia realizada no ensaio *in vivo*.

Figura 7 - Fluxograma da metodologia do ensaio *in vivo*



Fonte: a autora

### 3.6 Determinação dos níveis de lisozima

Os níveis de lisozima sérica e renal dos peixes foram medidos por espectrofotometria de acordo com a metodologia de Ellis (1990) com modificações (VILLAMIL et al., 2002). Uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) (0,5 mg/mL) em tampão fosfato 0,04 M, pH 6,2 foi utilizada como substrato. Para a curva de calibração utilizou-se lisozima liofilizada (100 µg/mL) de clara de ovo de galinha em tampão fosfato 0,04 M, pH 6,2. Para cada ensaio foi preparada uma nova curva padrão. As concentrações de lisozima utilizadas para a construção da curva padrão foram 100, 50, 40, 30, 20, 15, 12,5, 10, 7,5, 5, 2,5 e 0 µg de lisozima/mL. Para a realização do ensaio, 30 µL das amostras de plasma e de homogenato de rim de juvenis de Tilápia e dos padrões da curva foram pipetadas em triplicata em microplaca de 96 poços, incubadas a 35 °C por dois minutos e acrescidas de 200 µL da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,5 mg/mL) em tampão fosfato 0,04 M, pH 6,2. Após agitação, a redução na densidade óptica ( $\Delta DO$ ) foi acompanhada em espectrofotômetro a 492 nm com medidas a cada 30 segundos por 30 minutos. Os resultados foram expressos em µg de lisozima/mL.

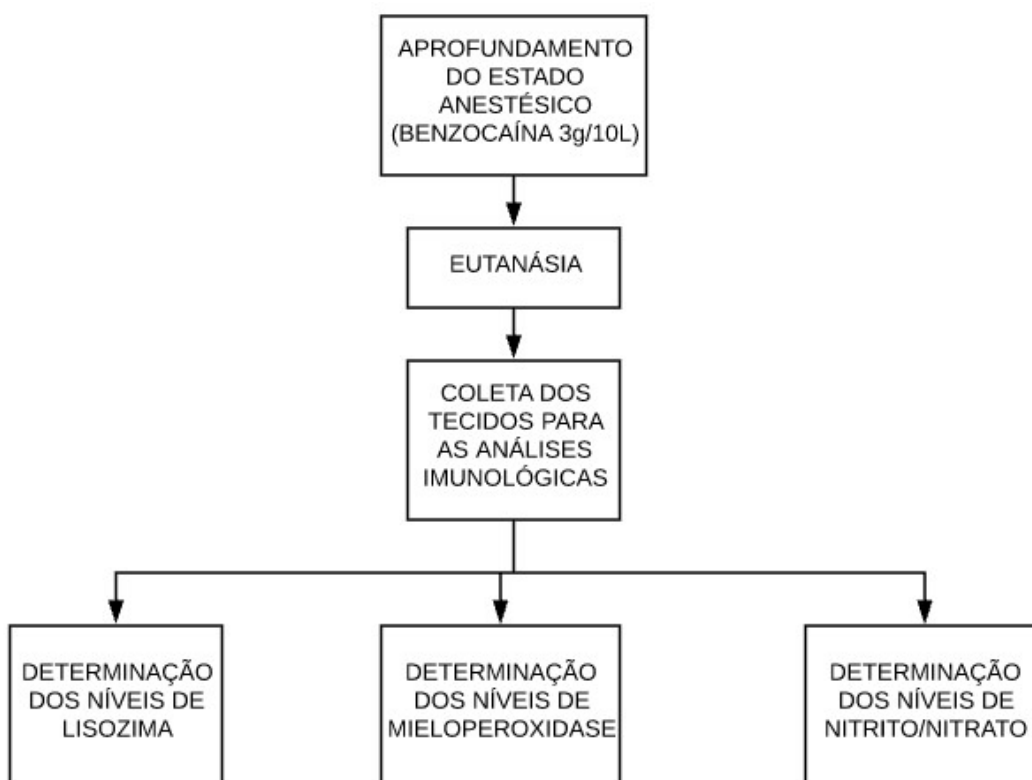
### 3.7 Determinação das concentrações de nitrato/nitrito

O Óxido Nítrico (NO) foi quantificado por meio da formação de seus metabólitos: nitrato ( $NO_3^-$ ) e nitrito ( $NO_2^-$ ), utilizando-se a reação de Griess (GREEN et al., 1982). As amostras de plasma e de homogenato de rim dos animais foram desproteinizadas (através de incubação com sulfato de zinco 10%) (100 µL) foram incubadas com 200 µL da solução de Griess (sulfanilamida (1%) (p/v) em HCl 5% (v/v), N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v) e cloreto de vanádio III 0.05 M (1:1)) em microplaca durante 40 minutos, a 37 °C (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001; VILLAMIL et al., 2002). A reação de  $NO_2^-$  com esse reagente produz uma coloração rósea, que foi quantificada por meio da leitura das densidades ópticas em leitora de microplacas em 540 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão realizada com uma solução de nitrito de sódio ( $NaNO_2$ ) (0-200 µM) e expressos em µM de nitrato/nitrito.

### 3.8 Determinação da atividade da mieloperoxidase

A determinação da atividade da mieloperoxidase no plasma e rim foi realizada segundo a metodologia de Liz et al. (2011) com modificações. Onde 20 µL de amostra de plasma ou de homogenato de rim foram adicionados a 180 µL do meio de reação composto por: tampão fosfato 0,5 M pH 6,0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1% e O-dianisina.2HCl 10 mg/mL. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 M e as amostras foram centrifugadas por 6 minutos a 5488 xg. O sobrenadante foi lido em leitora de microplacas a 450 nm e os resultados foram expressos em densidade óptica. A figura 8 mostra um fluxograma dos ensaios imunes realizados.

Figura 8 - Fluxograma dos ensaios imunes



Fonte: a autora.

### **3.9 Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  Desvio Padrão. Todas as análises foram realizadas no programa InStat. O delineamento utilizado neste estudo foi o inteiramente casualizado. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk à 5% de probabilidade. A homocedasticidade foi verificada através do Teste de Bartlett. Quando atenderam aos pressupostos de normalidade e homocedasticidade, as comparações estatísticas foram submetidas à análise de variância e a comparação das médias foi feita através do Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA E ZOOTÉCNICOS

A fim de garantir o bem-estar dos animais durante o experimento, a qualidade de água do sistema de circulação foi monitorada. Durante o período do experimento os padrões de qualidade da água se mantiveram dentro do aceitável para a espécie (ZIMMERMANN; FITZSIMMONS, 2004). A temperatura da água variou entre 24 a 27 °C, o oxigênio dissolvido ficou entre 5,04 a 7,2 mg/L, a amônia oscilou entre 0,1 a 0,25mg/L, o nitrito variou entre 0,025 a 0,2 mg/L, a alcalinidade entre 20 a 30 mg/L, a dureza da água ficou entre 40 e 80 mg.L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> e o pH entre 6,5 e 7,0.

Com o objetivo de analisar o efeito da adição da biomassa de levedura *Y. lipolytica* sobre o crescimento dos peixes foram mensurados alguns parâmetros zootécnicos entre o tratamento controle e os tratamentos com adição de biomassa de levedura. Os parâmetros zootécnicos analisados foram o ganho em peso, o ganho em comprimento (padrão e total), a taxa de sobrevivência. Os dados obtidos constam na tabela 2, abaixo.

Tabela 2 - Parâmetros zootécnicos de *O. niloticus* submetidos a dieta com diferentes níveis de adição de biomassa de levedura *Y. lipolytica*.

Tratamentos	Controle	3%	5%	7%
GP (g)	32,35 ± 2,97	36,41 ± 2,06	31,93 ± 4,70*	37,42 ± 2,34 <sup>#</sup>
GCP (cm)	3,95 ± 0,28	3,79 ± 0,11	3,37 ± 0,36*	4,12 ± 0,37 <sup>#</sup>
GCT (cm)	4,23 ± 0,25	4,56 ± 0,48*	4,06 ± 0,37*	5,33 ± 0,21 <sup>#</sup>
TS (%)	98,75%	98,75%	98,75%	95%

Fonte: a autora

GP – ganho em peso; GCP – ganho em comprimento padrão; GCT – ganho em comprimento total; TS – taxa de sobrevivência; <sup>#</sup>estatisticamente diferente do controle p <0,05. \* estatisticamente diferente da concentração 7% p <0,05.

Em relação ao ganho em peso houve diferença significativa entre o tratamento controle e o tratamento com 7% de adição. Diferiram significativamente ainda os tratamentos com adição de 5% e 7%. Tendo o tratamento com 7% de adição de biomassa de levedura apresentado melhor desempenho. No que se refere



ao ganho em comprimento padrão o tratamento com 7% de adição de biomassa de levedura apresentou aumento significativo comparado aos grupos controle e 5%. Para o ganho em comprimento total, o tratamento com 7% de adição de biomassa de levedura segue apresentando o melhor desempenho, sendo significativamente maior quando comparado aos grupos controle, 3 e 5%. Ainda, não foram observadas alterações significativas na taxa de sobrevivência dos grupos experimentais e controle.

Resultados eficientes de ganho de peso e crescimento também foram observados por outros autores com níveis crescentes de adição de levedura na dieta de peixes. A inclusão de 1, 2 e 4% da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de híbridos de Perca (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) proporcionou índices de ganho de peso 20% maiores em relação ao tratamento que recebeu a dieta com ração sem inclusão de levedura (LI; GATLIN; DELBERT, 2003). Em outro estudo os autores adicionaram níveis crescentes de levedura *spray-dried* (0 a 6%) nas dietas de alevinos de tilápia do Nilo e verificaram melhora linear para o peso, o comprimento, a taxa de eficiência proteica e a conversão alimentar em relação ao aumento do nível de levedura (MEURER et al., 2000).

Em outro trabalho, avaliou-se a adição de células íntegras de levedura e seus derivados em dietas para juvenis de tilápia do Nilo. Os peixes foram alimentados *ad libitum* com dietas isoproteicas e isocalóricas contendo levedura íntegra de cana-de-açúcar (*S. cerevisiae*) (LI), levedura autolisada (LA) e parede celular (PC) adicionados na proporção de 25% da proteína bruta total, comparadas com uma dieta controle (CO), sem adição de levedura. O ganho em peso foi melhor nos peixes alimentados com as dietas LA (114,70 g) e PC (131,03 g), aplicando-se o índice relativo de comparação (IRC%), atribuindo-se 100% à média do tratamento controle, observa-se que os tratamentos LI, LA e PC proporcionaram valores superiores de ganho de peso (8,04, 13,82 e 30,03%, respectivamente) em comparação ao tratamento sem adição dos ingredientes teste. Assim como houve aumento em relação à taxa de crescimento específico (LA=1,79 e PC=1,93%), à proteína bruta no ganho de peso (LA=14,45 e PC=15,62%) e ao conteúdo corporal proteico (GONÇALVES et. al., 2010).

O melhor desempenho das rações com os níveis mais altos de inclusão de levedura podem ser atribuídos a uma melhora na qualidade da ração quanto a seu conteúdo vitamínico e balanço de aminoácidos. Isso pode ser explicado porque,

através da adição da levedura, foram aumentados os níveis das vitaminas do complexo B e melhorado o balanço de aminoácidos, já que a levedura é uma boa fonte de vitaminas e aminoácidos essenciais (BUTOLO, 1997).

No presente estudo os parâmetros zootécnicos apresentaram diferença significativa entre os tratamentos que receberam adição de biomassa da levedura e o controle. A adição de 7% da levedura da dieta se mostrou a quantidade mais eficiente para promover melhora nos parâmetros zootécnicos. Tais resultados sugerem a eficiência da levedura em promover o crescimento e ganho de peso, demonstrando que a levedura *Y. lipolytica* pode ser usada com segurança como aditivo na ração de peixes.

#### 4.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Através do sangue é possível fazer diversas análises que demonstram as condições fisiológicas, bem como o diagnóstico de enfermidades (TAVARES-DIAS et al., 2009). Portanto, uma análise dos parâmetros hematológicos pode dar uma ideia da condição do animal ao comparar com os níveis basais para a espécie. Estes parâmetros podem ser utilizados no controle de patologias e estresse, seja qual for a causa e ainda demonstram o estado fisiológico do animal.

A contagem de eritrócitos, a quantidade de hemoglobina e os índices hematimétricos de hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. O hematócrito e o VCM apresentaram redução significativa entre os grupos 5 e 7% de adição de biomassa.

Como pode ser observado na tabela 3, no presente trabalho os valores de eritrócitos, hemoglobina e VCM estão dentro da faixa proposta para a espécie *Oreochromis niloticus*: eritrócitos com valores de 1,31 a 2,47  $\times 10^6$ .  $\mu\text{L}^{-1}$ , hemoglobina de 5 a 10  $\text{g.dL}^{-1}$ , VCM 246 a 118,6 fL. Já os valores de hematócrito e CHCM encontram-se acima e abaixo, respectivamente, do proposto para a espécie (hematócrito de 18,5 a 32,5%, CHCM 20 a 33,8  $\text{g.dL}^{-1}$ ) (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). As alterações observadas em todos os grupos experimentais para o hematócrito e para o CHCM, bem como as reduções significativas observadas para o hematócrito e para o VCM no grupo 7% comparado ao grupo 5% podem estar

relacionadas a alterações da atividade hematopoiética do baço e do rim ou a situações de estresse (SILVA, LIMA, BLANCO, 2012; LABARRERE, et al., 2012).

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos do sangue de *O. niloticus* alimentada com ração com diferentes níveis de adição de biomassa de *Y. lipolytica*.

	Controle	3%	5%	7%
Eritrócitos	1,96 ± 0,22	1,78 ± 0,19	1,76 ± 0,33	1,76 ± 0,32
Hemoglobina	6,76 ± 0,93	6,99 ± 1,47	6,67 ± 1,00	6,40 ± 1,20
Hematócrito	37,69 ± 6,61	38,5 ± 5,34	39,56 ± 5,25	34,5 ± 5,15 <sup>#</sup>
HCM	35,84 ± 5,90	40,87 ± 5,77	35,95 ± 7,47	35,72 ± 6,82
CHCM	18,57 ± 3,95	18,39 ± 3,95	16,72 ± 3,32	19,54 ± 3,48
VCM	201,76 ± 37,87	213,71 ± 35,01	219,42 ± 42,43	182,72 ± 41,39 <sup>#</sup>

Fonte: a autora

Eritrócitos ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ); Hemoglobina-Hb (g/dL); Hematócrito (Hm%); Hemoglobina Corpuscular Média-HCM (pg); Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média-CHCM (g/dL); Volume Corpuscular Médio-VCM (fL). # $p < 0,05$  estatisticamente diferente de 5%.

Estudos indicam que a adição de leveduras, seja na forma íntegra ou lisada ou ainda parede celular apresenta poucos efeitos sobre os parâmetros hematológicos. Estudo de Hisano et. al., (2006) não encontraram diferença significativa nos parâmetros hematológicos ao avaliar os efeitos em juvenis da tilápia do Nilo da inclusão de três níveis de levedura íntegra ou autolisada (1,0; 2,0 e 3,0%) e três níveis de parede celular (0,1; 0,2 e 0,3%). Ainda, Hassaan et al. (2014) alimentaram tilápias do Nilo com dietas formuladas com quatro níveis de *Bacillus licheniformis* (0,0;  $0,24 \times 10^6$ ,  $0,48 \times 10^6$  e  $0,96 \times 10^6$  UFC/g) e três níveis de extrato de levedura (*Diamond VXPC*®) (0%, 0,5% e 1%) isolados e em associação (simbiótico). Índices hematológicos, proteína total e albumina de *O. niloticus* aumentaram significativamente na presença de *B. licheniformis* até  $0,48 \times 10^6$  UFC/g, já os níveis de extrato de levedura não tiveram efeito sobre os parâmetros hematológicos.

### **4.3 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS E TROMBÓCITOS**

A contagem e identificação das células sanguíneas, bem como suas quantidades relativas podem revelar muito sobre o estado de saúde de um animal. Alterações na contagem relativa das células sanguíneas de defesa podem indicar a ocorrência de processos infecciosos, estresse ou situações que ativem o sistema imune (SILVA, LIMA, BLANCO, 2012).

Para os trombócitos, a contagem em todos os tratamentos foi muito semelhante demonstrando que o uso da levedura não causou alteração na porcentagem de trombócitos em relação ao número total de eritrócitos (Tabela 4).

Para os leucócitos totais, a contagem em todos os tratamentos foi muito semelhante demonstrando que o uso da levedura não causou alteração na porcentagem de leucócitos em relação ao número total de eritrócitos (Tabela 4).

A contagem diferencial de leucócitos apresentou algumas diferenças significativas. A quantidade relativa de neutrófilos aumentou significativamente conforme o nível de adição da levedura na dieta comparado ao grupo controle. Além disso, também houve aumento significativo do número de neutrófilos entre os tratamentos com 5% e 7% de adição de biomassa de levedura comparados ao grupo 3%, como pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4- Contagem total de leucócitos e trombócitos e contagem diferencial de células de defesa do sangue de *O. niloticus* alimentadas com ração com diferentes níveis de adição de biomassa de *Y. lipolytica*.

	CONTROLE	3%	5%	7%
Trombócitos (%)	0,66 ± 0,42	0,72 ± 0,38	0,66 ± 0,33	0,49 ± 0,22
Leucócitos totais (%)	6,42 ± 1,21	6,86 ± 0,74	6,75 ± 0,90	6,50 ± 0,45
Neutrófilos (%)	26,88 ± 6,49	35,91 ± 3,53*	40,40 ± 2,74*#	43,87 ± 3,12*#
Linfócitos (%)	67,82 ± 5,61	61,15 ± 3,74*	56,35 ± 2,48*#	53,98 ± 3,72*#
Monócitos (%)	2,29 ± 0,66	2,76 ± 0,63	3,37 ± 0,69*#§	2,28 ± 0,53

Fonte: a autora

\*p<0,05 estatisticamente diferente do controle. # p<0,05 estatisticamente diferente de 3%. § p<0,05 estatisticamente diferente de 7%.

Os neutrófilos são componentes do sistema imunológico que formam a primeira linha de defesa celular contra agentes invasores e têm como função a fagocitose. Essas células estão envolvidas com a defesa inata, não específica e rápida (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Além disso, são células sensíveis à desnutrição proteica e energética, e seus valores podem variar de acordo com a composição da dieta do peixe (FLAJNIK, DU PASQUIER, 2004). Os resultados obtidos corroboram essa observação, pois os maiores valores de neutrófilos foram constatados nos peixes alimentados com dietas com adição de biomassa de levedura. Como as leveduras são fontes de proteínas, as doses mais altas de adição de biomassa podem ter fornecido maior aporte proteico comparados aos grupos com taxas mais baixas e com o controle.

Em estudo avaliando a inclusão de 1, 2 e 4% da levedura *S. cerevisiae* na dieta de híbridos de Perca (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*), a suposição da capacidade imunoestimulante das leveduras foi reforçada testando parâmetros como a produção de radicais oxidativos, neutrófilos no sangue, produção de ânion superóxido extracelular e intracelular, de macrófagos no rim cefálico e lisozima sérica após 16 semanas de alimentação de cada dieta. Verificou-se que os peixes alimentados com 2% de levedura de cerveja tiveram aumento significativo (P <0,01) nos radicais oxidativos e neutrófilos no sangue, produção de ânion superóxido

extracelular e macrófagos no rim cefálico do que peixes alimentados com a dieta controle. Sem diferença significativa para os outros parâmetros (LI; GATLIN; DELBERT 2003).

Além dos neutrófilos, os monócitos e macrófagos são células envolvidas na resposta imune inata. Quando os monócitos migram do sangue para os tecidos maturam e se tornam macrófagos. Os macrófagos respondem à presença de microrganismos quase tão rapidamente quanto os neutrófilos, mas persistem por muito mais tempo no local da infecção e, portanto, são as células dominantes nos processos tardios de resposta imune inata (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Em relação à contagem dos monócitos foi observado aumento significativo para o grupo 5% em relação aos grupos controle, 3 e 7% de biomassa. O aumento no número de monócitos na concentração 5% de adição de biomassa de levedura indica que sua aplicação na dieta pode melhorar a capacidade de resposta do sistema imune, deixando os animais mais preparados para o combate a agentes invasores.

Por outro lado, foi observado uma redução significativa na contagem diferencial de linfócitos em todos os grupos de tratamento comparado com o grupo controle assim como dos grupos 5% e 7 %, em relação ao grupo 3% de biomassa. Os linfócitos são leucócitos que estão relacionados à produção de anticorpos e resposta celular humoral e, portanto, estão envolvidos na defesa específica. Estes resultados podem indicar que a levedura teve efeito imunoestimulante na imunidade inata demonstrado pelo aumento no número de neutrófilos e monócitos, mas não na imunidade adaptativa demonstrado pela diminuição do número de linfócitos.

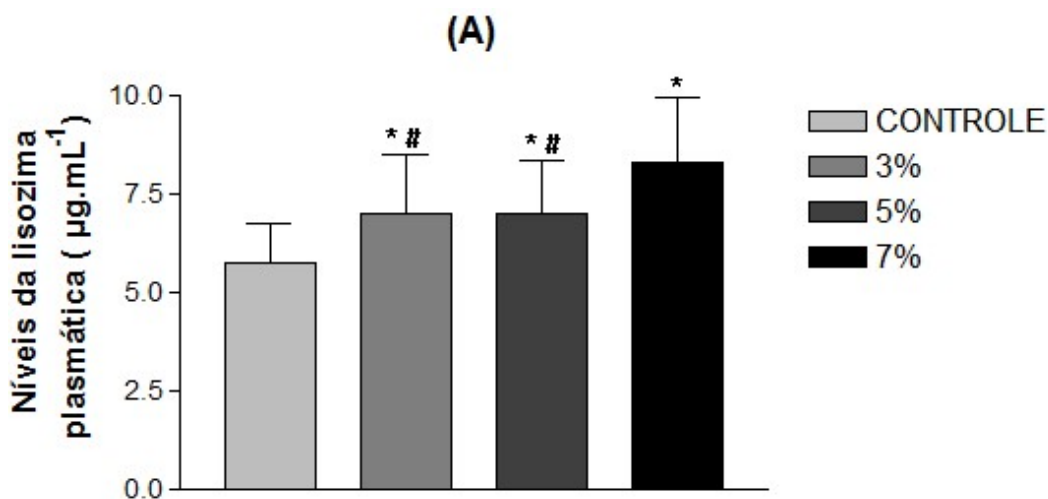
Em geral a linfopenia está associada a algumas condições como a resposta secundária de estresse. Em relação aos leucócitos sob condições de estresse, em geral resultam em bloqueio da produção de linfócitos, monocitopenia e neutrofilia (ANDERSON; SIWICK, 1994). Porém entre os grupos do presente estudo não houveram diferenças de estresse aos quais os animais foram submetidos, visto que as coletas seguiram o mesmo procedimento. A conclusão que se pode chegar é que a levedura atuou como imunoestimulante nas células fagocitárias (neutrófilos e monócitos) mas não teve ação nos linfócitos.

#### 4.4 NÍVEIS DE LISOZIMA

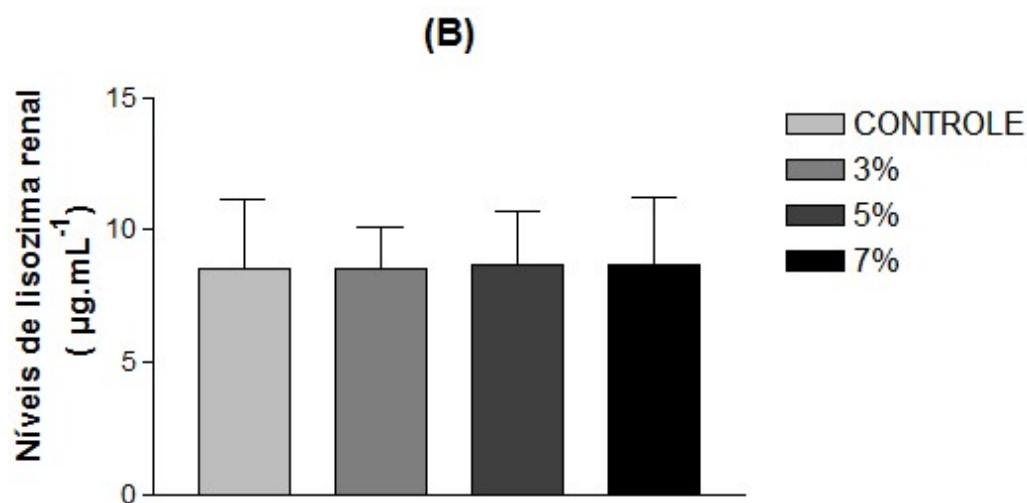
Um componente do sistema imune bastante importante é a lisozima. Esta enzima é um agente bacteriolítico encontrado em várias espécies de peixes marinhos e de água doce (LIE et al., 1989). Ela é produzida durante as infecções e é capaz de lisar a parede celular de bactérias, atuando nas ligações beta 1,4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e o ácido N-acetilglicosamínico (PAULSEN et al., 2003). Avaliar o nível de lisozima dará uma ideia de como os animais estão preparados para resistir a uma infecção e ainda, se a adição da biomassa de levedura na dieta pode interferir neste parâmetro.

Foram analisados os níveis de lisozima no plasma e no rim dos animais. Observou-se um aumento significativo da atividade da lisozima plasmática compatível com o aumento da adição de levedura na dieta das tilápias. Por outro lado, não houve alterações dos níveis de lisozima renais, conforme pode ser observado na figura 9. Os níveis de lisozima sérica podem ser utilizados como indicador de respostas imunes não específicas em peixes (TORT; BALASCH; MACKENZIE, 2003) e os aumentos observados neste estudo indicam que a levedura atua como estimulante do sistema imune inato, em especial de alguns leucócitos da corrente sanguínea.

Figura 9 - (A) Níveis da enzima Lisozima em  $\mu\text{g/mL}$  no plasma; (B) Níveis da enzima Lisozima em  $\mu\text{g/mL}$  no rim de *O. niloticus* alimentada com ração com diferentes níveis de adição de biomassa de levedura *Y. lipolytica*. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP; n=16 para cada tratamento.



\*  $p < 0,05$  estatisticamente diferente do controle. #  $p < 0,05$  estatisticamente diferente de 7%.



Fonte: a autora

Outros estudos com adição de probióticos na ração obtiveram resultados semelhantes em relação aos níveis de lisozima. Um estudo com juvenis de linguado (*Paralichthys olivaceus*) alimentados com mistura de probióticos (*Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. acidophilus*, *B. subtilis* e *S. cerevisiae*) e extratos vegetais concluiu que a resposta imune e em especial a atividade da lisozima aumentaram significativamente em peixes alimentados com dieta suplementar das semanas 4 a 12 em comparação com o controle (HARIKRISHNAN et al., 2011). Além disso, o uso de *S. cerevisiae* na dieta de tilápias promoveu aumento do número de monócitos e



da capacidade fagocítica bem como da atividade da lisozima nos animais alimentados com 3,5% de levedura e desafiados com a bactéria *Streptococcus agalactiae* (AMIN; JUSADI; SUKENDA, 2015). Ainda, o uso do *S. cerevisiae* em garoupas demonstrou que na medida em que as concentrações de levedura adicionadas à dieta foram aumentando foi observado aumentos proporcionais na atividade sérica da lisozima, do sistema complemento alternativo, da atividade fagocítica, do nível de explosão respiratória e da atividade da superóxido dismutase (SOD) dos leucócitos do rim cefálico (CHIU et al., 2010).

Um estudo investigou o potencial prebiótico de Immunowall® (um prebiótico comercial que consiste em alta concentração de  $\beta$ -glucano de levedura ( $\beta$ G) e mananoligossacarídeos (MOS)) na nutrição e desempenho de saúde da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. Três grupos de peixes foram alimentados com dietas contendo 0%, 0,1% e 0,2% de Immunowall® por dois meses. A resposta imunológica não específica (por exemplo, atividade fagocítica, índice fagocítico e atividade da lisozima) foram superiores em 0,2% Immunowall® (ABU-ELALA et al., 2018).

Considerando que na constituição de leveduras em geral existem diversas substâncias como  $\beta$ -glucanos e manoproteínas que possuem potencial imunoestimulante tanto de respostas humorais (atividade da lisozima e complemento) quanto celulares (atividades de ruptura fagocítica e respiratória e morte bacteriana) *in vitro* e *in vivo* (CHEN; AINSWORTH, 1992), podemos supor que o uso da levedura *Y. lipolytica* na ração para tilápias apresenta potencial para melhorar o sistema imune dos animais durante o ciclo produtivo.

#### 4.5 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

Enzima envolvida na destruição dos microrganismos invasores durante a fagocitose, a atividade da mieloperoxidase (MPO) plasmática apresentou diferença significativa para os grupos 3 e 5% comparados ao grupo controle. Ainda, o grupo 7% apresentou uma atividade significativamente menor comparado aos demais tratamentos (3 e 5%). Para a MPO renal também foram observadas diferenças

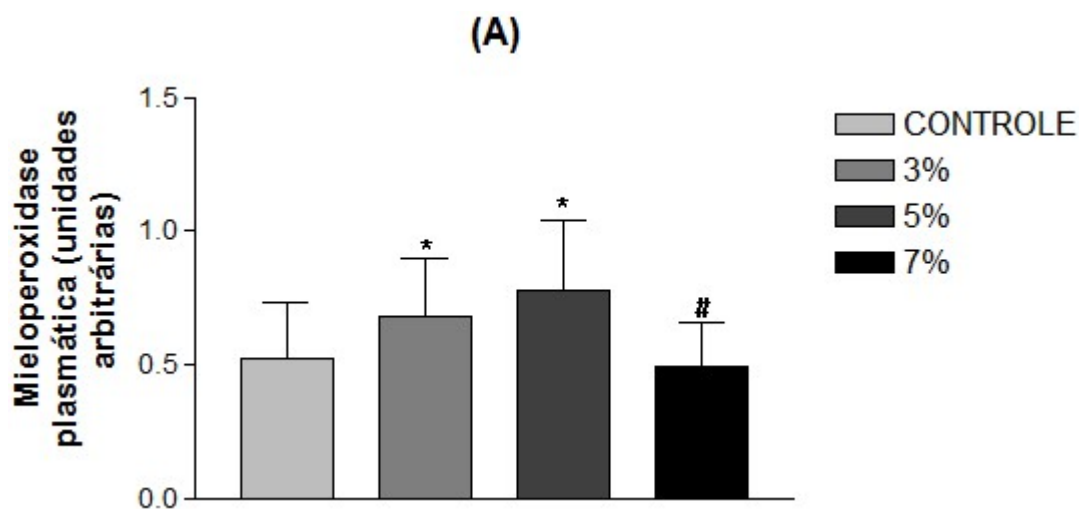
significativas. O grupo 3% apresentou um aumento significativo de atividade da mieloperoxidase quando comparado aos grupos controle, 5 e 7%(figura 10).

Foi observado que concentrações mais baixas de adição de biomassa de levedura na alimentação obtiveram maior nível de atividade da MPO em relação ao controle e à concentração mais alta, tanto no rim quanto no plasma. Um estudo com carpa (*Catla catla*) que recebeu administração alimentar do probiótico *Bacillus amyloliquefaciens* FPTB16 em três níveis de inclusão diferentes,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$  e  $1 \times 10^7$  UFC/g, observou que a atividade da mieloperoxidase bem como outros marcadores de resposta imune apresentaram aumento significativo em peixes alimentados com  $10^8$  e  $10^9$  UFC/g de *B. amyloliquefaciens*, com os maiores valores observados no caso de  $10^9$  UFC/g (DAS et. al., 2013), diferentemente do observado no presente trabalho, onde os níveis de adição de levedura mais baixos foram os que apresentaram diferença significativa em relação a este parâmetro.

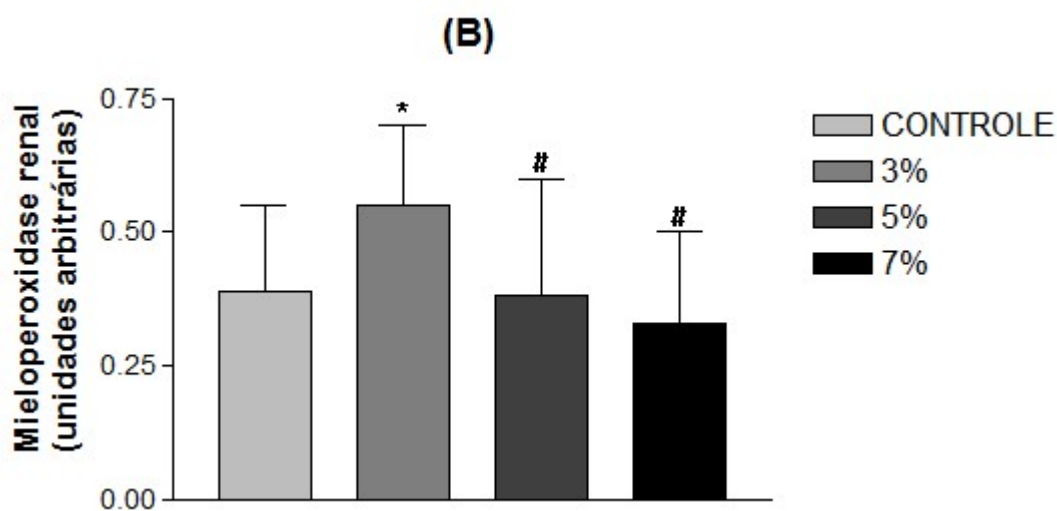
Em outro estudo foi avaliado o papel de *Y. lipolytica* N-6, de um ambiente natural hipersalino como imunoestimulante da resposta imune inespecífica em Pargo-vermelho (*Lutjanus peru*) após desafio com *Vibrio parahaemolyticus*. Foi observado um aumento significativo na resposta imune inespecífica, como explosão respiratória, atividade fagocítica, óxido nítrico e atividade da mieloperoxidase. Além disso, foi observado também aumento nas atividades de superóxido dismutase e catalase e redução da apoptose de leucócitos causada por *V. parahaemolyticus*. Estes resultados apoiam a hipótese de que a levedura *Y. lipolytica* pode estimular os parâmetros imunes inespecíficos e o mecanismo imunológico antioxidante nos leucócitos (ALAMILLO et al., 2017).

Portanto as concentrações 3% e 5% de adição de biomassa de levedura na dieta dos peixes pode ter funcionado como imunoestimulante. A maior atividade da MPO indica que os animais que receberam este nível de adição na dieta estão melhor preparados para responder a agentes causadores de enfermidades em comparação aos animais que não receberam a adição de biomassa de levedura na ração.

Figura 10 - (A) Atividade da enzima mieloperoxidase no plasma; (B) Atividade da enzima mieloperoxidase no rim de *O. niloticus* alimentada com ração com diferentes níveis de adição de biomassa de *Y. lipolytica*. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP; n=16 para cada tratamento.



\* $p < 0,05$  estatisticamente diferente do controle; # $p < 0,05$  estatisticamente diferente de 3% e de 5%.



Fonte: a autora

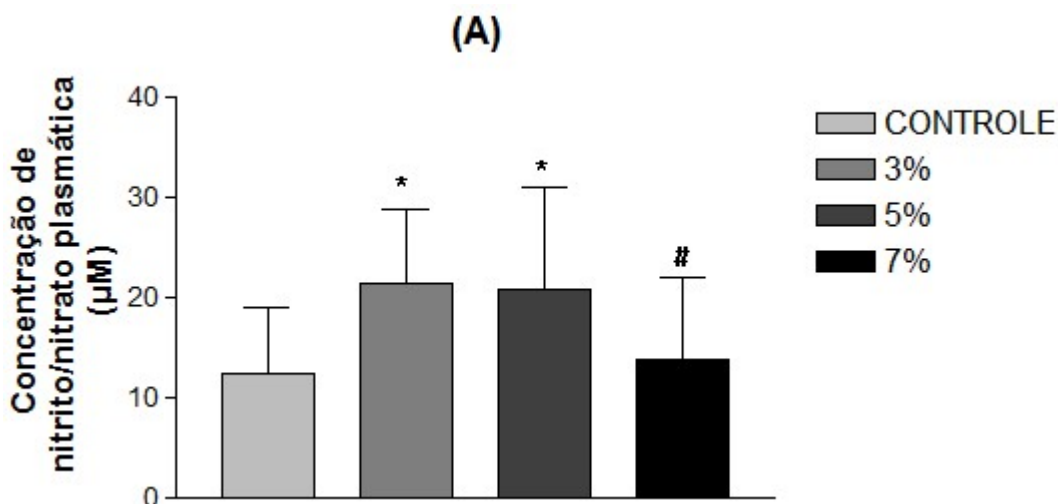
\* $p < 0,05$  estatisticamente diferente do controle; # $p < 0,05$  estatisticamente diferente de 3%.

#### 4.6 CONCENTRAÇÕES DE NITRATO/NITRITO

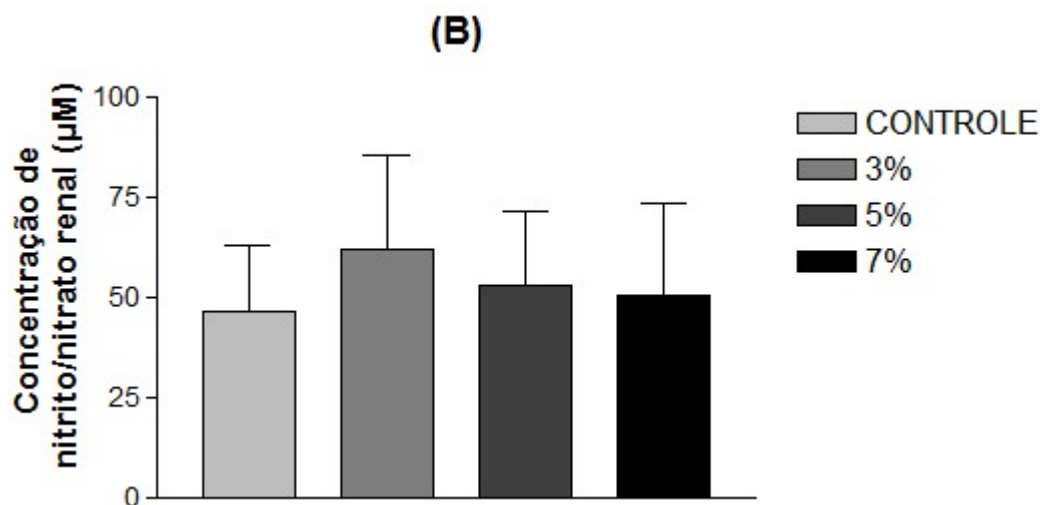
O nível de óxido nítrico NO é medido indiretamente pelo conteúdo de nitrito/nitrato. O radical óxido nítrico (NO) está implicado em uma variedade de processos como neurotransmissão, morte de células tumorais, imunidade e processos inflamatórios, com efeitos citoprotetores e citotóxicos (MOSHAGE, et al., 1995).

Foram avaliados os níveis de nitrito/nitrato no plasma e no rim das tilápias. Na análise do plasma, os maiores níveis de nitrito/nitrato foram encontrados nos tratamentos com adição de 3% e 5% de biomassa de levedura na ração comparados com o grupo controle. Ainda, foi observada diferença significativa entre os grupos 3 e 7% de tratamento. Por outro lado, na análise dos homogenatos de rim os níveis de nitrito/nitrato não apresentaram diferença significativa (figura 11).

Figura 11 - (A) Concentração de nitrito/nitrato no plasma; (B) concentração de nitrito/nitrato no rim de *O. niloticus* alimentada com ração com diferentes níveis de adição de biomassa de levedura *Y. lipolytica*. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP; n=16 para cada tratamento.



\*p<0,05 estatisticamente diferente do controle. #p<0,05 estatisticamente diferente de 3%.



Fonte: a autora

Considerando o potencial de leveduras atuarem como imunoestimulantes, um estudo utilizando diferentes concentrações (zero; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2%) de um prebiótico de levedura (GroBiotic®-A) durante 8 semanas em solha juvenil (*Platichthys stellatus*) demonstrou um aumento significativo do conteúdo de óxido nítrico nos tratamentos com as concentrações mais elevadas de prebiótico (WANG et al., 2016). Outro estudo buscou demonstrar os efeitos da adição de levedura nucleotídica (Nu-Pro®) (NP) à proteína base, sobre a atividade enzimática antioxidante e a resposta imune em tecidos hepáticos e sanguíneos da truta arco-íris

(*Oncorhynchus mykiss*). Ao longo do período de crescimento de 60 dias, o grupo de controle foi alimentado com uma dieta basal à base de farinha de peixe, e três outros grupos foram alimentados com dietas nas quais 20 (NP 20), 40 (NP 40) e 60% (NP 60) de farinha de peixe foram substituídos com nucleotídeo (levedura Nu-Pro® (NP)). As atividades da lisozima sérica (LYZ) e da mieloperoxidase (MPO) e o nível de óxido nítrico (NO) do tecido hepático aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) em peixes alimentados com dietas de proteína à base de levedura nucleotídica. Os resultados mostraram que os peixes em todos os grupos suplementados apresentaram atividade antioxidante e respostas imunológicas significativamente melhores (ÖZLÜER-HUNT et al., 2016)

A partir destes dados e considerando o presente resultado de nitrito/nitrato bem como o perfil de atividade da mieloperoxidase e da lisozima podemos sugerir que a adição de biomassa da levedura *Y. lipolytica* apresenta um excelente potencial como imunoestimulante nas concentrações mais baixas utilizadas de 3 e 5%.

## 5. CONCLUSÕES

A adição de biomassa da levedura *Y. lipolytica* influenciou no crescimento, levando a um incremento do ganho de peso, comprimento padrão e comprimento total na concentração 7% de adição de levedura.

Em relação aos parâmetros hematológicos o hematócrito esteve acima da média para a espécie em todos os grupos e o CHCM esteve abaixo da média para a espécie em todos os grupos, situação que pode ser indicativo de estresse. Porém não houve diferença entre os tratamentos e o controle, demonstrando que o uso de biomassa da levedura *Y. lipolytica* como suplemento na alimentação de tilápias é seguro e não afetou a distribuição e circulação de oxigênio.

O uso da levedura promoveu melhora na capacidade de resposta imune inata uma vez que estimulou aumento das células de defesa como neutrófilos e monócitos no sangue dos animais.

Houve aumento de atividade da lisozima e da mieloperoxidase bem como do conteúdo de nitrito/nitrato plasmáticos nos grupos tratados com levedura condizente ao aumento dos níveis de leucócitos na corrente sanguínea.

A adição de biomassa de levedura promoveu aumento de atividade de mieloperoxidase renal sem modificar a atividade de lisozima e o conteúdo de nitrito/nitrato indicando que os alvos de ação imunoestimulatórios principais da levedura estejam na corrente sanguínea.

Considerando as respostas fisiológicas dos sistemas hematológico e imune após a suplementação concluímos que o uso da levedura em concentrações mais baixas como 3 e 5% apresenta efetividade e segurança para aplicação com imunoestimulantes na dieta de tilápias do Nilo.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=n2HuCgAAQBAJ&lpg=PP1&ots=guFK8iAvUa&dq=imunidade%20espec%C3%ADfica&lr&hl=pt-BR&pg=PP1#v=onepage&q=imunidade%20espec%C3%ADfica&f=false>. Acesso em: 19 abr. 2019.
- ABU-ELALA, Nermeen M. et al. Efficacy of dietary yeast cell wall supplementation on the nutrition and immune response of Nile tilapia. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 4, p. 333-341, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687428518300694?via%3Dihub>. Acesso em: 21 ago. 2020.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of fish diseases**, v. 26, n. 9, p. 499-509, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez372.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>. Acesso em: 25 nov. 2020.
- ALAMILLO, E. et al. Marine yeast *Yarrowia lipolytica* improves the immune responses in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes. **Fish Shellfish Immunology**, v. 70, p.48-56, nov. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28863888>. Acesso em: 16 nov. 2018.
- ALTIERI, M. **Agroecologia: a dinâmica produtiva da agricultura**. 4 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004. Disponível em: <https://www.socla.co/wp-content/uploads/2014/Agroecologia-Altieri-Portugues.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2018.
- AMIN, Mohamad; JUSADI, Dedi; SUKENDA, Enang Harris. Growth performance, non-specific immun and antioxidant response of juvenile tilapia oreochromis sp. Feeding on brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* supplemented diet. **Pak. J. Biotechnol**, v. 12, n. 2, p. 139-148, 2015. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Mohamad\\_Amin4/publication/311226614](https://www.researchgate.net/profile/Mohamad_Amin4/publication/311226614). Acesso em: 11 jun. 2020.
- ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. **Progressive Fish-Culturist**, v.56, p.258-261, 1994. Disponível em: [https://afspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1577/1548-8640\(1994\)056%3C0258:DOPAAS%3E2.3.CO;2](https://afspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1577/1548-8640(1994)056%3C0258:DOPAAS%3E2.3.CO;2). Acesso em: 25 jun. 2020.
- ANDLID, T.; JUÁREZ, R.-V.; GUSTAFSSON, L. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). **Microbial Ecology**, v. 30, n. 3, p. 321-334, 1995. Disponível em: <https://link-springer-com.ez372.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/BF00171938> Acesso em: 16 jun. 2018.
- ANDLID T; VAZQUEZ JR; GUSTAFSSON L. Yeast isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus. **Mol Mar Biol Biotechnology**, p.115–126, jul. 1998. Disponível em:



[https://www.researchgate.net/publication/13656541\\_Yeast\\_isolated\\_from\\_the\\_intestine\\_of\\_rainbow\\_trout\\_adhere\\_to\\_and\\_grow\\_in\\_intestinal\\_mucus/download](https://www.researchgate.net/publication/13656541_Yeast_isolated_from_the_intestine_of_rainbow_trout_adhere_to_and_grow_in_intestinal_mucus/download). Acesso em: 16 jun. 2018.

ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v.69, p. 4-9, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14972011>. Acesso em: 05 mai. 2019.

ASL, Saleh Zahedi; GHASEMI, Asghar; AZIZI, Fereidoun. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. **Clinical biochemistry**, v. 41, n. 16-17, p. 1342-1347, 2008. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez372.periodicos.capes.gov.br/search/advanced?docId=10.1016/j.clinbiochem.2008.08.076>. Acesso em: 07 abr. 2019.

AZEVEDO, T.M.P. et al. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no Vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim Instituto da Pesca**, São Paulo, v.32, p. 41-49, 2006. Disponível em: <https://siaiap32.univali.br/seer/index.php/bjast/article/viewFile/4588/6278>. Acesso em: 06 abr. 2019.

BACCARIN, A. E.; PEZZATO, L. E. Efeito da utilização da levedura desidratada de álcool em dietas para tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 549-556, 2001. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/572>. Acesso em: 16 nov. 2018.

BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.19, p. 219-237, 1997. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00299.x>. Acesso em: 16 nov. 2018.

BECKER, Micheli. **Avaliação in vitro e in vivo do potencial antibacteriano de extratos de plantas no cultivo intensivo de alevinos de tilápia *Oreochromis niloticus* na fase de juvenil**. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, 2018. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/2107>. Acesso em: 18 jan. 2020.

BUTOLO, J.E. Uso de biomassa de levedura em alimentação animal: propriedades, custo relativo a outras formas de nutrientes. In: “Workshop” produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal, 1997, Campinas. **Anais [...]**. Campinas: Ital, 1997. p. 70-89.

CAMPO, L. F. C. **La tilapia roja**: una evolucion de 26 años, de la incertidumbre al exito. México, 2008. 147p. Disponível em: <https://docplayer.es/2860258-Una-evolucion-de-26-anos-de-la-incertidumbre-al-exito.html>. Acesso em: 16 nov. 2018.

CARVALHO, M..**Utilização de levedura íntegra e seus derivados em dietas para juvenis de Tilápia do Nilo**. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.5, p.1173-1179, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n5/a564cr1421.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2018.

CHEN, D., AINSWORTH, A.J. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. **J. Fish Dis.** v. 15, p. 295–304, 1992. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2761.1992.tb00667.x>. Acesso em: 15 abr. 2020.

CHIU, Chiu-Hsia et al. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. **Fish & shellfish immunology**, v. 29, n. 6, p. 1053-1059, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464810002810>. Acesso em: 12 jun. 2020.

CSUTAK, O. et al. Biotechnological Applications of *Yarrowia lipolytica* CMGB32. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 6, p.545-553, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.083>. Acesso em: 16 nov. 2018.

DAS, Anushree et al. Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquifaciens* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 35, n. 5, p. 1547-1553, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464813007249>. Acesso em: 24 jan. 2020.

DELBON, M.C.; PAIVA, M.J.T.R. Eugenol em juvenis de tilápia-do-nilo: concentrações e administrações sucessivas. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.38, p.43-52, 2012. Disponível em: <https://www.pesca.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/article/view/941/922>. Acesso em: 17 ago. 2020.

DOMÍNGUEZ, A. et al. Biodegradation and utilization of waste cooking oil by *Yarrowia lipolytica* CECT 1240. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, p. 1200–1208, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ejlt.201000049>. Acesso em: 17 nov. 2018.

EL estado mundial de la pesca y la acuicultura. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Roma, 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i9540es/l9540ES.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2020.

ELLIS, Anthony E. Lysozyme assays. **Techniques in fish immunology**, v. 1, p. 101-103, 1990. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Willem\\_B\\_Van\\_Muiswinkel/post/What\\_is\\_the\\_best\\_protocol\\_for\\_a\\_lysozyme\\_activity\\_assay\\_and\\_a\\_phagocyte\\_activity\\_in\\_whole\\_fish\\_larvae/attachment/5a0acc094cde26268914eab6/AS:560550381711360@1510657033694/download/1990\\_Ellis\\_Lysozyme\\_Ch+12.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Willem_B_Van_Muiswinkel/post/What_is_the_best_protocol_for_a_lysozyme_activity_assay_and_a_phagocyte_activity_in_whole_fish_larvae/attachment/5a0acc094cde26268914eab6/AS:560550381711360@1510657033694/download/1990_Ellis_Lysozyme_Ch+12.pdf). Acesso em: 06 dez. 2018.

EL-SAYED, A. F. **Tilapia Culture**. Egito: Alexandria University, 2006. Disponível: [https://www.researchgate.net/publication/287293649\\_Tilapia\\_Culture/link/5692200208aee91f69a606af/download](https://www.researchgate.net/publication/287293649_Tilapia_Culture/link/5692200208aee91f69a606af/download). Acesso em 16 nov. 2018.

ENVIRONMENTAL Molecular Sciences Laboratory. Facebook. 2014. Disponível em: <https://www.facebook.com/emsl.pnl.gov/photos/yarrowia-lipolytica-an-oil-producing-yeast-imaged-with-a-helium-ion-microscope-10153960798565133/>. Acesso em: 08 jul. 2020.

FLAJNIK, M.F.; DU PASQUIER, L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line?. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 640-644, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1471490604002972>. Acesso em: 21 jan. 2020.

FURUYA, W.M et al. Níveis de levedura desidratada spray dried na dieta de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência Rural**, v. 30, p. 699-704, 2000. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2019.

GOLDENFARB, P.B. et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v.56, n.1, p.35-39, 1971. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5556212>. Acesso em: 06 dez. 2018.

GONÇALVES, Ligia Uribe; CARVALHO, Márcia de; VIEGAS, Elisabete Maria Macedo. Utilização de levedura íntegra e seus derivados em dietas para juvenis de tilápia do Nilo. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1173-1179, 2010. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782010000500027&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782010000500027&script=sci_arttext). Acesso em: 19 ago. 2020.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, Cambridge, v. 126, n. 1, p. 131-138, out. 1982. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/16018198\\_Analysis\\_of\\_nitrate\\_nitrite\\_and\\_15N\\_nitrate\\_in\\_biological\\_fluids](https://www.researchgate.net/publication/16018198_Analysis_of_nitrate_nitrite_and_15N_nitrate_in_biological_fluids). Acesso em: 08 dez. 2018.

HARIKRISHNAN, Ramasamy et al. Probiotics and herbal mixtures enhance the growth, blood constituents, and nonspecific immune response in *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus parauberis*. **Fish & shellfish immunology**, v. 31, n. 2, p. 310-317, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050464811002038?via%3DiHub>. Acesso em: 21 dez. 2019.

HASSAAN, M. S., Soltan, M. A., & Ghonemy, M. M. R. (2014). Effect of synbiotics between *Bacillus licheniformis* and yeast extract on growth, hematological and biochemical indices of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, 40(2), 199–208. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687428514000284?via%3DiHub>. Acesso em: 20 ago. 2020.

HEMING, T. A. Clinical studies of fish blood: importance of sample collection and measurement techniques. **American journal of veterinary research**, v. 50, n. 1, p. 93-97, 1989. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/2919834>. Acesso em: 20 ago. 2020.

HISANO, Hamilton et al. Levedura íntegra e derivados do seu processamento em rações para tilápia do Nilo: aspectos hematológicos e histológicos. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 311-318, 2006. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/161>. Acesso em: 17 ago. 2020.

ISHIKAWA, Márcia Mayumi et al. Heparina e Na<sub>2</sub> EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): eficácia e alterações hematológicas. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 7, p. 1557-1561, jul. 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782010000700012&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782010000700012&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 07 abr. 2019.

IWASHITA, M. K. P. 197p **Probióticos na alimentação de tilápias do Nilo: desempenho produtivo, hematologia, e Imunologia**. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012. Disponível em: [https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100166/iwashita\\_mkp\\_dr\\_jabo.pdf?sequence=1](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100166/iwashita_mkp_dr_jabo.pdf?sequence=1). Acesso em: 16 nov. 2018.

KESARCODI-WATSON, A. et. al. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, p. 1-14, 2008. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez372.periodicos.capes.gov.br/search/advanced?docId=10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>. Acesso em: 06 abr. 2019.

KIMPARA, J. M. A aquicultura no Brasil hoje e o papel do pesquisador. **Página Rural**, 2012. Disponível em: <http://www.paginarural.com.br/artigo/2330/a-aquicultura-no-brasil-e-o-pesquisador>. Acesso em: 16 nov. 2018.

KITAGAWA, R.R. et al. Effect of the Isocoumarin Paepalantine on the Luminol and Lucigenin Amplified Chemiluminescence of Rat Neutrophils. **Biol Pharm Bull**, v. 26, n. 6, p. 905-908, 2003. Disponível em: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/26/6/26\\_6\\_905/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/26/6/26_6_905/article). Acesso em: 19 abr. 2019.

LABARRERE, C.R. et al . Eritrograma de híbridos de surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *P. coruscans*) mantidos em diferentes densidades de estocagem. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 64, n. 2, p. 510-514, Apr. 2012 . Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352012000200037&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352012000200037&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 19 ago. 2020.

LEDESMA-AMARO, R.; NICAUD, J.-M. *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 61, p. 40–50, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26703186>. Acesso em: 16 nov. 2018.

LI, Peng; GATLIN III, DELBERT M. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). **Aquaculture**, v. 219, p. 681-692, 2003. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez372.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0044848602006531?via%3Dihub>. Acesso em: 09 nov. 2019.

LIBBY, Peter; THEROUX, Pierre. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, v. 111, n. 25, p. 3481-3488, 2005. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/circulationaha.105.537878>. Acesso em: 19 ago. 2019.

LIE, O. et al. Study on lysozyme activity in some fish species. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 6, n. 1, p. 1-5, 1989. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/250220634Studyonlysozymeactivityinsomefishspecies>. Acesso em: 10 jun. 2020.

LIZ, Rafael et al. Protected effect of *Esenbeckia leiocarpa* upon the inflammatory response induced by carrageenan in a murine air pouch model. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 12, p. 1991-1999, 2011. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez372.periodicos.capes.gov.br/search/advanced?docId=10.1016/j.intimp.2011.08.009>. Acesso em: 18 abr. 2019.

LOPES, M. et al. **The use of olive mill wastewater by wild type *Yarrowia lipolytica* strains: medium supplementation and surfactant presence effect**. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, p. 533-537, 2008. Disponível em: [https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/9484/1/Lopes\\_JCTB.pdf](https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/9484/1/Lopes_JCTB.pdf). Acesso em: 16 nov. 2018.

MEDEIROS, Francisco (Coord.). **Anuário Peixe BR da Piscicultura 2018**. São Paulo: Associação Brasileira de Piscicultura - ABP, 2018. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/Anuario2018/AnuarioPeixeBR2018.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2018.

MESEGUER, J.; LOPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M. A. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. **Cell and Tissue Research**, v. 277, n. 1, p. 1-10, 1994. Disponível em: <https://link-springer-com.ez372.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/BF00303074>. Acesso em: 26 jun. 2020.

MEURER, Fábio et al. Utilização de levedura spray dried na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 479-484, 2000. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Fabio-Meurer/publication/277029830\\_Utilizacao\\_de\\_levedura\\_spray\\_dried\\_na\\_alimentacao\\_de\\_alevinos\\_de\\_tilapia\\_do\\_Nilo\\_Oreochromis\\_niloticus\\_L/links/57595c6b08aec91374a358a1/Utilizacao-de-levedura-spray-dried-na-alimentacao-de-alevinos-de-tilapia-do-Nilo-Oreochromis-niloticus-L.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Fabio-Meurer/publication/277029830_Utilizacao_de_levedura_spray_dried_na_alimentacao_de_alevinos_de_tilapia_do_Nilo_Oreochromis_niloticus_L/links/57595c6b08aec91374a358a1/Utilizacao-de-levedura-spray-dried-na-alimentacao-de-alevinos-de-tilapia-do-Nilo-Oreochromis-niloticus-L.pdf). Acesso em: 06 jan. 2019.

MFRURAL. **O Agronegócio passa por aqui**. Disponível em: <https://www.mfrural.com.br/detalhe/262564/peixe-tilapia>. Acesso em: 08 jul. 2020.

MIRANDA, K. M., ESPEY, M. G., WINK, D. A. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. **Nitric oxide: biology and Chemistry**, v. 5, n.1, p. 62-71, fev. 2001. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1089860300903197>. Acesso em: 07 dez. 2018.

MOSHAGE, H.; KOK, B.; HUIZENGA, J.R.; JASEN, P.L. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Clinical Chemistry**, v. 41, p. 892-896, 1995. Disponível em: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/clinchem/41/6/892.full.pdf>. Acesso em: 07 abr. 2019.

NAKANDAKARE, Ivan Bernardoni et al. Incorporação de probióticos na dieta para juvenis de tilapias-do-Nilo: parâmetros hematológicos, imunológicos e microbiológicos. **Boletim do Instituto De Pesca**, p. 121-135, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/76641>. Acesso em: 06 abr. 2019.

NICAUD, J.-M. 2012. *Yarrowia lipolytica*. **Yeast**, v. 29, n.10, p. 409- 418. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/yea.2921>. Acesso em: 02 nov. 2019.

ÖZLÜER-HUNT, Arzu et al. Effects of dietary nucleotide yeast on immune responses and antioxidant enzyme activities of rainbow trout juveniles (*Oncorhynchus mykiss*). **The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, 2016. Disponível em: <https://evols.library.manoa.hawaii.edu/handle/10524/54940>. Acesso em: 20 ago. 2020.

PACHECO, M.T.B. Levedura como fonte de proteína: extração, isolamento propriedades nutritivas e funcionais. In: "Workshop" produção de biomassa de levedura: utilização em alimentação humana e animal, 1997, Campinas. **Anais [...]** Campinas: Ital, 1997. p. 5-14. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S105046480290416X>. Acesso em: 02 nov. 2019.

PAULSEN, S.M et al. In vivo effects of b-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.14, p. 39-54, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S105046480290416X>. Acesso em: 02 nov. 2019.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá: Eduem, 2008. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/44398889\\_Doencas\\_de\\_peixes\\_profilaxia\\_diagnostico\\_e\\_tratamento\\_Gilberto\\_Cezar\\_Pavanelli](https://www.researchgate.net/publication/44398889_Doencas_de_peixes_profilaxia_diagnostico_e_tratamento_Gilberto_Cezar_Pavanelli). Acesso em: 07 dez. 2018.

RANZANI-PAIVA, M., J., T. et al. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Maringá: Eduem, 2013.

RAVEN P.H. et al. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RIBEIRO, Paula Adriane Perez et al. **Manejo nutricional e alimentar de peixes de água doce**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2012. Disponível em: <https://vet.ufmg.br/ARQUIVOS/EDITORIA/20131002140549.pdf>. Acesso em 19 abr. 2019.

ROCHA, C. M. C. da et al. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 48, n. 8, p. iv-vi, aug, 2013. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2013000800003&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2013000800003&lng=en&nrm=iso). Acesso em 15 nov. 2018.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**, v. 20, p. 315-328, dez. 1947. Disponível em: <https://bibliotecadigital.butantan.gov.br/arquivos/95/PDF/18.pdf>, acesso em: 07 dez. 2018.

SANTOS et al., Detecção de lipase por cepa de *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*. In: CONICBIO / CONBIO / SIMCBIO, . 2013, Recife - PE. Resumos Expandidos. Recife, v. 2, p. 1 – 11, 2013.

SILVA, A. S. E.; LIMA, T. A. X.; BLANCO, B. S. Hematologia em peixes. **Revista Centauro**, v. 3, n. 1, p. 24-32, 2012. Disponível em: [http://crmvrn.gov.br/documents/revista/vol3/hematologia\\_em\\_peixes.pdf](http://crmvrn.gov.br/documents/revista/vol3/hematologia_em_peixes.pdf). Acesso em 08 jun. 2020.

SOARES, C.M. et al. Substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do farelo de canola em dietas para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.4, p.1172-1177, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbz/v30n4/6021.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2018.

SOUZA, V J. Inserção de diferentes níveis de levedura *yarrowia lipolytica* na nutrição de juvenis de tilapia do nilo (*Oreochromis niloticus*) (Linnaeus 1758). 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Aquicultura) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2018.

STEIN, Hans H.; KIL, Dong Y. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 2. **Animal biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 217-231, 2006. Disponível em: <http://web-a-ebisohost.ez372.periodicos.capes.gov.br/ehost/detail/detail?vid=0&sid=ce0189cf-a93c-4255-9dad-f61693b4f1a4%40sdc-v-sessmgr03&bdata=JmxhbmMc9cHQYnImc2I0ZT1laG9zdC1saXZI#AN=17127532&db=mdc>. Acesso em: 25 nov. 2018.

TAVARES-DIAS, M et al. Características hematológicas de teleósteos brasileiros: IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 693-698, ago. 2002. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782002000400024&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782002000400024&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 07 abr. 2019.

TAVARES-DIAS, M. et al. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. In: NETO, A. S.; MARIANO, W. S.; SÓRIA, S. F. P. (Orgs). **Tópicos especiais em saúde e produção animal**. São Carlos: Pedro e João Editores, 2009, p. 43-80. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/512632>. Acesso em: 07 abr. 2019.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: El autor, 2004.

THE State of World Fisheries and Aquaculture. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Rome, 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2018.

TORT, L.; BALASCH, J.C.; MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Inmunología**, v. 22, p. 277-286, 2003. Disponível em: <https://www.inmunologia.org/Upload/Articles/6/0/602.pdf>. Acesso em: 07 abr. 2019.

TOYAMA, G. N. et al. Suplementação de vitamina c em rações para reversão sexual da tilápia do Nilo. **Scientia Agricola**, v. 66, p. 221-228, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/sa/v57n2/v57n2a05.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2018.

VILLAMIL, L. et al. Evaluation of Immunomodulatory Effects of Lactic Acid Bacteria in Turbot (*Scophthalmus maximus*). **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, p.1318–1323, nov. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC130128>. Acesso em: 06 dez. 2018.

WANG, Jiying et al. Effect of a dairy-yeast probiotic (G roBiotic®-A) on growth performance, body composition, antioxidant capacity and immune functions of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). **Aquaculture research**, v. 47, n. 2, p. 398-408, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/are.12501>. Acesso em: 12 jun. 2020.

ZANATTA, A.S.; CARVALHO, E. Pisciculturas em tanques - rede nos grandes reservatórios: Visões polarizadas. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, Aquidabã, v. 3, n. 2, p.125-129, 2012. Disponível em: <http://sustenere.co/journals/index.php/rica/article/view/ESS2179-6858.2012.002.0008/225>. Acesso em: 24 nov. 2018.

ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. In: EURICO, M. et al. (Eds.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**, São Paulo: TecArt, 2004. p. 239-266.



