



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
Aspergillus niger E COLINA VEGETAL
EM DIETAS PARA TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) EM SISTEMAS
FECHADOS DE PRODUÇÃO

ALISON ALVES DE SOUSA

CHAPECÓ, 2019

ALISON ALVES DE SOUSA

***Aspergillus niger* E COLINA VEGETAL EM DIETAS PARA TILÁPIA
DO NILO (*Oreochromis niloticus*) EM SISTEMAS FECHADOS DE
PRODUÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado
do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,
Área de Concentração Ciência e Produção
Animal, da Universidade do Estado de Santa
Catarina (UDESC), como requisito parcial
para obtenção de grau de **Mestre em
Zootecnia**

Orientador: Dr. Maurício Gustavo Coelho Emerenciano
Co-orientador: Dr. Diogo Luiz de Alcantara Lopes

Chapecó, SC, Brasil

2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Sousa, Alison

Aspergillus niger E COLINA VEGETAL EM DIETAS PARA
TILAPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) EM SISTEMAS
FECHADOS DE PRODUÇÃO / Alison Sousa. -- 2019.

80 p.

Orientador: Maurício Emerenciano

Coorientador: Diogo Lopes

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2019.

1. Nutrição. 2. bioflocos. 3. sistema de recirculação. 4.
ingrediente alternativo. 5. aditivo. I. Emerenciano, Maurício. II.
Lopes, Diogo. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro
de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia. IV. Título.

**Universidade do Estado de Santa Catarina
UDESC Oeste
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

***Aspergillus niger* E COLINA VEGETAL EM DIETAS PARA TILÁPIA
DO NILO (*Oreochromis niloticus*) EM SISTEMAS FECHADOS DE
PRODUÇÃO**

Elaborada por
Alison Alves de Sousa

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

Comissão Examinadora:

Dr. Diogo Luiz de Alcantara Lopes (UDESC/CEO)

Drª. Daniela Zanini
Drª. Daniela Zanini (UFFS)

Drª. Cintia Labussière Nakayama
Drª. Cintia Labussière Nakayama (UFMG)

Chapéco, 30 de Julho de 2019.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, por tudo que fizeram por mim ao longo desses anos, por toda confiança e pelos bons valores. Depois de um longo período, estou voltando!!

Ao meu orientador desde a graduação Dr. Maurício Emerenciano. Agradeço por me apoiar nas minhas decisões, pela confiança e por toda ajuda nesses dois anos.

Ao meu co-orientador Dr. Diogo Alcantara por todo apoio aqui em Chapecó e por me dar carta branca para trabalhar. Sou grato por isso.

Aos colegas de laboratório (LAQ- LANOA e LAQUA-Oeste)

Aos professores do PPGZOO, em especial ao Dr. Aleksandro S. Da Silva, por todo apoio.

Aos amigos de Laguna e aos amigos que fiz em Chapecó.

Enfim, a todos que de certa forma contribuíram para que o mestrado e os demais projetos pudessem ser realizados.

Muito obrigado!!

“Tenha como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá”.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

***Aspergillus niger* E COLINA VEGETAL EM DIETAS PARA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) EM SISTEMAS FECHADOS DE PRODUÇÃO**

AUTOR: Alison Alves de Sousa
ORIENTADOR(A): Maurício Gustavo Coelho Emerenciano
Chapéco, 30 de Julho de 2019

Os experimentos tiveram como objetivo avaliar diferentes níveis de inclusão de biomassa seca de *Aspergillus niger* e colina vegetal em dietas para tilápia do Nilo (*O. niloticus*) em sistema de recirculação de água e sistema de bioflocos, respectivamente. O experimento 1 avaliou diferentes níveis de biomassa seca de *Aspergillus niger* (micélio) (0, 2, 4 e 8%) em rações para alevinos de tilápia do Nilo (peso médio de $1,72 \pm 0,16$ g). O experimento teve uma duração de 42 dias e foi avaliado o desempenho zootécnico, índices organo-somáticos e composição de carcaça. A utilização de biomassa seca de *A. niger* pode trazer benefícios ao organismo que está sendo cultivado. Portanto, recomenda-se um nível de inclusão de 4% de biomassa de *Aspergillus niger* seca. O experimento 2 avaliou inclusão de colina vegetal (0, 400, 800 e 1200 mg/kg de ração) em dietas para tilápia do Nilo em sistema de bioflocos. O experimento teve duração de 40 dias e foi avaliado o desempenho produtivo, metabolismo energético e ação antioxidante sérico e tecidual. Conclui-se que em sistema de bioflocos a colina vegetal não contribuiu para melhoria no desempenho zootécnico das tilapias, apesar de ter estimulado o metabolismo energético (importante na regulação de homeostase celular), assim como teve efeito de ativação da enzima GST hepática e consequentemente menor peroxidação lipídica. Visto que a busca por ingredientes alternativos e aditivos em dietas para organismos aquáticos é de extrema importância para a aquicultura, ambos os experimentos demonstraram resultados promissores e que podem contribuir para a nutrição de tilapias em sistemas fechados.

Palavras-chave: (nutrição, bioflocos, sistema de recirculação, ingrediente alternativo, aditivo)

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

Aspergillus niger AND VEGETABLE CHOLINE IN DIETS FOR NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) IN CLOSED PRODUCTION SYSTEMS

AUTHOR: Alison Alves de Sousa

ADVISER: Maurício Gustavo Coelho Emerenciano
Chapecó, 30th July 2019

The experiments aimed to evaluate different inclusion levels of *Aspergillus niger* dry biomass and vegetable choline in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in recirculation aquaculture system and biofloc technology system, respectively. The experiment 1 evaluated different levels of *A. niger* dry biomass (called as mycelium) (0, 2, 4 e 8%) in diets for Nile tilapia (mean weight of 1.72 ± 0.16 g). The experiment had a duration of 42 days and the zootechnical parameters, organosomatic indexes and carcass composition were evaluated. The use of dry biomass of *A. niger* can bring benefits to Nile tilapia. Therefore, a level of 4 % *A. niger* dry biomass inclusion is recommended. The experiment 2 evaluated the inclusion of vegetable choline (0, 400, 800 and 1200 mg kg⁻¹ of feed) in diets for Nile tilapia in biofloc system. The experiment lasted 40 days and evaluated the zootechnical performance, energy metabolism and serum and tissue antioxidant action. However, it is concluded that in biofloc system, the vegetable choline did not contribute to zootechnical performance improvement, although it stimulated the energy metabolism (important in the regulation of cellular homeostasis), as well as contributed to activation of the hepatic GST enzyme and consequently lower lipid peroxidation. Since the search for alternative ingredients and additives in diets for aquatic organisms are extremely relevant for aquaculture, both experiments demonstrated promising results and may contribute to tilapia nutrition in enclosed systems.

Keywords: (nutrition, biofloc system, recirculation aquaculture system, alternative ingredient, additive)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção da pesca e aquicultura no mundo.....	12
Figura 2 - Panorama da produção de peixes cultivados no Brasil.....	14
Figura 3 - Tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>).....	15
Figura 4- Sistema de recirculação de água (RAS) na Califórnia (EUA).....	17
Figura 5 – Agregados microbianos (biofloco).....	18
Figura 6 – Sistemas de bioflocos (BFT)	19
Figura 7 – Dietas com inclusão de biomassa seca de <i>A. niger</i> e colina vegetal.....	21

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – 1 REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Revisão bibliográfica da utilização de ingredientes alternativos e aditivos na alimentação de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>).....	21
---	----

CAPÍTULO II - 2 MANUSCRITOS

2.1 MANUSCRITO I

Tabela 1. Níveis de garantia da dieta base de acordo com as informações contidas no rótulo do fabricante (Fonte: BioBase, Águas Frias, SC, Brasil).....	33
Tabela 2. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros de qualidade de água durante o experimento.....	35
Tabela 3. Parâmetros de desempenho zootécnico de tilápias alimentadas com diferentes níveis de biomassa seca de <i>A. niger</i> em extrusadas.....	36
Tabela 4. Índices organo-somáticos de tilápias alimentadas com diferentes níveis de biomassa seca de <i>A. niger</i> em rações extrusadas.....	37
Tabela 5. Composição centesimal de carcaças de tilápias do Nilo alimentadas com diferentes níveis de biomassa seca de <i>A. niger</i> em rações extrusadas e composição da biomassa seca de <i>A. niger</i>	39

2.2 MANUSCRITO II

Table 1 - Percentage and chemical composition of the basal diet used in the experiment...63	
Table 2 - Means (\pm SD) of water quality parameters of Nile tilapia supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.....	64
Table 3 - Zootechnical performance of Nile tilapia supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.....	65
Table 4 - Serum biochemistry of Nile tilapia (n=10 per treatment) supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.....	66
Table 5 - Enzymes involved in energetic metabolism in the gills of Nile tilapia (n=10 per treatment) supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.....	67
Table 6 - Oxidant and antioxidant variables in the liver of Nile tilapia of Nile tilapia (n=10 per treatment) supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.....	68

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I.....	79
ANEXO II.....	80

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	12
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1 INTRODUÇÃO	12
1.1.1 AQUICULTURA NO MUNDO E BRASIL.....	12
1.1.2 CULTIVO DE TILÁPIA NO BRASIL.....	13
1.1.3 SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA (RAS)	15
1.1.4 TECNOLOGIA DE BIOFLOCOS (BFT)	17
1.1.5 NUTRIÇÃO DE PEIXES (INGREDIENTES ALTERNATIVOS E ADITIVOS).....	19
1.1.6 FERRAMENTAS DE ESTUDO EM NUTRIÇÃO DE PEIXES: METABOLISMO ENERGÉTICO E STATUS ANTIOXIDANTE	24
1.2 OBJETIVOS.....	26
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
CAPÍTULO II	27
2 MANUSCRITOS	27
2.1 MANUSCRITO I.....	28
2.2 MANUSCRITO II	43
3 CONSIDERAÇOES FINAIS.....	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO I	79
ANEXO II	80

CAPÍTULO I

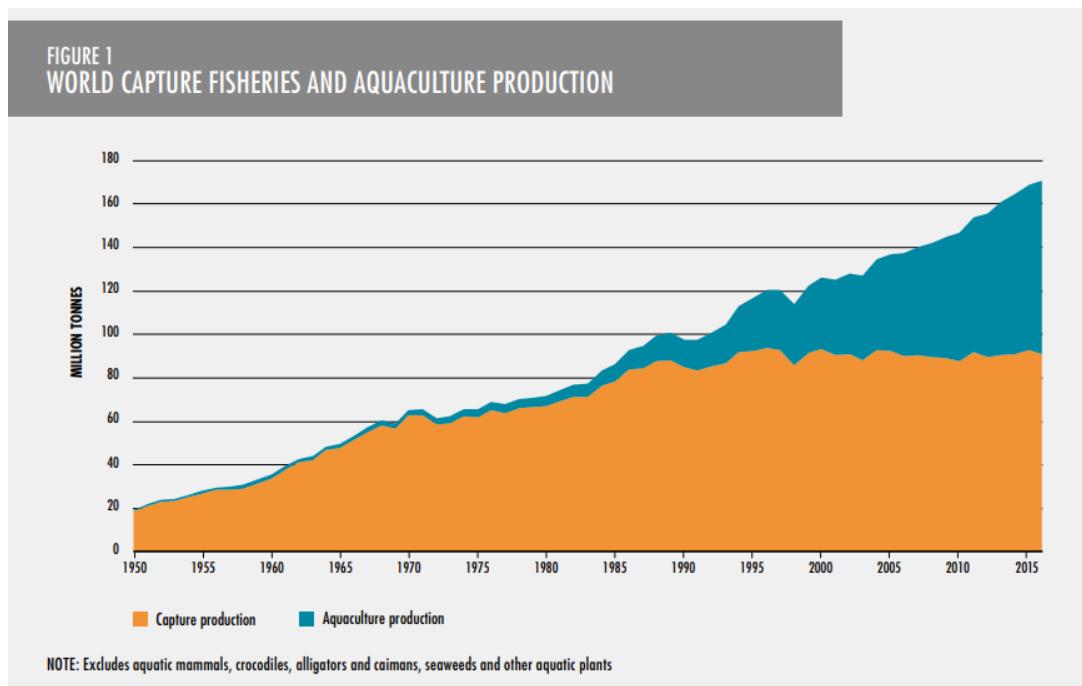
1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 AQUICULTURA NO MUNDO E NO BRASIL

A aquicultura apresentou um crescimento extremamente significativo nos últimos 20 anos e, uma vez que os estoques pesqueiros estão relativamente estagnados, a produção de organismos aquáticos se mostra como a principal atividade a suprir a demanda crescente por proteína de origem aquática em nível mundial (FAO, 2018; Figura 1). No tocante à produção total mundial de 2016, o relatório da FAO 2018 “*O Estado Mundial da Pesca e Aquicultura*” destaca que a produção pesqueira representou 53%, enquanto a produção aquícola representou 47%. Porém, em relação ao fornecimento de pescado para consumo humano a aquicultura contribuiu com 52% e a pesca 48%.

Figura 1 - Produção da pesca e aquicultura no mundo



Fonte: FAO (2018)

Adicionalmente, projeções populacionais de Gerland et al. (2014) estimam que a população humana pode chegar a 12,3 bilhões de pessoas em 2100, além disto, houve um aumento no consumo de pescado no mundo, com estimativas apontando que em 2015 o consumo pode ter superado o valor de 20 kg per capita/ano (FAO, 2016). Diante deste cenário, a expansão da aquicultura é fundamental para continuar a contribuir com a oferta de pescado no mundo (FAO, 2018).

No Brasil, desde 1985 o consumo aparente de pescado é maior que a produção nacional, e este déficit vêm sendo suprido através da importação (SONODA et al., 2015). Com uma extensa linha de costa com mais de 8 mil quilômetros, clima favorável e uma grande dimensão territorial que dispõe de 13% da água doce renovável do planeta, o Brasil apresenta um grande potencial para o crescimento e desenvolvimento da aquicultura (ROCHA et al., 2013). Segundo dados da FAO (2016), em 2014 a aquicultura brasileira alcançou uma produção de 562 mil toneladas, sendo que em 2025 o setor pode registrar um crescimento de 104% onde a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresenta um papel fundamental no progresso da atividade.

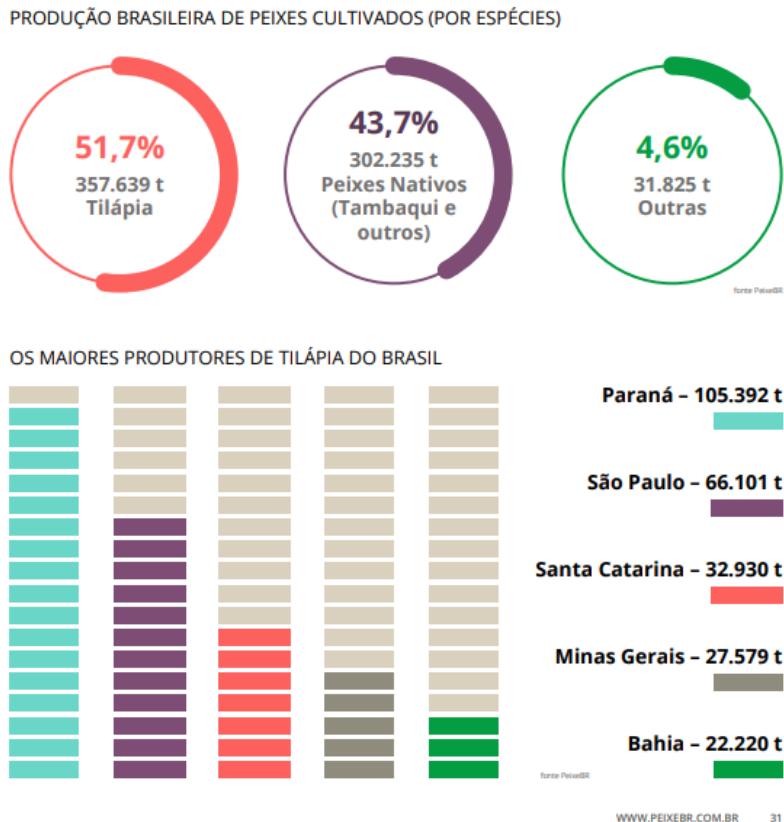
1.1.2 CULTIVO DE TILÁPIA NO BRASIL

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2015) a piscicultura brasileira representou aproximadamente 70% da aquicultura nacional, com uma produção de 483,24 mil toneladas de peixes. De acordo com o “Anuário PeixeBR da Piscicultura 2018”, a produção de tilápia do Nilo representou 51,7 % da produção total de peixes cultivados, destacando-se como a espécie mais produzida no país em 2017 (Figura 2). Outro aspecto importante no panorama da produção é que a tilapicultura vem aumentando constantemente em todas as regiões do Brasil (MPA, 2014).

Tal crescimento é devido ao fato da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) (Figura 3) possuir diversas características positivas que fazem dela uma das espécies mais cultivadas do mundo e a primeira no Brasil. O rápido crescimento, rusticidade e baixo nível trófico são alguns fatores que tornam a espécie propícia para o cultivo (FITZSIMMONS et al., 2011; BEVERIDGE; MCANDREW, 2012). Além disso, aproveita muito bem o alimento artificial, possui um pacote tecnológico de produção bem estabelecido e apresenta bom rendimento de filé e que praticamente não apresenta espinhos, o que facilita a aceitação por

parte das indústrias de beneficiamento de pescado e a posterior comercialização do produto (LOURES et al., 2001; BEVERIDGE; MCANDREW, 2012).

Figura 2 - Panorama da produção de peixes cultivados no Brasil



Fonte: PeixeBR (2018)

O sucesso na produção da espécie está atrelado a excelente combinação dos aspectos fisiológicos supracitados, que são favoráveis a sua adaptação e seu excelente desempenho em diversos sistemas de cultivo (RIBEIRO, 2001). No Brasil, a tilápia do Nilo é comumente produzida em sistema semi-intensivo (viveiros escavados) e sistema intensivo (tanques-rede), onde ambos os sistemas são responsáveis pelo crescimento expressivo da atividade nos últimos anos. (SUSSEL, 2013). Os sistemas tradicionais, sem dúvidas, são de extrema importância para o desenvolvimento da aquicultura nacional e mundial. Em contrapartida, estes mesmos sistemas podem trazer consigo alguns problemas ambientais, principalmente quando projetados e manejados de forma incorreta. Em relação aos viveiros

escavados, o sistema ocupa grandes áreas de terras, onde normalmente as produtividades são baixas e existe a necessidade de um viveiro de decantação bem dimensionado para diminuir o descarte de efluente (ABIMORAD et al., 2009; DE PASSOS et al., 2015;). Paralelamente, as altas densidades empregadas em tanques-rede aumentam consideravelmente os surtos de patógenos, resultando em perdas econômicas aos produtores (SALVADOR et al., 2003; CYRINO et al., 2010).

Figura 3 - Tilápia do Nilo (*O. niloticus*)



Fonte: Alison Alves de Sousa/ Luisa Nora

Diante desta problemática, emerge a necessidade de sistemas fechados de produção como o bioflocos (BFT) e recirculação de água (RAS). Ambos os sistemas podem solucionar ou diminuir os problemas supracitados nos sistemas tradicionais, e diminuir o potencial impacto ambiental da atividade (WILD et al., 2014).

1.1.3 SISTEMA DE RECIRCULAÇÃO DE ÁGUA (RAS)

O sistema de recirculação de água (RAS sigla originada do inglês “*Recirculation Aquaculture System*”) é um sistema de produção fechado que foi desenvolvido para

solucionar problemas relacionados aos sistemas de cultivo tradicionais (MARTINS et al., 2010; ARUETY et al., 2016). Em comparação aos sistemas tradicionais, o *RAS* (Figura 4) é capaz de reduzir a quantidade de água utilizada em aproximadamente 90%, além disso, por ser um sistema fechado, permite o cultivo de espécies marinhas ou de água doce longe da zona costeira o que facilita a comercialização de pescado extremamente fresco em áreas urbanas (MARTINS et al., 2010; BADIOLA et al., 2012).

Esse tipo de sistema tem como objetivo remover o resíduo orgânico (fezes, restos de reação e tecidos) e inorgânico (compostos nitrogenados) presente na água de cultivo (BADIOLA et al., 2012). Em água doce, o sistema é basicamente composto por: (i) filtro mecânico que serve para remover partículas maiores; (ii) filtro biológico com a presença de bactérias nitrificantes cuja principal função é a remoção da amônia do sistema. Estas bactérias realizam a conversão da amônia em nitrito, e a conversão do nitrito em nitrato (GUERDAT et al., 2010) e, por fim, (iii) um tanque que serve como reservatório denominado “*sump*”. Neste tanque, pode ocorrer a adição de oxigênio puro e a remoção de CO₂ do sistema, sendo que, posteriormente, a água retorna para os tanques de engorda (PFEIFFER; WILLS, 2011).

Adicionalmente, o *RAS* proporciona maior controle dos parâmetros de qualidade de água, maior biossegurança, o que pode resultar em bom desempenho produtivo dos animais que estão sendo cultivados (TIMMONS; EBELING, 2007; TAL et al., 2009). Portanto, estudos com esse sistema são de suma importância para o desenvolvimento sustentável da aquicultura. No entanto, alguns pontos do *RAS* devem ser levados em consideração na hora de dimensionar um projeto aquícola, como o alto custo dos equipamentos, mão de obra especializada e alta demanda de energia. Portanto, as espécies cultivadas neste sistema precisam dispor de bom valor de mercado, ou de um nicho de mercado específico que agregue valor no produto (LOSORDO; WESTERMAN, 1994; SCHNEIDER et al., 2006).

Figura 4 - Sistema de recirculação de água (RAS) na Califórnia (EUA)



Fonte: Jason Smith

1.1.4 TECNOLOGIA DE BIOFLOCOS (BFT)

As primeiras pesquisas com a tecnologia de bioflocos (BFT sigla originada do inglês “*Biofloc Technology*”) foram realizadas em meados de 1970, pelo Ifremer – COP (Instituto Francês para a Exploração do Mar, Centro do Oceano Pacífico). O potencial deste sistema de produção despertou interesse de Israel e dos Estados Unidos de 1980 a 1990, onde projetos começaram a serem realizados com cultivo de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) e com camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) (EMERENCIANO et al., 2012).

Com troca mínima de água e constante movimentação e aeração da água de cultivo, a microbiologia do sistema é fomentada através de uma alta relação C:N (carbono:nitrogênio) visando o desenvolvimento de uma série de microorganismos que posteriormente formarão os flocos microbianos (AVNIMELECH, 1999; WASIELESKY et al., 2006). Estes microrganismos (bioflocos; Figura 5) realizam a ciclagem dos nutrientes que são gerados no sistema através da excreta dos peixes e camarões e sobras de ração, principalmente removendo a amônia do sistema (MAICÁ et al., 2011; EMERENCIANO et al., 2013). Ainda sobre os aspectos positivos do BFT, o sistema apresenta maior

biossegurança, a possibilidade de cultivar em altas densidades e a redução de doenças, uma vez que os flocos microbianos competem com os microrganismos patogênicos (CRAB et al., 2012; BRITO et al., 2015). Adicionalmente, os microrganismos presentes no sistema de cultivo servem como fonte natural de alimento que está disponível o tempo todo e podem servir como fonte suplementar de proteínas, ácidos graxos e outros nutrientes, e consequentemente, diminuindo conversões alimentares e custos com alimentação (AZIM; LITTLE, 2008; EKASARI et al., 2014).

Diante destas vantagens, é de extrema importância que a tecnologia de bioflocos (Figura 6) seja cada vez mais explorada de forma a contribuir para o crescimento da aquicultura, sobretudo, de forma sustentável, uma vez que soluciona diversos problemas comumente encontrados nos sistemas tradicionais. Além disso, novos estudos abordando a temática da nutrição são extremamente importantes, visto que o alimento natural presente no sistema pode abrir possibilidades para adaptações nas dietas dos organismos aquáticos. No entanto, assim como o RAS, os mesmos pontos citados anteriormente também devem ser levados em conta no BFT (HARGREAVES, 2013).

Figura 5 – Agregados microbianos (biofoco)



Fonte: Martinez-Cordoba et al. (2014). Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review

Figura 6 – Sistemas de bioflocos (*BFT*)



Sistema de bioflocos em escala comercial em Bali (A) Malásia (B) e em baixa escala no México (C e D).
Fonte: Emerenciano et al. (2013)

1.1.5 NUTRIÇÃO DE PEIXES (INGREDIENTES ALTERNATIVOS E ADITIVOS)

A elaboração de dietas para organismos aquáticos necessita de um excelente equilíbrio entre os ingredientes, além de um correto balanço de aminoácidos e ácidos graxos. Isto porque uma dieta bem balanceada facilita a síntese dos macronutrientes por parte dos peixes, e consequentemente, maximiza o desempenho produtivo, melhorando os parâmetros imunológicos, crescimento, reprodução e sobrevivência. (LI et al., 2009; TURCHINI et al., 2018).

Atualmente, os estudos em nutrição de organismos aquáticos estão focados na substituição total ou parcial da farinha de peixe por ingredientes proteicos de origem vegetal visando diminuir os custos de produção, porém, alguns pontos negativos dificultam a substituição como baixa digestibilidade, fatores antinutricionais e uma composição nutricional inferior das proteínas de origem vegetal quando comparadas a farinha de peixe (FRANCIS et al., 2001; GATLIN et al., 2007). Este ingrediente apresenta um perfil de aminoácidos bem equilibrado, fosfolipídeos, excelente perfil de ácidos graxos, fácil digestibilidade e absorção, além de melhorar a palatabilidade das rações (LIU et al., 2012; HAN et al., 2016), portanto, em dietas para organismos aquáticos é considerada um

ingrediente extremamente nobre. Atrelado a isto, a utilização dos ingredientes tradicionais em todos os ramos da produção animal pode diminuir a disponibilidade e consequentemente aumentar o valor de mercado dos insumos (EL-SAYED, 1999). Diante disto, a utilização de ingredientes alternativos que apresentam uma composição semelhante ou melhor que os ingredientes tradicionais, bem como o uso de aditivos e suplementos em dietas para organismos aquáticos é extremamente importante para o crescimento da aquicultura (SANTOS et al., 2009; HAI, 2016; EL-SAYED et., 2017). Neste contexto, alguns ingredientes alternativos e aditivos (Tabela 1) poderiam ser utilizados na alimentação de tilápia do Nilo, visando redução de custos com alimentação, melhora no desempenho zootécnico, saúde, reprodução e digestibilidade (TURCHINI et al., 2018).

Um ingrediente alternativo que poderia ser utilizado é a biomassa seca de *Aspergillus niger*, fungo filamentoso muito utilizado pela indústria para o processamento de ácido cítrico (CHEN; NILSEN, 2016; WANG et al., 2016). Ainda no contexto da utilização desta espécie de fungo por parte da indústria, o descarte correto desta biomassa (denominada micélio) surge como uma problemática e que poderia ser solucionada com a inclusão deste ingrediente em dietas aquáticas (Figura 7). Em um trabalho preliminar recente, Durigon et al. (2018) avaliando a inclusão de biomassa seca de *A. niger* em dietas para tilápia do Nilo, observaram uma melhora no desempenho produtivo com nível de inclusão 4% em tilápias com peso médio de aproximadamente 25 g. Portanto, novos estudos são importantes para saber o real potencial deste ingrediente no desempenho de tilápia do Nilo em diferentes fases de crescimento.

Adicionalmente, a colina vegetal surge como um aditivo alternativo que também poderia ser incluído em dietas para tilápia do Nilo (Figura 7). A colina é uma vitamina do complexo B e é normalmente incluída em dietas animais na forma de cloreto de colina (DEVLIN, 2000), no entanto, esta forma apresenta algumas desvantagens, como alta capacidade de absorver água, o que acarreta na aceleração do processo de oxidação de outras vitaminas na dieta (ZEISEL et al., 1989). Por outro lado, estudos demonstram efeitos positivos da utilização de colina na forma de colina vegetal no crescimento de coelhos (ZHANG; LI, 2010), frangos de corte (FILHO et al., 2015). Em peixes, Baldissara et al. (2019) utilizado colina na forma de colina vegetal em dietas para tilápia do Nilo, observaram uma melhora significativa nos parâmetros de desempenho zootécnico, um

efeito protetor no fígado e melhora do metabolismo energético deste órgão. O presente estudo aborda a temática da utilização de colina vegetal em dietas para tilápia do Nilo em sistemas de bioflocos, e se os resultados obtidos diante da inclusão deste aditivo poderiam ser influenciados pelo *BFT*.

Figura 7 – Dietas com inclusão de biomassa seca de *A. niger* e colina vegetal.



Dieta extrusada com inclusão de biomassa seca de *A. niger* (A) Dieta peletizada com inclusão de colina vegetal (B). Fonte: Alison Alves de Sousa

Tabela 1 - Revisão bibliográfica da utilização de ingredientes alternativos e aditivos na alimentação de tilápia do Nilo (*O. niloticus*).

Ingredientes Alternativos			
Títulos dos trabalhos	Ingredientes alternativos	Principais resultados	Referências
Pizzeria by product: A complementary feed source for Nile tilapia (<i>O. niloticus</i>) raised in biofloc technology	Resíduo de pizzeria	É possível incluir até 20% de resíduo de pizzaria em dietas para tilápia do Nilo em sistema de bioflocos sem perdas no desempenho produtivo. E até 40% como estratégia econômica.	SOUSA et al. (2019)

Farinha de inseto em dietas de juvenis de tilápia	Farinha de barata cinéria	Foram avaliados níveis de inclusão de 0; 5; 10; 15 e 20% em dietas para juvenis de tilápia do Nilo. De acordo com os resultados, a farinha de inseto pode ser empregada como ingrediente proteico alternativo, pois não causou prejuízo no desempenho dos juvenis de tilápia do Nilo.	FRECCIA et al. (2016)
Utilização de levedura “spray dried” na alimentação de juvenis de tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>).	Levedura “spray dried”	Um nível de 6% de levedura na ração proporcionou melhor desempenho em alevinos de tilápia do Nilo.	MEURER et al. (2000)
Farelo de resíduo de manga para tilápia do Nilo	Farelo de resíduo de manga	Não foram observados efeitos dos tratamentos sobre as variáveis analisadas no desempenho, o que possibilita a inclusão de até 15% do farelo de resíduo de manga nas rações de tilápia do Nilo.	LIMA et al. (2011)
Growth performance, feed utilization and body composition of advanced nursing Nile tilapia (<i>O. niloticus</i>) fed diets containing Black Soldier Fly (<i>Hermetia illucens</i>) larvae meal	Farinha de larvas de mosca soldado negra	Foram avaliados níveis de inclusão de 0; 30; 50 e 80 g/kg. Não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação aos parâmetros zootécnicos.	DEVIC et al. (2017)
Dry whey meal as a protein source in practical diets for Nile tilapia (<i>O. niloticus</i>) fingerlings	Farinha de soro de leite seco	A farinha de peixe foi substituída em 0; 25; 75 e 100% pela farinha de soro de leite. Não houve diferença estatística entre os tratamentos em relação aos parâmetros de desempenho. Porém, aumentou o conteúdo lipídico na carcaça com 100% de substituição. Conclui-se que o nível ideal de substituição é de 62,5%.	ABDEL-TAWWAB; ABBASS (2016)
Níveis de farelo de coco em rações para alevinos de tilápia do Nilo	Farelo de coco	Recomenda-se um nível 15% de inclusão de farelo de coco em rações para tilápia, visando melhor desempenho e viabilidade econômica.	SANTOS et al. (2009)

Inclusão de <i>Aspergillus niger</i> em rações comerciais extrusadas para juvenis de tilápias do Nilo (<i>O. niloticus</i>)	Biomassa seca de <i>Aspergillus niger</i>	Um nível de 4% de biomassa de <i>A. niger</i> em dietas para tilápia do Nilo proporcionou melhor desempenho produtivo.	DURIGON et al. (2018)
Aditivos			
Títulos dos trabalhos	Aditivos	Principais resultados	Referências
Vegetable choline improves growth performance, energetic metabolism, and antioxidant capacity of fingerling Nile tilapia (<i>O. niloticus</i>)	Colina vegetal	Houve uma melhora significativa no metabolismo do fígado, além de reduzir as reações de radicais live neste órgão. A dose de 800 mg/kg ração melhora o desempenho produtivo.	BALDISSERA et al. (2019)
Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease of Nile tilapia, <i>O. niloticus</i>	Acidificantes	A suplementação dietética com uma combinação de ácido fórmico, ácido propiônico e propianato de cálcio melhora o desempenho produtivo, parâmetros hematológicos e a composição corporal da tilápia do Nilo.	REDA et al. (2016)
The effect of β-1,3-glucan derived from <i>Euglena gracilis</i> (Algamune™) on the innate immunological responses of Nile tilapia (<i>O. niloticus</i>)	β-1,3-glucan (Algamune™)	Foram avaliadas concentrações de 0; 10; 200; 400 e 800 mg/kg de ração. Os peixes alimentados com doses intermediárias apresentaram maior sobrevivência e resposta imunológica frente a um desafio com <i>Streptococcus iniae</i> .	YAMAMOTO et al. (2018)
Improvement of immunity and disease resistance in the Nile tilapia, <i>O. niloticus</i> , by dietary supplementation with <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	A suplementação de <i>B. amyloliquefaciens</i> melhorou significativamente as respostas imunológicas, aumentou a expressão de genes imunológicos.	SELIM et al. (2015)

Effect of <i>Silybum marianum</i> seeds as a feed additive on growth performance, serum biochemical indices, antioxidant status, and gene expression of Nile tilapia, <i>O. niloticus</i> fingerlings	Sementes de cardo-mariano (<i>Silybum marianum</i>)	Os níveis de inclusão avaliados foram de 0; 2,5; 5; 7,5; 10 g/kg ração para tilápia do Nilo. Os melhores níveis deste aditivo foram 7,5 e 10 g/kg de ração para promover crescimento, melhorar respostas imunes, atividade antioxidante e expressão gênica.	HASSAAN et al. (2019)
Óleos essenciais na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo	Óleos essenciais	Os níveis (0,000; 0,005; 0,010; 0,015 e 0,020 %) do aditivo utilizado no estudo não forneceram evidências do efeito positivo dos óleos essenciais sobre o desempenho de alevinos de tilápia do Nilo, principalmente como promotor de crescimento.	CAMPAGNOLO et al. (2013)

1.1.6 FERRAMENTAS DE ESTUDO EM NUTRIÇÃO DE PEIXES: METABOLISMO ENERGÉTICO E STATUS ANTIOXIDANTE

Em relação ao metabolismo energético celular, através do catabolismo a molécula de glicose é oxidada (glicólise) gerando moléculas de adenosina trifosfato (ATP), sendo esta a principal molécula responsável pela geração de energia para organismo. Desta forma, esta molécula é fundamental na liberação e captação de energia, além de permitir um bom funcionamento e melhorar a eficiência celular diante dos processos metabólicos (JIANG et al., 2018). Para que isso ocorra, diversas enzimas estão diretamente ligadas a este processo, dentre elas pode-se destacar a creatina quinase (CK), piruvato quinase (PK) e adenilato quinase (AK), enzimas importantes também na rede de fosfotransferência (DE FRANCESCHI et al., 2013). Estas enzimas são fundamentais para a homeostase bioenergética das células, e o equilíbrio delas é extremamente importante para um bom funcionamento celular. Por outro lado, o desequilíbrio destas enzimas pode resultar em uma redução da resposta metabólica (BADISSERA et al., 2017).

Outro fator importante que vem sendo constantemente estudado é o status antioxidant (BALDISSERA et al., 2019). Durante a produção de energia, são geradas inúmeras espécies reativas de oxigênio que podem ser mensuradas pela dosagem das

mesmas ou correlacionadas com os níveis de peroxidação lipídica através da dosagem de TBARS e pelas espécies reativas de oxigênio (ROS). Por exemplo, quando há uma elevada demanda de energia acarretada por um fator estressor ocorre uma produção de radicais livres em excesso, e isso é prejudicial para o organismo (NELSON; COX, 2008). Para neutralizar estes radicais há um sistema antioxidante, que proporciona a liberação de substâncias/enzimas capazes de neutralizar ou diminuir o processo de oxidação (HALLIWEL; WHITEMAN, 2004).

Dentre estas enzimas, podem ser destacadas a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa-S-transferase (GST), sendo que essas enzimas são constantemente utilizadas como marcadores oxidativos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A SOD tem como principal função converter radicais superóxido em peróxido de hidrogênio; a CAT é encontrada em tecidos biológicos e tem a função de decompor o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (BINELLI; COGNI, 2010; GOYAL; BASAK, 2010). A GST é uma das enzimas antioxidantes mais importantes do fígado, e a sua principal função é o sequestro de radicais livres. Além disso, atua contra várias substâncias tóxicas e impede a destruição de componentes celulares (HAYES; MCLELLAN, 1999). Diversos aditivos alimentares podem ser utilizados como estimulantes do status antioxidante, assim como do metabolismo energético (HOSEINFAR et al., 2016; BALDISSERA et al., 2019), dentre eles a colina vegetal.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes níveis de inclusão de biomassa seca de *Aspergillus niger* e colina vegetal em dietas para tilápia do Nilo (*O. niloticus*) em sistema de recirculação de água e sistema de bioflocos, respectivamente.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho zootécnico e índices somáticos de tilápia do Nilo alimentadas com diferentes níveis de biomassa seca de *Aspergillus niger* na dieta em sistema de recirculação de água;
- Avaliar composição centesimal de tilápias do Nilo alimentadas com diferentes níveis de biomassa seca de *Aspergillus niger* na dieta em sistema de recirculação de água;
- Avaliar o desempenho zootécnico e índice hepatossomático de tilápia do Nilo suplementadas com diferentes níveis de colina vegetal na dieta em sistema de bioflocos;
- Avaliar o efeito da suplementação colina vegetal sobre o metabolismo e estatus oxidante/antioxidante sérico e tecidual em tilápias em sistema de bioflocos.

CAPÍTULO II

2 MANUSCRITOS

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de 2 manuscritos, com sua formatação de acordo com as orientações das revistas Agrarian e Aquaculture, uma vez que o manuscrito 1 já foi submetido e aceito; e o manuscrito 2 já foi submetido.

MANUSCRITO I: Biomassa seca de *Aspergillus niger* em rações extrusadas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

MANUSCRITO II: Phosphatidylcholine in diets for juvenile Nile tilapia in biofloc technology system (BFT): effects on performance, energy metabolism and the antioxidant system

2.1 MANUSCRITO I

Biomassa seca de *Aspergillus niger* em rações extrusadas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Alison Alves de Sousa^{1*}, Maurício Gustavo Coelho Emerenciano², Emerson Giuliani Durigon¹, Giovanni Lemos de Mello²

1. Programa de Pós Graduação em Zootecnia – UDESC – campus de Chapecó/SC - Brasil

2. Professor adjunto no curso de Engenharia de Pesca da Universidade do Estado de Santa Catarina UDESC campus Laguna/SC – Brasil

*alissonalves1994@hotmail.com

De acordo com normas para publicação em:

Agrarian (Qualis B3 na área de Recursos Pesqueiros e Zootecnia)

Resumo

Visto que um dos maiores entraves na produção de organismos aquáticos são os altos custos com alimentação que podem chegar a 50% dos custos totais de produção, dietas elaboradas com ingredientes alternativos como os fungos podem auxiliar na redução de custos de fabricação e ajudar ainda mais a viabilidade dos cultivos. Diante disto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes níveis de biomassa seca de *Aspergillus niger* (micélio) (0, 2, 4 e 8%) em rações para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com peso médio de $1,72 \pm 0,16$ g. O experimento teve uma duração de 42 dias e foi avaliado o desempenho zootécnico, índices organo-somáticos e composição de carcaça. Em relação aos parâmetros zootécnicos não houve efeito significativo para peso final e consumo de ração. Já a conversão alimentar, ganho em peso e taxa de crescimento específico apresentaram diferenças e os melhores níveis de inclusão de biomassa seca de *A. niger* apontados pela regressão para esses parâmetros foram 3,75, 4,24 e 4,25%, respectivamente. Para os índices organo-somáticos como rendimento de carcaça, índice digestivo somático, quociente intestinal e índice esplenossomático não houve efeito significativo ($p>0,05$). No entanto pode ser observado efeito quadrático para índice hepatossomático e índice de gordura visceral em que o melhor nível de inclusão, de acordo com a análise de regressão foram de 5 e 4,75% respectivamente. Os parâmetros de composição de carcaça não apresentaram efeito significativo. De acordo com os dados obtidos, recomenda-se um nível de inclusão de 4% de biomassa seca de *A. niger* em rações extrusadas para tilápia do Nilo.

Palavras-chave: desempenho, fungo, nutrição, piscicultura.

Dry biomass of *Aspergillus niger* in extruded feeds for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings

Abstract

Since one of the major issues of the aquatic organisms production is the high cost of feeding in which could represent more than 50% of total production costs, diets made from alternative ingredients such as fungus biomass could help to reduce feed manufacturing costs and increase the feasibility of fish culture. In this context, the objective of the present work was to evaluate the different levels of *Aspergillus niger* biomass (mycelium) (0, 2, 4 and 8%) in diets of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings with a mean weight of 1.72 ± 0.16 g. The experiment last 42 days and was evaluated the zootechnical performance, organosomatic indexes and carcass composition. Regarding to the zootechnical parameters, there was no significant effect for final weight and feed intake. Feed conversion, weight gain and specific growth rate presented differences and the best inclusion levels of *A. niger* biomass according to the regression for these parameters were 3.75, 4.24 and 4.25%, respectively. The parameters of organosomatic indexes such as carcass yield, somatic digestive index, intestinal quotient and splenosomatic index did not present significant difference ($p>0.05$). On the other hand, a quadratic effect was observed for hepato-somatic index and visceral fat index, where better inclusion levels by regression were 5 and 4.75% respectively. The carcass composition parameters had no significant effect. According to the data obtained, the level of inclusion of 4% of *A. niger* (mycelium) in diets for Nile tilapia is recommended.

Key words: fish culture, fungus, nutrition, performance

Introdução

A aquicultura vem crescendo e obtendo destaque no cenário mundial nos últimos anos por ser a principal atividade responsável por suprir a demanda de pescado no mundo (FAO, 2016). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresenta extrema importância neste cenário de crescimento, principalmente no Brasil onde seu cultivo tem apresentado rápida expansão (Lima et al., 2016). O sucesso da espécie está atrelado a sua fácil adaptação a diversos tipos de sistemas de cultivo, rusticidade, baixo nível trófico, rápido crescimento, além de apresentar boas conversões alimentares (Furuya, 2010).

As boas características relacionadas à alimentação das tilápias impulsionam ainda mais os estudos relacionados aos aspectos nutricionais, fisiológicos, morfológicos e todos aqueles que afetam o desempenho produtivo (Caballero et al., 2004). Outro aspecto a ser levado em conta e não menos importante é o econômico, uma vez que o alto custo das rações pode representar mais de 50% dos custos totais de produção (Abwao et al., 2014). Diante desta problemática, a busca por ingredientes alternativos que apresentam uma composição nutricional semelhante ou até mesmo melhor que os convencionais, surgem como uma opção na redução de custos (Santos et al., 2009).

Existem muitos estudos relacionados com a utilização de leveduras (fungos unicelulares) como ingrediente alternativo em dietas aquícolas. Hisano et al. (2004) enaltecem as leveduras por sua biossegurança, pela fácil incorporação durante o processo de fabricação da ração e melhora no desempenho produtivo. Além disso, podem melhorar parâmetros sanguíneos, imunológicos e aumentar a resistência do animal em situações de estresse (Schwarz et al., 2016; Abass et al., 2018).

O fungo *Aspergillus niger* é amplamente conhecido e utilizado pela indústria devido a sua alta capacidade de produção de ácido cítrico, além disso, é um dos fungos filamentosos mais utilizados para obtenção deste produto (Wang et al., 2016; Chen e Nilsen, 2016). Por outro lado, a utilização de biomassa seca de *A. niger* na nutrição de organismos aquáticos é escassa na literatura, impulsionando a realização do presente estudo.

De forma a compreender melhor o modo de atuação desta espécie de fungo no desempenho do animal, o presente estudo teve como objetivo testar diferentes níveis de inclusão de biomassa seca de *A. niger* (micélio) na alimentação de alevinos de tilápia do

Nilo (*O. niloticus*), em rações extrusadas, e avaliar o desempenho zootécnico, índices organo-somáticos e composição da carcaça.

Materiais e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura (LAQ) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/CERES), CEUA 1429290518. O material biológico (alevinos de tilápia do Nilo) foi oriundo de uma piscicultura comercial da região e estocados em 16 caixas retangulares de polipropileno com volume útil de 60 L em sistema de recirculação de água (*RAS* na sua sigla em inglês). O sistema contava, em sequência, com um filtro mecânico (decantador de fundo cônico de 20 L) e um filtro biológico (caixa plástica de 250 L contendo 0,2 m³ de raias de piscina de polietileno de baixa densidade atuando como substrato de fixação de bactérias nitrificantes). Ainda nesta caixa, que atuava também como reservatório, foram instalados termostatos (Atman® modelo BT-300 W, Zhujiang Sanjiao, China) visando manter uma relação aproximada de 1 W/L e a temperatura próxima a 28°C; e uma bomba submersa (Atman® de 3500 L/h, Zhujiang Sanjiao, China) para bombear a água desse reservatório para as unidades experimentais. Este procedimento foi adotado com intuito de manter as mesmas características de qualidade de água em todas as unidades experimentais.

Durante 42 dias em um delineamento inteiramente ao acaso contendo 4 tratamentos com 4 repetições, foram povoados 320 juvenis de tilápia do Nilo com peso inicial de 1,72 ± 0,16 g (20 peixes por cada unidade experimental). Os tratamentos apresentavam diferentes níveis de inclusão de biomassa seca de *A. niger* (denominada micélio) nas rações com 0% (ou controle), 2%, 4% e 8%. A secagem da biomassa do fungo utilizado no experimento foi realizada através do método de secagem “drum drier”. As rações foram formuladas e extrusadas na empresa BioBase (município de Águas Frias, Santa Catarina, Brasil) e os níveis de garantia da dieta base, de acordo com as informações do rótulo, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Níveis de garantia da dieta base de acordo com as informações contidas no rótulo do fabricante (Fonte: BioBase, Águas Frias, SC, Brasil)

Níveis de garantia	
Proteína Bruta (Mín.)	400,00 g kg ⁻¹
Estrato Etéreo (Mín.)	80,00 g kg ⁻¹
Matéria fibrosa (Máx.)	50,00 g kg ⁻¹
Matéria Mineral (Máx.)	120,00 g kg ⁻¹
Cálcio (Mín.)	10,00 g kg ⁻¹
Cálcio (Máx.)	30,00 g kg ⁻¹
Fósforo (Mín.)	10,00 g kg ⁻¹
Umidade (Máx.)	100,00 g kg ⁻¹
Sódio (Mín.)	2000,00 mg kg ⁻¹
Vitamina A (Mín.)	11200,00 UI kg ⁻¹
Vitamina D3 (Mín.)	2240,00 UI kg ⁻¹
Vitamina E (Mín.)	128,00 UI kg ⁻¹
Vitamina K3 (Mín.)	15,00 mg kg ⁻¹
Vitamina B1 (Mín.)	16,00 mg kg ⁻¹
Vitamina B2 (Mín.)	16,00 mg kg ⁻¹
Vitamina B6 (Mín.)	16,00 mg kg ⁻¹
Vitamina B12 (Mín.)	16,00 mg kg ⁻¹
Biotina (Mín.)	0,06 mg kg ⁻¹
Ácido Nicotínico (Mín.)	80,00 mg kg ⁻¹
Ácido Pantotênico (Mín.)	40,00 mg kg ⁻¹
Ácido Fólico (Mín.)	5,00 mg kg ⁻¹
Colina (Mín.)	2000,00 mg kg ⁻¹
Vitamina C (Mín.)	600,00 mg kg ⁻¹
Iodo (Mín.)	1,50 mg kg ⁻¹
Selênio (Mín.)	0,30 mg kg ⁻¹
Ferro (Mín.)	85,00 mg kg ⁻¹
Cobre (Mín.)	11,50 mg kg ⁻¹
Zinco (Mín.)	80,00 mg kg ⁻¹
Manganês (Mín.)	25,50 mg kg ⁻¹
Cobalto (Mín.)	0,50 mg kg ⁻¹

O tamanho do pellet utilizado foi de 2-4 mm e o arraçoamento foi dividido em 2 horários (9:00h e 16:00h) e a quantidade de dieta ofertada inicialmente foi de 3% da biomassa e depois ajustada semanalmente através de biometrias. Os parâmetros de qualidade de água como pH (YSI-10A, Yellow Springs Instruments Inc., OH, USA), oxigênio e temperatura (YSI-55, Yellow Springs Instruments Inc., OH), foram mensurados diariamente pela manhã (8:00h). Uma vez por semana foram mensurados amônia, nitrito, nitrato, ortofosfato através de um fotocolorímetro (Alfakit modelo AT 100P, Florianópolis-SC, Brasil) e alcalinidade através de titulação volumétrica utilizando kit comercial (Alfakit cód. 2058 e 2460, Florianópolis-SC, Brasil).

Ao término do experimento, individualmente os peixes foram pesados (balança de precisão 0,01 g, Marte modelo ML 600, São Paulo, Brasil) e avaliados os seguintes índices: sobrevivência, consumo de ração, ganho em peso (peso final – peso inicial), conversão alimentar (ganho em peso / consumo de ração) e fator de condição (peso / comprimento total³ x 100). Adicionalmente, para avaliar os índices organo-somáticos foram coletados 10 peixes de cada tratamento para avaliar os seguintes índices: rendimento de carcaça RC (peso eviscerado / peso inteiro x 100), taxa de crescimento específico TCE [(ln peso final - ln peso inicial)/tempo] x 100, índice hepatossomático IHS (peso do fígado / peso total x 100), índice de gordura visceral IGV (peso da gordura / peso total x 100), índice digestivo somático IDS (peso do trato digestório / peso total x 100), índice esplenossomático IE (peso do baço / peso total x 100) e índice gonadossomático IG (peso das gônadas / peso total x 100). Para realizar a avaliação de todos os parâmetros supracitados, Os peixes foram pesados com auxílio de luvas e toalhas úmidas, e posteriormente realizado a eutanásia, onde os peixes foram sedados com eugenol até não apresentarem nenhum movimento e imediatamente sacrificados por método físico de secção medular.

Foram analisados os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e cinzas dos peixes (carcaça sem vísceras) conforme a metodologia proposta pela AOAC, (1999) e para determinar o teor de gordura foi utilizada a técnica de (Bligh e Dyer, 1959), essas mesmas metodologias foram utilizadas para a realização das análises bromatológicas da biomassa seca de *A. niger*. As análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia Animal da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM..

Quanto à análise estatística, para os parâmetros de qualidade de água foi realizada estatística descritiva dos dados obtidos, com valores médios e desvio padrão de cada tratamento. Para os demais parâmetros foi realizada análise de regressão através do programa Assistat 7.7®, com nível de significância de 5% ($p<0,05$).

Resultados e discussão

Os parâmetros de qualidade de água mantiveram-se dentro dos níveis ideais para criação de tilápia do Nilo (El-Sayed, 2006) apresentando as seguintes médias: oxigênio dissolvido $6,83 \pm 0,68 \text{ mg L}^{-1}$, temperatura $26,05 \pm 1,08 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH $6,82 \pm 0,51$, amônia $2,52 \text{ mg L}^{-1}$, nitrito $0,04 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$, nitrato $0,62 \pm 0,65 \text{ mg L}^{-1}$, ortofosfato $4,54 \pm 1,39 \text{ mg L}^{-1}$ e alcalinidade $49 \pm 11,86 \text{ mg L}^{-1}$ de CaCO_3 . As médias, desvio padrão,e cada tratamento podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros de qualidade de água durante o experimento.

Parâmetros	Nível de inclusão			
	0%	2%	4%	8%
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	$6,79 \pm 0,68$	$6,79 \pm 0,73$	$6,97 \pm 0,56$	$6,77 \pm 0,73$
Temperatura (°C)	$26,24 \pm 1,06$	$25,95 \pm 1,08$	$26,02 \pm 1,09$	$26 \pm 1,11$
pH	$6,82 \pm 0,49$	$6,83 \pm 0,49$	$6,84 \pm 0,52$	$6,79 \pm 0,54$
Amônia (mg L ⁻¹)	$2,46 \pm 2,89$	$2,38 \pm 2,88$	$2,67 \pm 3,13$	$2,57 \pm 3,11$
Nitrito (mg L ⁻¹)	$0,06 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,04$	$0,04 \pm 0,05$
Nitrato (mg L ⁻¹)	$0,08 \pm 1,08$	$0,35 \pm 0,49$	$0,63 \pm 0,76$	$0,73 \pm 0,88$
Ortofosfato (mg L ⁻¹)	$3,08 \pm 1,52$	$4,61 \pm 0,57$	$5,09 \pm 1,58$	$5,41 \pm 1,41$
Alcalinidade (mg L ⁻¹ de CaCO ₃)	$60 \pm 11,31$	$48 \pm 11,31$	$48 \pm 5,66$	$40 \pm 16,97$

Em relação aos parâmetros zootécnicos (Tabela 3), os resultados de peso final não apresentaram efeito significativo entre os tratamentos, esses resultados vão de encontro ao relatado por Meurer et al. (2000) utilizando levedura *spray dried* (0,0%; 1,5%; 3,0%; 4,5% e 6,0%) na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo com peso médio de 0,72 g, em que o desempenho dos alevinos foi melhorando a medida que o nível de inclusão de levedura foi

aumentando. No entanto, os autores não observaram diferenças significativas para o consumo de ração, o que corrobora com o presente estudo.

Os resultados de sobrevivência também não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos o que mostra que a biomassa de fungo utilizada no presente estudo não causa efeito negativo em relação a este parâmetro, corroborando com o estudo de Meurer et al. (2008) utilizando levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia do Nilo e com o estudo de Schwarz et al. (2016) avaliando o desempenho de alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Ainda em relação à sobrevivência, Koch et al. (2011) alimentando matrizes e posteriormente alevinos oriundos de desovas das mesmas matrizes com ou sem levedura (2% de levedura íntegra) observaram maior sobrevivência dos alevinos alimentados com dietas contendo levedura.

Tabela 3. Parâmetros de desempenho zootécnico de tilápias alimentadas com diferentes níveis de biomassa seca de *A. niger* em extrusadas.

Tratamento	0%	2%	4%	8%	P < 0,05	R ²
Peso final (g)	16,31 ± 0,25	18,71 ± 0,32	18,40 ± 1,01	17,32 ± 1,17	NS	---
Consumo ração (g)	16,41 ± 0,23	17,82 ± 0,99	18,05 ± 0,78	17,79 ± 1,27	NS	---
CA	1,12 ± 0,03	1,05 ± 0,05	1,08 ± 0,03	1,14 ± 0,04	0,0058	0,80
GP (g)	14,59 ± 0,26	16,98 ± 0,33	16,69 ± 1,01	15,59 ± 1,17	0,0009	0,85
TCE (%/dia)	7,22 ± 0,12	8,38 ± 0,14	8,23 ± 0,48	7,70 ± 0,56	0,0007	0,85
Sobrevivência (%)	95,31 ± 9,38	82,81 ± 13,86	92,19 ± 9,38	95,31 ± 9,38	NS	---

Média ± Desvio Padrão.; CA = conversão alimentar Y = 1.12 - 0.03X + 0.004X², GP = Ganho em peso Y = 14.80 + 1.06X 0.12X², TCE = Taxa de crescimento específico = 7.33 + 0.51X - 0.06X²

Para conversão alimentar (CA), ganho em peso (GP) e taxa de crescimento específico (TCE) foi observado efeito quadrático, onde os melhores valores de inclusão de biomassa seca de *A. niger* na ração extrusada para esses parâmetros foram (CA) 3,75%, (GP) 4,24%, e (TCE) 4,25%. Os resultados CA do presente estudo (~1,1) foram melhores quando comparados ao estudo de Abass et al. (2018), com valores médios de ~1,39 utilizando diferentes níveis de inclusão de levedura (*S. cerevisiae*) em dietas para juvenis de tilápia do Nilo. Pezzato et al. (2006) incluindo nas dietas de alevinos de tilápias diferentes formas de leveduras (íntegra com 2%, autolisada com 2% e somente parede celular com 0,3% de inclusão) observaram melhores valores de ganho em peso, conversão alimentar e

taxa de eficiência proteica quando comparado ao tratamento controle sem inclusão de levedura, o mesmo acontece com o presente estudo.

No que diz respeito aos índices organo-somáticos, os resultados de rendimento de carcaça, índice digestivo somático (IDS), quociente intestinal (QI) e índice esplenossomático (IE) não apresentaram diferença entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4. Índices organo-somáticos de tilápias alimentadas com diferentes níveis de biomassa seca de *A. niger* em rações extrusadas.

Tratamento	0%	2%	4%	8%	P < 0,05	R ²
Rendimento de Carcaça (%)	82,41±1,13	83,02 ± 5,97	85,27 ± 1,18	84,64 ± 1,20	NS	----
IHS (%)	3,38 ± 0,54	2,71 ± 0,40	2,65 ± 0,28	2,86 ± 0,26	0,0041	0,93
IGV (%)	3,29 ± 0,91	2,20 ± 0,70	2,03 ± 0,74	2,48 ± 1,04	0,0164	0,96
IDS (%)	6,76 ± 0,73	6,49 ± 0,85	7,38 ± 1,51	7,34 ± 0,88	NS	---
QI (%)	576 ± 93	541 ± 90	571 ± 74	550 ± 62	NS	---
IE (%)	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,04	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,01	NS	---

IHS = Índice hepatossomático $Y = 3.33 - 0.3X + 0.03X^2$, IGV = Índice de gordura visceral $Y = 3.24 - 0.57X + 0.06X^2$, IDS = Índice digestivo somático, QI = quociente intestinal, IE = Índice esplenossomático.

Na maioria dos parâmetros avaliados observa-se uma queda nos valores após um determinado nível de inclusão de biomassa de *A. niger*. Uma possível explicação para estes resultados é que níveis de inclusão muito altos desta biomassa podem acarretar na deficiência ou desbalanceamento de aminoácidos essenciais, dificultando a síntese proteica e resultando na utilização da proteína como fonte energética (Andriguetto et al., 2002). Esta hipótese, provavelmente, também explica os valores de índice hepatossomático (IHS) no presente estudo, onde pode ser observado um efeito quadrático, sendo que o melhor nível de inclusão de biomassa seca de *A. niger* foi de 5% na ração.

O índice hepatossomático (IHS) tem extrema importância com relação aos aspectos nutricionais dos peixes, uma vez que o fígado é responsável pela armazenagem de reservas energéticas como glicogênio e lipídios (Yogata & Oku, 2000). Meurer et al. (2007) com e sem o uso de células vivas de *S. cerevisiae* como probiótico na concentração de 0,1% das rações para alevinos de tilápia do Nilo (~0,5g) não observaram diferenças entre os tratamentos. Este fato pode ser atrelado as baixas dosagens utilizado pelos autores quando comparado ao presente estudo. Em relação ao índice de gordura víscerossomática (IGV)

também houve diferença entre os tratamentos, onde o melhor nível de inclusão, segundo a análise de regressão, e que acarretou em menores índices de gorduras acumulados, foi de 4,75%. Meurer et al. (2002) citam que as tilápias em fases iniciais tem baixo aproveitamento de lipídios como fonte de energia, o que dependendo das formulações, podem resultar em um acúmulo de gordura visceral. Bittarello et al. (2013) utilizando farinha de minhoca (0, 1,25 a 5,0%) para alevinos de tilápia do Nilo (~5g), observaram que o nível de inclusão de 1,25% apresentou um maior valor para IGV (2,85%). Certamente os tipos de ingredientes utilizados, bem como a relação energia:proteína interferem nesta variável (Furuya, 2010).

Os dados de composição centesimal de carcaça dos peixes fornecem informações importantes para a determinação de níveis de inclusão ou de substituição de um determinado ingrediente na dieta (Hisano et al., 2007). Os parâmetros de composição de carcaça como proteína bruta, matéria seca, matéria mineral e extrato etéreo não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5). Este resultado é importante uma vez que os níveis de inclusão de biomassa seca de *A. niger* utilizados no presente estudo (variando de 0 a 8% e permanecendo isoproteicas e isoenergéticas) não alteraram a composição da carcaça, fator extremamente relevante para o consumidor final.

Baccarin e Pezzato (2001) estudando o efeito da utilização da levedura desidratada em dietas para tilápia do Nilo observaram um acúmulo de proteína bruta e de gordura na carcaça dos peixes que receberam levedura. Os autores também atrelam tal resultado a um possível desbalanceamento de aminoácidos. O tipo de fungo e a escolha dos demais ingredientes das rações certamente podem influenciar os resultados, isto porque a interação e a correta combinação dos ingredientes de acordo com suas características nutricionais são fatores de extrema importância para que uma dieta apresente um perfil de aminoácidos e ácidos graxos平衡ados e equilibrados (Turchini et al., 2018).

Neste sentido, os parâmetros de desempenho zootécnico e de índices somáticos que apresentaram diferenças estatísticas, confirmam a tese que a utilização de biomassa seca de *A. niger* pode trazer benefícios ao organismo que está sendo cultivado. Além disso, estudos futuros com um período de duração maior são necessários para compreender melhor as funções desta espécie de fungo sobre o desempenho produtivo dos peixes utilizando dietas extrusadas.

Tabela 5. Composição centesimal de carcaças de tilápias do Nilo alimentadas com diferentes níveis de biomassa seca de *A. niger* em rações extrusadas e composição da biomassa seca de *A. niger*.

Parâmetros	Tratamentos				P < 0,05	Ingrediente Biomassa seca (<i>A. niger</i>)
	0%	2%	4%	8%		
PB (%)	16,91 ± 0,28	16,93 ± 1,62	17,23 ± 0,75	18,35 ± 1,10	NS	12,65
MS (%)	28,08 ± 0,16	28,89 ± 1,34	27,77 ± 0,60	27,72 ± 0,71	NS	8,15
MM (%)	3,14 ± 0,15	3,39 ± 0,26	3,03 ± 0,96	3,09 ± 0,75	NS	0,80
Gordura (%)	5,86 ± 0,24	5,64 ± 0,74	5,06 ± 1,63	5,42 ± 1,68	NS	0,70

PB; Proteína bruta; MS: matéria seca; MM: matéria mineral

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, recomenda-se um nível de inclusão de 4% de biomassa de *Aspergillus niger* seca em rações extrusadas para alevinos de tilápia do Nilo.

Agradecimentos

A empresa Tate&Lyle por todo suporte financeiro. A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina - FAPESC (PAP-FAPESC 2013TR340 e 2015TR453), e a toda equipe LAQ/UDESC pelo apoio técnico durante a realização do estudo.

Referências

ABASS, D. T.; OBIRIKORANG, K. A.; CAMPION, B. B.; EDZIYIE, R. E.; SKOV, P. V. Dietary supplementation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) improves growth, stress tolerance, and disease resistance in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, p. 1-13, 2018.

ABWAO, J. O.; BOERA, P. N.; MUNGUTI, J. M.; ORINA, P. S.; OGELLO, E. The potential of periphyton based aquaculture for nile tilapia (*Oreochromis niloticus L.*) production. A review. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 2, n. 1, p. 147-152, 2014.

ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I. Nutrição animal. 4.ed. São Paulo: Nobel,, 2002. 387 p.

AOAC. AOAC International, Official methods of analysis, 16th edn. ed. Washington, 1999.

BACCARIN, A. E.; PEZZATO, L. E. Efeito da utilização da levedura desidratada de álcool em dietas para tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 549-556, 2001.

BITTARELL, A. C.; FRIES, E. M.; FINKLER, J. K.; SIVIDANES, V. P.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R.; SIGNOR A. Farinha de minhoca para alevinos de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Agrarian**, v. 6, n. 21, 2013.

BLIGH, E.; DYER, W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem.**, v. 37, p. 911-917, 1959.

CABALLERO, M.J.; IZQUIERDO, M.S.; KJORSVIK, E. et al. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus auratus* L., caused by short- or long – term feeding with vegetable oils as the sole lipid source. **Journal of Fish Disease**, v. 27, p. 531- 541, 2004.

CHEN, Y.; NIELSEN, J. Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. **Current Opinion Biotechnology**, v. 37, p. 165–172, 2016.

EL-SAYED, A. M.; ABDEL-FATTAH, M. Tilapia culture. **CABI**, 2006

FAO. World review of Fisheries and Aquaculture 2016, Rome, 2016.

FURUYA, W. M. Tabelas brasileiras para nutrição das Tilápias. Toledo: GFM, p. 100, 2010.

HISANO, H. et al. Zinco e levedura desidratada de álcool como pró-nutrientes para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, n. 2, p.171-179, 2004.

HISANO, H.; NARVÁEZ-SOLARTE, W. V.; BARROS, M. M.; PEZZATO, L. E. Desempenho produtivo de alevinos de tilápia-do-nilo alimentados com levedura e derivados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 7, p. 1035-1042, 2007.

KOCH, J.A.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; TEIXEIRA, C.P.; FERNANDES JR, A.C.; PAVOVANI, C.R. Levedura como pronutriente em dietas para matrizes e alevinos de tilápia-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 11, p. 2281-2289, 2011.

LIMA, L.; OLIVEIRA JÚNIOR, F.; GIACOMINI, H.; LIMA JUNIOR, D. Expansion of aquaculture parks and the increasing risk of non-native species invasions in Brazil. **Reviews in Aquaculture**, 2016.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus L.*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 566-573, 2002.

MEURER, F., HAYASHI, C., COSTA, M. M., FRECCIA, A., MAUERWERK, M. T. *Saccharomyces cerevisiae* como probiótico para alevinos de tilápia-do-Nilo submetidos a desafio sanitário. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1219-1224, 2007.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M. M.; MASCIOLI, A. S.; COLPINI, L. M. S.; FRECCIA, A. Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia-do-Nilo. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 804-812, 2008.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; BOSCOLO, W. R. 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.

PEZZATO, L.E.; MENEZES A.; BARROS, M.M.; GUIMARÃES, I.G.; SCHICH, D. Levedura em dietas para alevinos de tilápis do Nilo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 13, n. 1, p. 84-94, 2006.

SANTOS, E. L.; LUDKE, M. C. M.; BARBOSA, J. M.; RABELLO, C. B. V.; LUDKE, J. V. Digestibilidade aparente do farelo de coco e resíduo de goiaba pela tilápis do Nilo (*Oreochromis niloticus*), **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, p. 175-180, 2009.

SCHWARZ, K. K.; NASCIMENTO, J. C. D. O.; SILVA, C. H. D. A.; SALVADOR, J. G. Desempenho zootécnico de alevinos de tilápis do nilo (*oreochromis niloticus*) alimentados com levedura de *saccharomyces cerevisiae*. **Holos**, v. 3, p.104–113, 2016.

TURCHINI, G. M.; TRUSHENSKI, J. T.; GLENROSS, B. D. Thoughts for the future of aquaculture nutrition: realigning perspectives to reflect contemporary issues related to judicious use of marine resources in aquafeeds. **North American Journal of Aquaculture**. 2018 .

WANG, L.; CAO, Z. L.; HOU, L.; YIN, L. H.; WANG, D. W.; GAO, Q. The opposite roles of *agdA* and *glaA* on citric acid production in *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5791–5803, 2016.

YOGATA, H.; OKU, H. The effects of swimming exercise on growth and whole-body protein and fat contents of fed and unfed fingerling yellowtail. **Fisheries Science**, v. 66, p. 1100–1105. 2000.

2.2 MANUSCRITO II

Phosphatidylcholine in diets for juvenile Nile tilapia in biofloc technology system (BFT): effects on performance, energy metabolism and the antioxidant system

Alison A. Sousa^{a*}, Diogo A. Lopes^{a,b}, Mauricio G. C. Emerenciano^{a,c}, Luisa Nora^b, Carine F. Souza^d, Matheus D. Baldissera^d, Bernardo Baldissertto^d, Davi F. Alba^a, Aleksandro S. Da Silva^{a,b}

^a Postgraduate Program in Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil.

^b Department of Animal Science, UDESC, Chapecó, SC, Brazil.

^c Department of Fisheries Engineering, UDESC, Laguna, SC, Brazil.

^d Postgraduate Program in Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

Corresponding Author*: alissonalves1994@hotmail.com

De acordo com normas para publicação em:

Aquaculture (Qualis A2 na área de Recursos Pesqueiros e Zootecnia)

Abstract

Intensification of aquaculture production systems requires more nutritionally complete diets to maximize productive performance, metabolic processes and overall fish health. In previous studies, dietary supplementation with choline (both choline chloride and phosphatidylcholine) improved productive performance of tilapia cultivated in clear water. Nevertheless, choline has not been tested in a biofloc technology system (BFT), a culture system inhabited by diverse microorganisms that serve as food sources for fish. The objective of this study was to determine whether supplementation with phosphatidylcholine, also known as vegetable choline (0, 400, 800 and 1200 mg/kg of feed), in diets of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in a biofloc system would stimulate energy metabolism and the serum antioxidant system, with consequent improvements in productive performance. Juvenile Nile tilapia ($\cong 8$ g) were tested over 40 days. During this period, zootechnical performance was evaluated. Blood, gills and liver were collected at the end of the experiment for biochemical and energetic analyses. There were no significant differences between the treatments with respect to parameters of zootechnical performance (body weight, biomass gain, feed conversion, specific growth rate and hepatosomatic index) ($P > 0.05$). Alanine aminotransferase levels were significantly lower in fish fed 800 mg/kg of phosphatidylcholine than in control; total protein levels increased as a result of increased globulin levels. Activities of creatine kinase enzyme (800 and 1200 mg choline/kg treatments) and pyruvate kinase (1200 mg choline /kg) were significantly higher in choline-treated fish than in controls. Supplementation with the three doses of choline reduced hepatic lipid peroxidation and stimulated glutathione S-transferase activity. By contrast, the activities of other antioxidant enzymes (catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase) were altered in the livers of fish that consumed the highest doses of phosphatidylcholine. We conclude that, in a biofloc system, supplementation with phosphatidylcholine had no effect on the zootechnical performance of tilapia; however, it stimulated energy metabolism and contributed to activation of hepatic GST and lower levels of lipid peroxidation.

Keywords: Vegetable choline, additives, hepatic health, productive efficiency.

1 Introduction

Biofloc technology (BFT) is a production system with minimal or zero water exchange, used widely in aquaculture. BFT is characterized by low or zero effluent discharge, high biosecurity and productivity (Crab et al., 2012; Avnimelech, 2015). The microbial community present in the system recycles nutrients, contributing nutrition sources for the cultured organisms; the system decreases feed conversion ratios and consequently reduces feeding costs (Wasielesky et al., 2006; Ekasari et al., 2014). Furthermore, BFT positively modulates the immune system of the organisms and provides greater protection against diseases (Emerenciano et al., 2013; Kim et al., 2014).

Because of the trend towards intensification of production systems, studies on dietary requirements and high performance diets have increased (Cyrino et al., 2010; Turchini et al., 2018). Improvement on fish health is crucial for production success. In this sense, dietary supplements may contribute to this success (Elkamel et al., 2012; Reda et al., 2016). In particular, vitamins that are required in small quantities are crucial to performance parameters of fish as well as for enhancing several metabolic processes (Halver and Hardy, 2002).

Choline is a B-complex vitamin that is essential for animal development. It is responsible for the synthesis of methionine, and for the transport of fat from the liver to other tissues, preventing its accumulation (Devlin, 2000). Choline is commonly found in animal feeds in the form of choline chloride. Phosphatidylcholine (vegetable choline) is a relatively new source in aquafeeds; it has been used in diets for broiler chickens with positive results in terms of parameters of zootechnical performance (Kumar, 2009). For Nile tilapia, phosphatidylcholine has been showing promising results. Baldissera et al. (2019) observed an improvement in zootechnical performance associated with a hepatoprotective effect and improvement of hepatic energetic metabolism in Nile tilapia fed at 400, 800 and 1200 mg/kg for 60 days. That study was conducted in clear water; the effects of phosphatidylcholine on fish cultured in a biofloc system remain unknown. Because fish farming with biofloc technology offers advantages over traditional fish farming (e.g., little or no water exchange and less environmental impact), its use has increased substantially; it is important to monitor the effects of phosphatidylcholine in this culture system (De Lima et al., 2018). Therefore, the objectives of the present study were to

evaluate the effect of phosphatidylcholine dietary supplementation on productive performance, energy metabolism and serum and tissue antioxidant activities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised in a biofloc system.

2. Materials and Methods

The experiment was carried out at the Aquaculture Laboratory of the West (LAQUA-Oeste) of UDESC, Chapecó, SC, Brazil. The fish used in the experiment (juvenile Nile tilapia, *O. niloticus*) were obtained from a local fish farm, transported to the laboratory and then acclimatized and maintained for 10 days in 1000 L polyethylene round tanks until the beginning of the experiment. During this period, the fish were fed with diets containing 28% crude protein (Anhambi, Itapejara D'Oeste, PR, Brazil), twice a day (9:00 am and 5:00 pm) in a ratio of 4% of biomass. The mean values of water quality parameters were as follows: dissolved oxygen was 6.42 mg L^{-1} , temperature $27.21 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7.29 and ammonia 0.19 mg L^{-1} .

2.1 Experimental design

The experimental device consisted of two workbenches referred as "macrocosm-microcosms" (Wasielesky et al., 2006; Emerenciano et al., 2013). Each bench contained twenty experimental units (100 L polyethylene round tanks with useful volume of 70 L; called as microcosms) connected to a 1000 L polyethylene round tank circular tank (with useful volume of 400 L) called as macrocosm. The water was pumped from the macrocosm to the experimental units using an external pump 0.5 CV (Intech Macchine®, SP, Brazil) and returned by gravity. The macrocosms were also connected to each other to maintain equivalent water quality and qualitative-quantitative profile of microorganisms (Brol et al., 2017).

Two thermostats were placed in each macrocosm (Atman® model BT-300 W, Zhujiang Sanjiao, China) to maintain the temperature close to $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ throughout the experiment. The water used was collected from the municipal water supply network (CASAN), remaining for 48 hours with continuous aeration to complete the dechlorination process. For the suspension of bioflocs and oxygenation of the water, microperforated hose rings (70 cm) were placed in the central position of the macrocosm, and a porous stone (20

mm in diameter and 30 mm in height) was installed in each microcosm, fed by a radial air blower (800 W). Dechlorinated water lost by evaporation was replaced in the system. Finally, two decanters (one in each macrocosm) were placed to control the solids (Ray et al., 2010; Sousa et al., 2019), maintained in the range from 20 to 50 mL L⁻¹ (Avnimelech, 2007).

One week before the experiment started, a mature biofloc inoculum was added to the experimental device (300 L in each macrocosm), from a previous BFT tilapia culture from LAQUA-Oeste. The inoculum presented the following characteristics: ammonia 0.21 mg L⁻¹, nitrite 0.06 mg L⁻¹, nitrate 0.39 mg L⁻¹, orthophosphate 46 mg L⁻¹, alkalinity 30 mg L⁻¹ CaCO₃ and settleable solids 15 mL L⁻¹. Simultaneously, 100 juvenile Nile tilapia (~15 g), were stocked in each macrocosm aiming the formation and maintenance of the bioflocs. For this procedure, the methodology proposed by Emerenciano et al. (2012) was applied using a C:N (carbon: nitrogen) ratio of 20:1 with daily addition of sugar cane molasses (liquid) as an external carbon source and 28% CP feed (Anhambi, Itapejara D'Oeste, PR, Brazil) as a nitrogen source.

The experiment was conducted in a completely randomized design with four treatments and five replicates per treatment. The treatments consisted of various levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 g/kg of feed) according to Baldissera et al. (2019). The diets were elaborated from a basal diet with 48% crude protein (CP). At the beginning of the experiment two-hundred Nile tilapia juvenile (mean initial weight 8.03 ± 0.03 g) were stocked, 10 fish per experimental unit, in a density of 143 fish m⁻³. The experiment lasted 40 days.

2.2 Diets and feed management

The experimental diets (isoproteic and isoenergetic) were formulated and elaborated at the Laboratory of Animal Nutrition (LANA), Santa Catarina State University (UDESC). The ingredients were weighed (Marte® scale, model AS2000C, SP, Brazil), phosphatidylcholine added (Table 1) according to each treatment level (0, 400, 800 and 1200 g/kg of feed) and mixed. After mixing, warm water (~60 °C) was added at 300 mL/kg of feed with binder (gelatin, 1% of feed dry weight) for subsequent pelletization. The pellets were dried in an oven at 55 °C (Cienlab®, Campinas, SP, Brazil) for 48 h, after

being ground in porcelain crucibles and sieved (Bertel® sieve, Caieiras, SP, Brazil) to obtain consistent particle size of 2.5 mm. The diets were stored in plastic flasks and identified according to each treatment.

The fish were fed three times per day (9:00, 13:30 and 17:00 h). During weeks 1 and 2, the amount of feed offered was 6% of the biomass, and until the end, 4% of the biomass was offered out. The feed amount was adjusted weekly using data obtained by biometrics. In the macrocosms, a commercial diet (28% crude protein, Anhambi, Itapejara D'Oeste, PR, Brazil) was offered twice a day (9:00 am and 5:00 p.m.) at 4% of the biomass.

2.3 Maintenance and monitoring of water quality

The pH (Alfakit®, model AT 315SP, Florianópolis, SC, Brazil), settleable solids (Imhoff cone), temperature and dissolved oxygen (Alfakit®, model AT 160SP) were monitored daily. Weekly, the concentrations of ammonia, nitrite, nitrate and orthophosphate were measured using a photometer (Alfakit®, model AT 100P) and total alkalinity was measured by volumetric titration using a commercial kit (Alfakit® – codes 2058 and 2460). In the first week of experimental period, the probiotic Keraacqua® (Farroupilha, RS, Brazil) was added to the water to stimulate heterotrophic bacteria and bioflocs growth according to the manufacturer's protocol.

2.4 Zootechnical performance and hepatosomatic index

At the of the experimental period, all fish were weighed individually on a digital scale with an accuracy of 0.01 g (Marte®, model: ML 600, São Paulo, Brazil). The zootechnical parameters evaluated were as follows: final weight (g); feed conversion ratio (FCR:feed intake /weight gain); specific growth rate ($SGR:100 \times \{\ln \text{final weight} - \ln \text{initial weight}\}/\text{days of the experiment}$); survival (%;{final number/initial} x 100). The hepatosomatic index was calculated as (liver weight (g) / final weight (g) x 100).

2.5 Fish collection for hepatosomatic and biochemical analysis

After evaluation of zootechnical performance, three fish from each experimental unit (15 per treatment) were anesthetized (eugenol 60 µ /L) and after there was no movement, fish were weighed and blood (caudal portion) collected without anticoagulant to

obtain serum. After blood collection, the animals were immediately euthanized using medullar section for removal of liver and gills. The branchial arch of each fish (right side, ventral part down) was collected for biochemical analysis. To determine the hepatosomatic index, we used three fish from each experimental unit. Blood, gills and liver were stored in refrigerated 2 mL microtubes until processing and analysis. The procedures adopted were carried out according to the Ethics Committee on Animal Use (CEUA/UDESC).

2.6 Serum biochemistries

Blood samples were centrifuged at 5500 x g for 10 min to obtain serum; material that was collected and stored in microtubes under freezing (-20 °C) until analysis. The serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total protein, albumin, triglycerides and cholesterol were measured using specific commercial kits (Analisa) on a semiautomatic equipment (Bio Plus 2000). Globulin levels were calculated as total protein – albumin levels.

2.7 Energy metabolism enzymes in gills

To evaluate enzymes belonging to the phosphoryl transfer network, 100 mg of gills filaments were washed in SET buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) and homogenized (1:10 w/v) in the same SET buffer using a Potter-Elvehjem glass homogenizer. The homogenates were centrifuged at 800 x g for 10 min at 4 °C. Some of these supernatants were used to evaluate adenylate kinase (AK) activity; the pellets were discarded and the supernatants were once again centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4 °C. The supernatants containing cytosol were collected for determination of pyruvate kinase (PK) and cytosolic creatine kinase (CK) activity. The pellets, containing mitochondria, were washed twice with the same SET buffer and resuspended in 100 mM Trizma and 15 mM MgSO₄ buffer (pH 7.5) to evaluate mitochondrial CK activity. The supernatants were stored for no more than 1 week at -80 °C.

Branchial CK activity was assayed based on the colorimetric method established by Hughes (1962), estimating the creatine levels at wavelength of 540 nm, as reported in detail by Baldissera et al. (2017). Results were expressed as pmol of creatine formed/min/mg of protein. Branchial PK activity was assayed according the protocol established by Leong et

al. (1981), and published in detail by Baldissera et al. (2017). Activity was expressed as nmol pyruvate formed/min/mg of protein. Branchial AK activity was measured using a coupled enzyme assay with hexokinase (HK) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), according to Dzeja et al. (1999), and described in detail by Baldissera et al. (2017). Activity was expressed as nmol ATP formed/min/mg of protein.

2.8 Oxidant and antioxidant status in liver

Livers were homogenized (1:10 w/v) in medium containing 120 mM potassium chloride and 30 mM buffer phosphate (pH 7.4) and centrifuged ($800 \times g$, 10 min, -4°C) and the supernatant fraction obtained was frozen at -20°C . Protein concentrations were determined using the Coomassie Blue method following the methodology described by Read and Northcote (1981) using bovine serum albumin as a standard.

Reactive oxygen species (ROS) production was assessed by determining 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) in oxidation (LeBel et al., 1992) DCFH-DA is hydrolyzed by intracellular esterases to form non-fluorescent DCF, which is then rapidly oxidized to form highly fluorescent DCF in the presence of ROS. The DCF fluorescence intensity correlates to the amount of ROS formed. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 480 and 535 nm, respectively. A calibration curve was generated using standard DCF (0.1–1 μM), and data were calculated as U DCF/mg of protein.

Lipid peroxidation was estimated using thiobarbituric acid-reactive substances. The essential oil from biocholine induces stress in tilapia. The TBARS assay was performed using a malondialdehyde (MDA) reaction with 2-thiobarbituric acid (TBA) that was optically measured according to Buege & Aust (1978). TBARS levels were expressed as nmol MDA/g tissue. The activity of superoxide dismutase was determined according to the auto-oxidation principle of pyrogallol, inhibited in the presence of SOD. The optical density change was determined kinetically for two minutes at 420 nm, at ten second intervals according to methodology described by Beutler (1984). Activity was expressed as U SOD/mg protein.

In addition, the catalase (CAT) activity was measured using the method described by Nelson and Kiesow (1972). The change of H_2O_2 absorbance after 60 s was measured at 240 nm using ultraviolet spectrophotometry. CAT activity was calculated and expressed as

$\mu\text{mol CAT min}^{-1} \text{ mg protein}$. GST activity was measured according to Mannervik and Guthenberg (1981) with slight modifications. GST activity was measured as the rate of formation of dinitrophenyl-S-glutathione at 340 nm in a medium containing 50 mM potassium phosphate, pH 6.5, 1 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate, and tissue supernatants (approximately 0.045 mg of protein). The results were calculated and expressed as U GST/mg protein. Moreover, the GPx activity was measured using tert-butylhydroperoxide as the substrate (Wendel, 1981). The enzyme activity was determined by monitoring the NADPH disappearance at 340 nm in a medium containing 100 mM potassium phosphate buffer/1 mM EDTA, pH 7.7, 2 mM GSH, 0.1 U/mL GR, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide, 0.1 mM NADPH and tissue supernatants. The results were calculated and expressed as U GPx mg/protein.

2.9 Statistical analysis

Descriptive statistics (means \pm SD) were used to described the water quality parameters in each treatment and macrocosms. The data were analyzed using R-language, v.2.15.1 (R Development Core Team 2012). The normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity (Levene test) were assessed. Data that did not met normal distribution were log transformed. Once data met the assumptions, significant differences between the treatments were detected through the Tukey test (Sokal and Rohlf, 1995). All data were analyzed at 5% level of significance ($P < 0.05$).

3 Results

3.1 Water quality, zootechnical performance and hepatosomatic index

The results of water quality parameters are displayed in Table 2. The values were similar between treatments and macrocosms. The dissolved oxygen mean level was $6.52 \pm 0.04 \text{ mg L}^{-1}$, temperature $27.61 \pm 0.05^\circ\text{C}$ and pH 7.08 ± 0.02 . With respect to nitrogen compounds, ammonia was present at levels of $0.21 \pm 0.20 \text{ mg L}^{-1}$, nitrite $0.19 \pm 0.16 \text{ mg L}^{-1}$ and nitrate $0.28 \pm 0.29 \text{ mg L}^{-1}$. Orthophosphate and alkalinity levels were $25.73 \pm 14.65 \text{ mg L}^{-1}$ and $44.50 \pm 33.54 \text{ mg L}^{-1}$ of CaCO_3 , respectively. Settleable solids (volume of bioflocs) were present at a mean of $19.27 \pm 14.06 \text{ mL L}^{-1}$.

The survival rates of the T0, T400, T800 and T1200 treatments were 98%, 96%, 96% and 98%, respectively. There were no significant differences between treatments in terms of initial weight, final weight, weight gain, biomass gain, feed conversion, specific growth rate and hepatosomatic index ($P > 0.05$) (Table 3).

3.3 Serum biochemistry

There were no significant differences between the treatments with respect to serum levels of AST, albumin, cholesterol and triglycerides ($P > 0.05$). Serum ALT levels were significantly lower at 800 mg/kg treatment than at other treatment levels.

Serum globulin and total protein levels were significantly higher in the supplemented groups at 400 and 1200 mg/kg than in the control group, whereas serum glucose levels were significantly lower in the supplemented group at 800 mg/kg (Table 4).

3.4 Enzymatic activity in the gills

CK-CYT activity was significantly higher in fish gills fed with 800 and 1200 mg/kg choline than in the control (0 mg/kg), while PK activity was significantly higher in tilapia fed at 1200 mg/kg choline compared to control. There was no significant difference between the treatments with respect to activity of the enzymes CK-MYT and AK ($P > 0.05$) (Table 5).

3.5 Oxidant and antioxidant status in liver

Hepatic TBARS levels were significantly lower in fish from the three supplemented treatments with phosphatidylcholine than in control ($P < 0.05$), although ROS levels did not differ significantly between treatments ($P > 0.05$). GST activity was significantly higher in livers of fish supplemented with phosphatidylcholine (800 and 1200 mg/kg) than in the control group ($P < 0.001$), whereas SOD activity was significantly lower in the same groups. Finally, the activities of GPx and CAT were significantly lower in the 1200 mg/kg of choline group than in the control group (Table 6).

Discussion

The water quality parameters remained within the ideal levels for the species

throughout the experiment (El-Sayed, 2006). The values were consistent with those of other BFT experiments with tilapia (Azim and Little 2008; Brol et al., 2017; Sousa et al., 2019). The alkalinity presented an average of 44.50 ± 33.54 mg L⁻¹ of CaCO₃, below those recommended by Avnimelech (2015) with >100 mg L⁻¹ of CaCO₃ aiming to keep nitrification process and ammonia uptake by heterotrophic bacteria (Hargreaves, 2013). However, the observed level in the present study did not change the system dynamics of pH and nitrogen compounds, and therefore, did not negatively impact the overall water quality. Orthophosphate presented an average of 25.73 ± 14.65 mg L⁻¹, a similar value to the one reported by Sousa et al. (2019) of 27.45 mg L⁻¹. The accumulation of this compound is common in the BFT system (Wasielesky et al., 2006; Emerenciano et al., 2017).

In the present study, there was no effect of phosphatidylcholine supplementation on zootechnical performance of tilapia. By contrast, Baldissera et al. (2019) showed that the dietary inclusion of 800 mg of phosphatidylcholine/kg in Nile tilapia juveniles (~7.10 g) for 61 days in clear water improved growth performance. In addition, the authors observed in the control treatment a mean of 24.75 g of final weight, lower than 29.5 g in 40 days in the control treatment of the present experiment (~8.03 g initial weight). This may suggest that bioflocs contributed to the growth and may have supplied the demand for phosphatidylcholine. This nutrient would be naturally available in the form of microorganisms consumed by fish, including heterotrophic bacteria, rotifers, microalgae, nematodes, annelids, protozoa, heterotrophic bacteria and copepods (Ray et al., 2010; Sousa et al., 2019). In addition, bioflocs contain proteins, lipids, fatty acids and essential amino acids, as well as vitamins (Ju et al., 2008, Emerenciano et al., 2013, Ekasari et al., 2014).

Khosravi et al. (2015) suggested that fish fed choline-deficient diets may present decreased feed intake, growth retardation and low survival; this was not reported in the present study. Another explanation for the different results between biofloc and clear water might be related to the nutritional composition of the diet, and differential digestibility of feedstuff might affect the supply of micronutrients and overall fish performance (Furuya and Furuya, 2010). With respect to hepatosomatic index (HSI), there were no significant differences between the treatments ($P > 0.05$). The authors would expect that this index could be positively affected by phosphatidylcholine because of its hepatoprotective

function (Baldissera et al., 2019); nevertheless, this did not happen.

High levels of AST and ALT may indicate physiological or pathological conditions e.g. by an increase of protein catabolism (Luo et al., 2016) or liver damage. In the present study, AST did not differ between treatments; however, ALT showed lower levels in the 800 mg of phosphatidylcholine/kg group, possibly may suggesting that this dose had a hepatoprotective effect during protein synthesis, corroborating protective effects of choline on the hepatic system (Baldissera et al., 2019). Total serum protein levels increased in groups with phosphatidylcholine as a result of increased globulin, a protein fraction that includes proteins involved in the immune response. Studies showed that increased blood globulin levels imply an improvement in the immune system of fish (Elkamel and Mosaad, 2012; Dorucu et al., 2009), suggesting that phosphatidylcholine directly or indirectly stimulated the immune system. The mechanism remains unknown; nevertheless, it deserves further research. In our study, we observed lower serum glucose levels in fish fed 800 mg/kg of phosphatidylcholine, a good indicator of lower stress. In a study conducted by Baldissera et al. (2019) tilapia liver glucose levels were higher when supplemented at 1200 mg/kg. Generally, high glucose levels may suggest metabolic and biochemical disorders that would compromise ATP production.

CK presents in the cytoplasm and mitochondria of the cell generally acts as a regulator of energy homeostasis (Wallimann et al., 1998). In the present study, higher CK-CYT activity was observed in the gills of fish fed 800 and 1200 mg/kg of phosphatidylcholine, suggesting improved ATP production in gill cells. There was also an increase on PK activity with the inclusion of phosphatidylcholine. This phenomenon may benefit the fish because these enzymes normally regulate energy metabolism and could positively affect fish health (Baldissera et al., 2017). According to Wang et al. (2002) PK is the major route of energy supply to tissue cells, in other words, increased PK activity may have stimulated the generation of ATP in the gills. Corroborating our observations, Baldissera et al. (2019) reported a significant increase in hepatic PK activity of Nile tilapia fed with diets containing 800 and 1200 mg choline/kg of feed, suggesting an increase in pyruvate and ATP production in liver tissue, boosting the energy transfer and distribution, as well as contributing on the balance between cellular adenosine triphosphate (ATP) consumption and production. Therefore, increased branchial PK activity can contribute to

improvement of energy transfer and distribution in tissues with higher energy requirements, including gill tissue (Baldissera et al., 2019).

Choline doses of 400, 800 and 1200 mg/kg decreased lipid peroxidation in the liver, as observed by Baldissera et al. (2019). Cells have enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems responsible for maintaining oxidant/antioxidant balance, thereby avoiding harmful biochemical reactions. In the first study with phosphatidylcholine in tilapia, researchers found that, in the livers of supplemented fish, the total antioxidant capacity was higher (Baldissera et al., 2019). In the present study, we measured the activity of GPx, GST, SOD and CAT, because these enzymes constitute defenses against free radicals at exacerbated levels; nevertheless, it is important to mention that the fish defense system can also produce free radicals to eliminate pathogens; therefore, the balance between oxidants and antioxidants is important for fish health. These antioxidants enzymes are important in the liver, performing several functions including detoxification. These enzymes are also the first line of defense of the cells against free radicals (Hegazi et al. 2010) that, if not blocked, cause oxidative stress. Hoseinifar et al. (2016) evaluated palm extract in diets of common carp (~4.06 g) and observed an increase in antioxidant defenses; GPx was the main enzyme stimulated by palm extract. We did not observe this effect in the present study. We observed lower activity of CAT, SOD and GPx antioxidant enzymes in the livers of fish supplemented with phosphatidylcholine. These enzymes are stimulated by various factors, particularly when the fish comes in contact with pathogenic microorganisms present in the culture system (Yilmaz, 2019). In the biofloc system as mentioned, the amounts of microorganisms are substantial, possibly causing stimulation of the antioxidant system. Therefore, our hypothesis is that choline protected livers in the 800 and 1200 mg/kg groups. The mechanism was not a reduction in the activity of the antioxidant enzymes in these groups; rather, there was increased liver enzymatic activity in the control group (0 mg/kg).

GST is one of the most important antioxidant enzymes in the liver. Its main function is the sequestration of free radicals. The activity of this enzyme increases in the presence of some dietary additives (Metwally et al., 2009). This notion was confirmed when phosphatidylcholine directly influenced liver GST activity in the present study. There was an increase in GST activity at higher levels of inclusion of phosphatidylcholine, causing a

hepatoprotective effect, and consequently reducing the need for the activity of the other antioxidant enzymes. The mechanism of how phosphatidylcholine stimulates GST is unknown; nevertheless, choline has already been associated with regulation of the antioxidant response in organs involved in the immune response of fish (Wu et al., 2014). Wu et al. (2014) found that vegetable choline (310, 607, 896, 1167 and 1820 mg/kg) for 65 days improved the antioxidant defense system in immune organs (head kidney and spleen) of common carp (*Cyprinus carpio*), concluding that improvement of antioxidant defense system may contribute to enhancement of fish immune system, optimizing the immune response to pathogens. Shiu et al. (2017) reported that choline (1g/kg) altered plasma protein profile and modulated expression of related immune-enhancing proteins of *Epinephelus coioides*, proteins that play important roles in immune responses against pathogens, suggesting the potential use of choline to boost the immune system. It is evident here that the phosphatidylcholine directly and indirectly influenced in metabolism of serum carbohydrates, the energetic metabolism of the gills and the antioxidant status of the liver in Nile tilapia raised in BFT system; nevertheless, these effects were not sufficient to be reflected in productive performance during the first 42 days of supplementation. Therefore, longer-term studies are important to verify the impact on the productive performance these fish.

Conclusion

Our results suggest that dietary supplementation of phosphatidylcholine in Nile tilapia raised in BFT system did not improve zootechnical performance. Nevertheless, phosphatidylcholine supplementation stimulated energy metabolism (important in the regulation of cellular homeostasis), as well as GST activity contributing to lower rates of lipid peroxidation.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development - CNPq and the Scientific and Technological Research Support Foundation of Santa Catarina State - FAPESC. M Emerenciano and A. S. Da Silva are CNPq research

fellow. In addition, the first author received CAPES master's fellowship. Authors thank to all the staff of LAQUA-Oeste for technical support.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Ethics committee

The project was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals in Research at the State University of Santa Catarina, number: 9595130319.

References

- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. Aquaculture 264, 140–147. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.11.025.
- Avnimelech Y., 2015. Biofloc technology - a practical guide book, 3nd ed. J. World Aquacult. Soc., Baton Rouge, Louisiana, EUA.
- Azim, M. E., Little, D. C., 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc coposition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 283, 29-35. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.06.036.
- Baldisserra, M.D., Souza, C.F., Baldisserotto, B., Zimmer, F., Paiano, D., Petrolli, T.G. da Silva, A.S., 2019. Vegetable choline improves growth performance, energetic metabolism, and, antioxidant capacity of fingerling Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 501, 224-229. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.11.021
- Baldisserra, M.D., Souza, C.F., Santos, R.C.V., Stefani, L.M., Moreira, K.L.S., da Veiga, M. L., Rocha, M.I.U.M., Baldisserotto, B., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* strain PA01 impairs enzymes of the phosphotransfer network in the gills of *Rhamdia quelen*. Vet. Microbiol. 201, 121–125. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.01.016
- Beutler, E., 1984. Superoxide dismutase. In: Beutler E (Editor), Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. Grune & Stratton, Philadelphia, PA.
- Brol, J., Pinho, S.M., Sgnaulin, T., Pereira, K.R., Thomas, M.C., de Mello, G.L., Miranda-Baeza, A., Emerenciano, M.G.C., 2017. Tecnologia de bioflocos (BFT) no

- desempenho zootécnico de tilápias: efeito da linhagem e densidades de estocagem. Arch. Zootec. 66, 229-235. doi: 10.21071/az.v66i254.2326
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology. 52, 302-310. doi: 10.1016/S0076-6879(78)52032-6
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. Aquaculture 356-357, 351-356. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.04.046
- Cyrino, J.E.P., Bicudo, A.J.A., Sado, R.Y., Borghesi, R., Dairiki, J.K., 2010. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. R. Bras. Zootec. 39, 68-87.
- De Lima, E.C.R., Souza, R.L., Girao, L.J.M., Braga, I.F.M., Correira, E.S. Culture of Nile tilapia in a biofloc system with different sources of carbon. Rev. Cien. Agronon. 49, 458-466, 2018.
- Devlin, T. M., 2000. Manual de bioquímica com correlações químicas. Edgard Blucher, São Paulo.
- Dorucu, M., Colak, S.O., Ispir, U., Altinterim, B., Celayir, Y., 2009. The effect of black cumin seeds, *Nigella sativa*, on the immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Mediter. Aquaculture J. 02, 27-33.
- Dzeja, P.P., Vitkevicius, K.T., Redfield, M.M., Burnett, J.C., Terzic, A., 1999. Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. Circ. Res. 84, 1137-1143. doi: 10.1161/01.RES.84.10.1137
- Ekasari, J., Angela, D., Waluwo, S.H., Bachtiar, T., Surawibjaja, E.H., Bossier, P., de Schryver, P., 2014. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. Aquaculture 426-427, 102-111. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.01.023
- Elkamel, A.A., Mosaad, G.M., 2012. Immunomodulation of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by *Nigella sativa* and *Bacillus subtilis*. J. Aquacult. Res. Dev. 3. doi: 10.4172/2155-9546.1000147
- El-Sayed, A.M., 2006. Tilapia culture. CABI Publishing Series, Egypt (2006).
- Emerenciano M., Ballester, E.L.C., Cavalli, R.O., Wasielesky, W., 2012. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system

- for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). Aquac. Res. 43, 447-457. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02848.x
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzon, G., 2013. Biofloc Technology (BFT): a review for 347 aquaculture application and animal food industry. J. World Aquacult. Soc., Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Emerenciano, M.G.C., Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porcha, M., Miranda-Baeza, A., 2017. Biofloc technology (BFT): A tool for water quality management in aquaculture. InTech (2017), pp. 91-109.
- Furuya, W.M., Furuya, V.R.B., 2010. Nutritional innovations on amino acids supplementation in Nile tilapia diets. R. Bras. Zootec. 39, 88-94. doi: 10.1590/S1516-35982010001300010
- Halver, J.E., Hardy, R.W., 2002. Fish Nutrition. Elsevier, San Diego.
- Hargreaves, J.A., 2013. Biofloc production systems for aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center.
- Hegazi, M.M., Attia, Z.I., Ashour, O.A., 2010. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. Aquatic Toxicol. 99, 118-125. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.04.007
- Hoseinfar, S.H., Ringo, E., Masouleh, A.S., Esteban, M. A., 2016. Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. Rev. Aquacul. 8, 89-102. doi: 10.1111/raq.12082
- Hughes, B.P., 1962. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. Clin. Chim. Acta. 7, 597-603. doi: 10.1016/0009-8981(62)90137-7
- Ju, Z.Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., 2008. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc fractions to a formulated diet. Aquacult. Nutr. 14, 533–543. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00559.x>
- Khosravi, S., Jang, J.W., Rahimnejad, S., Song, J.W., Lee, K.J., 2015. Choline essentiality AND its requirement IN diets FOR juvenil parrot fish (*Oplehnatus fasciatus*). Asian Australas. J. Anim. Sci. 28, 647-653. doi: 10.5713/ajas.14.0532

- Kim, S.K., Pang, Z., Seo, H.C., Cho, Y.R., Samocha, T., Jang, I.K., 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquac. Res. 45, 362-371. doi: 10.1111/are.12319
- Kumar, A., 2009. Comparative efficacy of herbal biocholine and synthetic choline chloride (60%) in commercial broilers. Poult. Technol. 3, 38-40.
- Lebel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C., 1992. Evaluation of the probe 2', 7' – dichlorofluorescin as na indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem. Res. Toxicol. 5, 227-231. doi: 10.1021/tx00026a012
- Leong, S.F., Lai, J.C.K., Lim, L., Clark, J.B., 1981. Energy-metabolising enzymes in brain regions of adult and aging rats. J. Neurochem. 37, 1548-1556. doi: 10.1111/j.1471-4159.1981.tb06326.x
- Luo, Z., Wei, C.-C., Ye, H.-M., Zhao, H.-P., Song, Y.-F., & Wu, K. (2016). Effect of dietary choline levels on growth performance, lipid deposition and metabolism in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol. 202, 1–7. doi:10.1016/j.cbpb.2016.07.005
- Mannervik, B., Guthenberg, C., 1981. Glutathione transferase (human placenta). Method. Enzymol. 77, 231-235. doi: 10.1016/S0076-6879(81)77030-7
- Metwally, M.A.A., 2009. Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). World J. Fish & Marine Sci. 1, 56-64.
- Nelson, D.P., Kiesow, L.A., 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). Anal. Biochem. 49, 474-478. doi: 10.1016/0003-2697(72)90451-4
- Ray, A.J., Lewis, B.L., Browdy, C.L., Leffler, J.W., 2010. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchang, superintensive culture systems. Aquaculture 299, 89-98. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.11.021
- Read, S.M., Northcote, D.H., 1981. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. Anal. Biochem. 116, 53-64. doi: 10.1016/0003-2697(81)90321-3
- Reda, R.M., Mahmoud, R., Selim, K.M., El-Araby, I.e., 2016. Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia,

- Oreochromis niloticus.* Fish Shellfish Immun. 50, 255-262. doi: 10.1016/j.fsi.2016.01.040.
- Shiu, Y.L., Chiu, K.H., Huynh, T.G., Liu, P.C., Liu, C.H., 2017. Plasma immune protein analysis in the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*: Evidence for altered expressions of immune factors associated with a choline-supplemented diet. Fish Shellfish Immunol. 65, 235-243.
- Sokal R., Rohlf, J., 1995. Biometry, the principles and practice of statistics in biological research. W H Freeman, New York.
- Sousa, A.A., Pinho, S.M., Rombenso, A.N., Mello, G.L., Emerenciano, M.G.C., 2019. Pizzeria by-product: A complementary feed source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised in biofloc technology? Aquaculture 501, 359-367. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.11.055
- Turchini, G.M., Trushenski, J.T., Glencross, B.D., 2018. Thoughts for the future of aquaculture nutrition: realigning perspectives to reflect contemporary issues related to judicious use of marine resources in aquafeeds. N. Am. J. Aquacult. 81, 13-39. doi: 10.1002/naaq.10067
- Wallimann, T., Dolder, M., Schlätterer, U., Eder, M., Hornemann, T., O'Gorman, E., Rück, A., Brdiczka, D., 1998. Some new aspects of creatine kinase (ck): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. Biofactors 08, 229-234.
- Wang, H., Chu, W., Das, S.K., Ren, Q., Hasstedt, S.J., Elbein, S.C., 2002. Liver pyruvate kinase polymorphisms are associated with type 2 diabetes in northern European Caucasians. Diabetes 51, 2861-2865. doi: 10.2337/diabetes.51.9.2861
- Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 258, 396-403. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.04.030
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. Meth. Enzymol. 77, 325-333. doi: 10.1016/S0076-6879(81)77046-0
- Wu, P., Jiang, W.-D., Liu, Y., Chen, G.-F., Jiang, J., Li, S.-H., Feng, L., Zhou, X.-Q., 2014. Effect of choline on antioxidant defenses and gene expressions of Nrf2 signaling

- molecule in the spleen and head kidney of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Fish Shellfish Immun. 38, 374–382. doi:10.1016/j.fsi.2014.03.032
- Yilmaz, S., 2019. Effects of dietary caffeic acid supplement on antioxidant, immunological and liver gene expression responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Aeromonas veronii*. Fish Shellfish Immun. 86, 384-392. doi: 10.1016/j.fsi.2018.11.068

Table 1 – Percentage and chemical composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) basal diet used in the experiment.

Basal Feed formulation	
Ingredient	Quantity
Soymeal 45%	30.00
Poultry viscera flour	24.35
Rice meal	18.89
Feather meal	15.00
Bone and meat meal 45%	11.15
Premix-ap ¹	0.40
Antifungal ²	0.10
Antioxidant ³	0.10

Calculated Nutritional Composition	
Nutrients	Quantity
Crude protein	48.00
Fat	7.65
Crude fiber	4.32
Amide	4.05
Calcium	2.50
Total Lysine	2.31
Total Methionine + Cysteine total	1.67
Available Phosphate	1.51
Sodium	0.28

Note: ¹ Vaccinar (Maringá, PR, Brazil); ² Moldzap alltech (São Paulo, Bazil); ³ Banox alltech (São Paulo, Bazil).

Table 2 – Means (\pm SD) of water quality parameters of Nile tilapia supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.

Parameters	Inclusion level				
	0	400	800	1200	Macrocasm
Dissolved oxygen (mg L ⁻¹)	6.50 \pm 0.29	6.52 \pm 0.29	6.57 \pm 0.34	6.55 \pm 0.35	6.48 \pm 0.30
Temperature (°C)	27.53 \pm 1.26	27.62 \pm 1.22	27.60 \pm 1.21	27.63 \pm 1.22	27.66 \pm 1.24
pH	7.06 \pm 0.68	7.09 \pm 0.68	7.09 \pm 0.66	7.07 \pm 0.68	7.10 \pm 0.67
Settleable solids (mL L ⁻¹)	-	-	-	-	19.27 \pm 14.06
Ammonia (mg L ⁻¹)	-	-	-	-	0.21 \pm 0.20
Nitrite (mg L ⁻¹)	-	-	-	-	0.19 \pm 0.16
Nitrate (mg L ⁻¹)	-	-	-	-	0.28 \pm 0.29
Orthophosphate (mg L ⁻¹)	-	-	-	-	25.73 \pm 14.65
Alkalinity (mg L ⁻¹ CaCO ₃)					44.50 \pm 33.54

Table 3 - Zootechnical performance of Nile tilapia supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.

Variable	0	400	800	1200	P-value*
Initial weight (g)	8.03 ± 0.03	8.04 ± 0.04	8.02 ± 0.005	8.02 ± 0.01	0.986
Final weight (g)	29.5 ± 1.5	28.8 ± 1.04	29.9 ± 2.46	29.4 ± 2.33	0.537
Weight gain (g/fish)	21.5 ± 1.39	20.8 ± 0.95	21.8 ± 1.34	21.4 ± 1.98	0.495
BG (g/box)	209.1 ± 18.9	196.4 ± 12.5	206.9 ± 20.0	207.3 ± 21.8	0.384
FC	1.30 ± 0.09	1.36 ± 0.05	1.36 ± 0.28	1.32 ± 0.14	0.621
SGE (% dia ⁻¹)	3.34 ± 0.13	3.27 ± 0.09	3.34 ± 0.26	3.31 ± 0.28	0.453
HIS	2.86 ± 0.62	2.92 ± 0.75	2.95 ± 0.82	2.84 ± 0.87	0.620

BG = Biomass gain; FC = Feed conversion; SGE = Specific growth rate; HSI = Hepatosomatic index. *No significant difference (P >0.05).

Table 4 - Serum biochemistry of Nile tilapia (n=10 per treatment) supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.

Variable	0	400	800	1200	P-value
AST	114.2 ± 29	118.1 ± 36.6	86.5 ± 30.2	90.1 ± 33.7	0.168
ALT	28.0 ± 1.0 ^a	26.0 ± 1.50 ^a	16.5 ± 1.91 ^b	30.20 ± 5.05 ^a	0.001*
Total protein	3.62 ± 0.6 ^b	4.46 ± 0.85 ^a	4.13 ± 0.70 ^{ab}	4.34 ± 0.65 ^a	0.050*
Albumin	0.90 ± 0.35	0.89 ± 0.37	0.96 ± 0.43	0.90 ± 0.34	0.895
Globulin	2.45 ± 0.49 ^b	3.57 ± 0.81 ^a	3.17 ± 0.51 ^{ab}	3.44 ± 0.56 ^a	0.047*
Glucose	54.8 ± 11.5 ^{ab}	59.5 ± 11.7 ^{ab}	47.4 ± 5.76 ^b	64.4 ± 13.2 ^a	0.028*
Cholesterol	86.2 ± 14.7	85.8 ± 13.2	88.4 ± 15.7	89.7 ± 10.6	0.924
Triglycerides	175.4 ± 32.5	178.8 ± 52.6	156.4 ± 64.7	167.5 ± 42.9	0.687

Note: Asterisk (*) indicates difference between groups; the difference being shown by different letters (a, b, c) on the same line ($P < 0.05$). Aspartate aminotransferase (AST: U/L), alanine aminotransferase (ALT: U/L), total protein (g/dL), albumin (g/dL), globulin (g/dL), glucose (mg/dL), cholesterol (mg/dL) and triglycerides (mg/dL).

Table 5 - Enzymes involved in energetic metabolism in the gills of Nile tilapia (n=10 per treatment) supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.

Variable	0	400	800	1200	P-value
CK-MIT	0.65 ± 0.11	0.65 ± 0.11	0.60 ± 0.10	0.61 ± 0.09	0.512
CK-CYT	0.27 ± 0.05 ^b	0.31 ± 0.09 ^{ab}	0.41 ± 0.05 ^a	0.40 ± 0.06 ^a	0.011*
PK	0.11 ± 0.03 ^b	0.15 ± 0.03 ^{ab}	0.17 ± 0.05 ^{ab}	1.20 ± 0.05 ^a	0.001*
AK	0.25 ± 0.04	0.29 ± 0.11	0.31 ± 0.04	0.29 ± 0.04	0.056

Note: Asterisk (*) indicates difference between groups; the difference being shown by different letters (a, b, c) on the same line ($P < 0.05$). Mitochondrial creatine kinase (CK-MIT: pmol of creatine formed/min/mg of protein), cytosolic creatine kinase (CK-CYT: pmol of creatine formed/min/mg of protein), pyruvate kinase (PK: nmol pyruvate formed/min/mg of protein) and adenylate kinase (AK: nmol ATP formed/min/mg of protein).

Table 6 - Oxidant and antioxidant variables in the liver of Nile tilapia (n=10 per treatment) supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.

Variable	0	400	800	1200	P-value
TBARS	7.62 ± 1.81 ^a	5.85 ± 1.36 ^b	5.75 ± 0.98 ^b	5.68 ± 0.96 ^b	0.001*
ROS	1.96 ± 0.38	1.86 ± 0.64	1.76 ± 0.60	1.83 ± 0.51	0.725
GPx	1.01 ± 0.23 ^a	0.99 ± 0.34 ^{ab}	0.75 ± 0.33 ^{ab}	0.60 ± 0.18 ^b	0.050*
GST	4.41 ± 1.47 ^b	8.65 ± 3.14 ^{ab}	12.7 ± 4.67 ^a	12.2 ± 2.76 ^a	0.001*
SOD	3.20 ± 0.50 ^a	3.49 ± 0.98 ^{ab}	2.59 ± 0.31 ^{bc}	2.12 ± 0.22 ^c	0.001*
CAT	0.94 ± 0.25 ^a	0.84 ± 0.28 ^{ab}	0.69 ± 0.15 ^{ab}	0.62 ± 0.14 ^b	0.020*

Note: Asterisk (*) indicates difference between groups; the difference being shown by different letters (a, b, c) on the same line ($P<0.05$). Lipid peroxidation (TBARS: nmol MDA/g of tissue), reactive oxygen species (ROS: U DCF/mg of protein), glutathione peroxidase (GPx: U GPx/mg of protein), glutathione S-transferase (GST: U GST/mg of protein), superoxide dismutase (SOD: U SOD/mg of protein) and catalase (CAT: μ mol/mg of protein/min).

3 CONSIDERAÇOES FINAIS

Ambos os experimentos apresentaram resultados positivos. Experimentos voltados à nutrição de organismos aquáticos são extremamente importantes, visto que o custo com alimentação em uma piscicultura intensiva se mostra como um dos principais entraves para a produção. Portanto, a utilização de ingredientes alternativos, aditivos e suplementos nas dietas são fundamentais para maximizar o desempenho produtivo, a saúde e diminuir custos com alimentação.

O experimento 1 possibilitou a inclusão de 4% de biomassa seca de *A. niger* em dietas para tilápia do Nilo melhorando os parâmetros de desempenho. Além disso, esta biomassa que é normalmente utilizada para a extração de ácido cítrico, uma vez utilizada em dietas para tilápia do Nilo estaria dando um destino correto para este resíduo que é normalmente utilizado como adubo na agricultura, e consequentemente sanando um problema ambiental. Diante disto, novos estudos são importantes visando à utilização desta biomassa seca de fungo em outros segmentos da produção animal.

Em relação ao experimento 2, este possibilitou um maior entendimento da utilização de colina vegetal em dietas para tilápia do Nilo em sistema de bioflocos. Embora não tenha apresentado efeitos sobre o desempenho zootécnico, a melhora nos parâmetros bioquímicos foi extremamente significativa, principalmente comprovando o efeito hepatoprotetor da colina vegetal. De forma geral, as temáticas abordadas na dissertação são inovadoras e os resultados podem contribuir de alguma forma para o crescimento do setor.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-TAWWAB, M.; ABBASS, F. E. Dry whey meal as a protein source in practical diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fingerlings. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 28, p. 276–284, 2016.
- ABIMORAD, E. G.; STRADA, W. L.; SCHALCH, S. H. C.; GARCIA, F.; CASTELLANI, D.; MANZATTO, M. D. R. Silagem de peixe em ração artesanal para tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 5, p. 519-525, 2009.
- ARUETY, T.; BRUNNER, T.; RONEN, Z.; GROSS, A.; SOWERS, K.; ZILBERG, D. Decreasing levels of the fish pathogen *Streptococcus iniae* following inoculation into the sludge digester of a zero-discharge recirculating aquaculture system (RAS). **Aquaculture**, v. 450, p. 335-341, 2016.
- AVNIMELECH, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in quaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, p. 227-235, 1999.
- AZIM, M. E; LITTLE, D. C. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 283, n. 1, p. 29-35, 2008.
- BADIOLA, M.; MENDIOLA, D.; BOSTOCK, J. Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: main issues on management and future challenges. **Aquacultural Engineering**, v. 51, p. 26–35, 2012.
- BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; BALDISSEROTTO, B.; ZIMMER, F.; PAIANO, D.; PETROLI, T. G.; DA SILVA, A. S. Vegetable choline improves growth performance, energetic metabolism, and antioxidant capacity of fingerling Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 501, p. 224–229, 2019.
- BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; SANTOS, R. C. V.; STEFANI, L. M.; MOREIRA, K. L. S.; DA VEIGA, M. L.; ROCHA, M. I. U. M.; BALDISSEROTTO, B. *Pseudomonas aeruginosa* strain PA01 impairs enzymes of the phosphotransfer network in the gills of *Rhamdia quelen*. **Veterinary Microbiology**, v. 201, p. 121–125. 2017.
- BEVERIDGE, M. C.; MCANDREW, B. Tilapias: biology and exploitation. v. 25. Springer Science & Business Media, 2012.

BINELLI, A.; COGNI, D. Multi-biomarker approach to investigate the state of contamination of the R. Lambro/R. Po confluence (Italy) by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Chemosphere**, v. 79, p. 518-528, 2010.

BRITO, C.; DO VALLE, B.; INTERAMINENSE, J.; PEIXOTO, S.; LIMA-FILHO, J. V.; SOARES, R. (2015). Microbiological quality of *Litopenaeus vannamei* culture using conventional and biofloc systems. **Aquaculture Research**, v. 47, p. 3098–3108, 2015.

CAMPAGNOLO, R.; FRECCIA, A.; BERGMANN, R. R.; MEURER, F.; BOMBARDELLI, R. A. Óleos essenciais na alimentação de alevinos de tilápis do Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 14, 2013.

CHEN, Y.; NIELSEN, J. Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. **Current Opinion Biotechnology**, v. 37, p. 165–172, 2016.

CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W.; Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. **Aquaculture**, p. 356–357, 2012.

CYRINO, J. E. P.; BICUDO, A. J. A.; SADO, R. Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J. K. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 68-87, 2010.

DE FRANCESCHI, I.D., RIEGER, E., VARGAS, A.P., ROJAS, D.B., CAMPOS, A.G., RECH, V.C. Effect of leucine administration to female rats during pregnancy and lactation on oxidative stress and enzymes activities of phosphoryltransfer network in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. **Neurochem. Res.**, v. 38, p. 632–643. 2013.

DE PASSOS, F. V.; JÚNIOR ODONÉ S. Poluição ambiental por espécies exóticas invasoras. **Direito e Ambiente**, p. 263-285, 2015.

DEVIC, E.; LESCHEN, W.; MURRAY, F.; LITTLE, D. C. Growth performance, feed utilization and body composition of advanced nursing Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae meal. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, p. 416–423, 2017.

DEVLIN, T. M. Manual de bioquímica com correlações químicas. São Paulo: Edgard Blucher, 2000.

DURIGON, E. G.; EMERENCIANO, M. G. C.; SOUSA, A. A.; HONORATO, L. ; COUTINHO, C. R. ; MELLO, G. L. Inclusão de *Aspergillus niger* em rações comerciais extrusadas para juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 51, p. 57, 2018.

EKASARI, J. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. **Aquaculture**, v. 426-427, p. 105-111, 2014.

EL-SAYED, A. F. M. Alternative dietary protein sources for farmed tilápia, *Oreochromis spp.* **Aquaculture**, v. 179, p. 149-168, 1999.

EL-SAYED, T.; EL-SAYED, A. M.; EISSL, M. A. R.; HANAFI, H. M. Effects of dietary Biogen and sodium butyrate on hematological parameters, immune response, and histological characteristics of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. **Aquaculture International**, v. 26, p. 139–150, 2017.

EMERENCIANO, M.; CUZON, G.; GOGUENHEIM, J.; GAXIOLA, G. Floc contribution on spawning performance of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Aquaculture Research**, v. 44, n. 1, p. 75-85, 2012.

EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G.; CUZON, G. Biofloc technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. **Biomass now: cultivation and utilization**. InTech, Rijeka, Croatia, p. 301-328, 2013.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2016. Rome, p. 2, 2016.

FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2018. Rome, 2018.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 43, 1997.

FILHO, D. F. L.; PEREIRA, D. C. O.; POSSAMAI, E. Dietary supplementation of alternative methionine and choline sources in the organic broiler production in Brazil. **Braz. J. Poul. Sci.**, v. 17, p. 489-496, 2015.

FITZSIMMONS, K., MARTINEZ-GARCIA, R., GONZALES-ALANIS, P. Why tilapia is becoming the most important food fish on the planet. In Proceedings of the ninth International Symposium in Tilapia in Aquaculture, Shanghai, China. 2011.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**, v. 199, p. 197-227, 2001.

FRECCIA, A.; MEURER, E. S.; FILHO, J. C.; JERÔNIMO, G. T.; EMERENCIANO M. G. C. Farinha de inseto em dietas de alevinos de tilápis. **Archivos de Zootecnia**, v. 65, 2016.

GATLIN, D. M.; BARROWS, F. T.; BROWN, P.; DABROWSKI, K.; GAYLORD, G.; HARDY, R.; HERMAN, E.; HU, G.; KROGDAHL, A.; NELSON, R.; OVERTURF, K.; RUST, M.; SEALY, W.; SKONBERG, D.; SOUZA, E. J.; STONE, D.; WILSON, R.; WURTELE, E. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. **Aquaculture Research**, v. 38, p. 551-579, 2007.

GERLAND, P.; RAFTERY, A. E.; IKOVA, H. S.; LI, N.; GU, D.; SPOORENBERG, T.; LEONTINE, A.; FOSDICK, B. K.; CHUNN, J.; LALIC, N.; BAY, G.; BUETTNER, T.; HEILIG, G. K.; WILMOTH, J. World population stabilization unlikely this century, **Science**, v. 346, p. 234-237, 2014.

GOYAL, M. M.; BASAK, A. Human catalase: looking for complete identity. **Protein cell**, v. 1, n. 10, p. 888-897, 2010.

GUERDAT, T. C.; LOSORDO, T. M.; CLASSEN, J. J.; OSBORNE, J.A.; DELONG, D.P. An evaluation of commercially available biological filters for recirculating aquaculture systems. **Aquacultural Engineering**, v. 42, p. 38-49, 2010.

HAI, N. V. The use of probiotics in aquaculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, p. 917-935, 2016.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 42, p. 231-55, 2004.

HAN, D.; SHAN, X.; ZHANG, W.; CHEN, Y.; WANG, Q.; LI, Z.; DE SILVA, S. S. A revisit to fishmeal usage and associated consequences in Chinese aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, p. 493–507, 2016.

HARGREAVES, J. A. Biofloc production systems for aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center, 2013.

HASSAAN, M. S.; MOHAMMADY, E. Y.; SOAUDY, M. R.; EL-GARHY, H. S.; MUKHTAR, M. M.; MOHAMED, S. A.; EL-HAROUN, E. R. Effect of *Silybum marianum* seeds as a feed additive on growth performance, serum biochemical indices, antioxidant status, and gene expression of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fingerlings. **Aquaculture**, v. 509, p. 178-187, 2019.

HAYES J. D.; MCLELLAN, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. **Free Radical Research**, v. 31, p. 273– 300, 1999.

HOSEINFAR, S. H.; RINGO, E.; MASOULEH, A. S.; ESTEBAN, M. A. Probiotic, prebiotic and symbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 8, p. 89-102, 2016.

IBGE. Pesquisa pecuária municipal. Brasília: IBGE 2015. v. 43. 2015.

JIANG, W.; TIAN, X.; FANG, Z.; LI, L.; DONG, S.; LI, H.; ZHAO, K. Metabolic responses in the gills of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) exposed to salinity stress using NMR-based metabolomics. **Science of The Total Environment**, v. 653, p. 465-474, 2018.

LI, P.; MAI, K.; TRUSHENSI, J.; WU, G. New developments in fish amino acid nutrition: Towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino Acids**, v. 37, p. 43-53, 2009.

LIMA, M. R.; LUDKE, M. C. M. M.; NETO, F. F.P.; PINTO, B. W. C.; TORRES, T. R.; SOUZA, E. J. O. de. Farelo de resíduo de manga para tilápia do Nilo. **Animal Sciences**, v. 33, 2011.

LIU, X.; YE, J.; WANG, K.; KONG, J.; YANG, W.; ZHOU, L. Partial replacement of fish meal with peanut meal in practical diets for the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 745– 755, 2012.

LOSORDO, T. M.; WESTERMAN, P. W. An Analysis of Biological, Economic, and Engineering Factors Affecting the Cost of Fish Production in Recirculating Aquaculture Systems. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 25, p. 193–203. 1994.

LOURES, B. T. R. R.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L.; MOREIRA, H. L. M.; SUSSEL, F. R.; POCH, J. A.; CAVICHOLO, F. Manejo alimentar de alevinos de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), associado às variáveis físico-químicas e biológicas. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 23, n. 4, p. 877- 883, 2001.

MAICÁ, P.F.; BORBA, M. R.; WASIELESKY, W. Effect of low salinity on microbial floc composition and performance of *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles reared in a zero-water-exchange super-intensive system. **Aquaculture Research**, 2011.

MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.; EMERENCIANO, M.; MIRANDA-BAEZA, A.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. **Reviews in Aquaculture**, v. 7, p. 131–148, 2014.

MARTINS, C. I. M.; EDING, E. H.; VERDEGEM, M. C. J.; HEINSBROEK, L. T. N.; SCHNEIDER, O.; BLANCHETON, J. P.; ROQUED'ORBCASTEL, E; VERRETH, J. A. J. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: a perspective on environmental sustainability. **Aquacultural Engineering**, v. 43, p. 83–93, 2010.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; WILSON, R. B. Utilização de levedura spray dried na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Biological Sciences**, v. 22, 2000.

Ministério da Pesca e da Aquicultura. Seção Aquicultura/potencial-brasileiro. Brasília, 2014. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/aquicultura/potencialbrasileiro>

NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of biochemistry, 5th Ed. W.H. Freeman and Company, New York. 2008.

Peixe BR. Anuário peixe BR da piscicultura 2018. 2018.

PFEIFFER, T. J.; WILLS, P. S. Evaluation of three types of structured floating plastic media in moving bed biofilters for total ammonia nitrogen removal in a low salinity hatchery recirculating aquaculture system. **Aquacultural Engineering**, v. 45, p. 51–59, 2011.

REDA, R. M.; MAHMOUD, R.; SELIM, K. M.; EL-ARABY, I. E. Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 50, p. 255–262, 2016.

RIBEIRO, R. P. Espécies exóticas. Fundamentos da moderna aquicultura. Canoas: Ulbra p. 91-121. 2001.

ROCHA C. M. C.; RESENDE, E. K.; ROUTLEDGE, A. B.; LUNDSTEDT, L. M. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Revista Pesq. Agropec. Bras**, v. 48, n. 8, 2013.

SALVADOR, R; MÜLLER, E. E.; LEONHARDT, J. H.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J. A.; DE FREITAS, J. C.; & MORENO, A. M. Isolamento de Streptococcus spp de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água de tanques rede na Região Norte do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: ciências agrárias**, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2003.

SANTOS, E. L.; LUDKE, M. C. M. M.; BARBOSA, J. M.; RABELLO, C. B.; LUDKE, J. V.; WINTERLI, W. M. C.; SILVA, E. G. Níveis de farelo de coco em rações para alevinos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, 2009.

SCHNEIDER, O; BLANCHETON, J. P.; VARADI, L.; EDING, E. H.; VERRETH, J. A. J. Cost price and production strategies in European recirculation systems, linking tradition and technology highest quality for the consumer. WAS, Fizzenze, Italy, 2006.

SELIM, K. M.; REDA, R. M. Improvement of immunity and disease resistance in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by dietary supplementation with *Bacillus amyloliquefaciens*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 44, p. 496–503, 2015.

SONODA, D. Y.; SHIROTA, R.; SCORVO FILHO, J. D.; CYRINO, J. E. P. Desequilíbrio entre a oferta e a demanda brasileira por pescados em 2002/2003 e 2008/2009. **Revista iPecege**, v.1, n. 1, p. 1-13, 2015.

SOUZA, A. A.; PINHO, S. M.; ROMBENSO, A. N.; MELLO, G. L.; EMERENCIANO, M.G. C. Pizzeria by-product: A complementary feed source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised in biofloc technology? **Aquaculture**, v. 501, p. 359-367, 2019.

SUSSEL, F. R. Tilapicultura no Brasil e entraves na produção. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Pirassununga, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, v. 8510, 2013.

TAL, Y.; SCHREIER, H.; SOWERS, K. Environmentally sustainable land-based marine aquaculture. **Aquaculture**, v. 286, p. 28-35, 2009.

TIMMONS, M. B.; EBELING, J. M. Recirculating Aquaculture Systems, 3^aed, Northeastern Regional Aquaculture Center, New York, 2007.

TURCHINI, G. M.; TRUSHENSKI, J. T.; GLENROSS, B. D. Thoughts for the future of aquaculture nutrition: realigning perspectives to reflect contemporary issues related to judicious use of marine resources in aquafeeds. **North American Journal of Aquaculture**, 2018.

WANG, L.; CAO, Z. L.; HOU, L.; YIN, L. H.; WANG, D. W.; GAO, Q. The opposite roles of **agdA** and **glaA** on citric acid production in *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5791–5803, 2016.

WASIELESKY, W, H; ATWOOD, A.; STOKES & CL BROWDY. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for White shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 258, p. 396-403, 2006.

WILD, M. B.; MARENCONI, N. G.; VIVIAN, M. M. P. S. V.; TSUTSUMI, C. Y.; MOURA M. C. Probiótico dietético em sistemas de produção de tilápia do Nilo: efeitos sobre o crescimento, balanço de N e P, retenção de nutrientes e viabilidade econômica, Semina: **Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 477-489, 2014.

YAMAMOTO, F. Y.; SUTILI, F. J.; HUME, M.; GATLIN, D. M. The effect of β-1,3-glucan derived from *Euglena gracilis* (AlgamuneTM) on the innate immunological responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Fish Diseases**, v. 41, p. 1579–1588, 2018.

ZEISEL, S. H.; DACOSTA, K. A., YOUSSEF, M.; HENSEY, S. Conversion of dietary choline to trimethylamine and dimethylamine in rats: dose-response relationship. **Journal Nutrition.**, p. 119:800-804, 1989.

ZHANG, C.; LI, F. C. Effect of dietary methionine on growth performance and insulin-like growth factor-1 mRNA expression of growing meat rabbits. **J. anim. Physiol. Anim. Nutr.**, v. 94, p. 803-809, 2010.

ANEXO I



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Uso de biomassa de levedura íntegra em rações comerciais extrusadas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)", protocolada sob o CEUA nº 1429290518 (ID 000664), sob a responsabilidade de **Diogo Luiz de Alcantara Lopes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 11/07/2018.

We certify that the proposal "Use of yeast biomass in extruded commercial diets for Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)", utilizing 784 Fishes (784 males), protocol number CEUA 1429290518 (ID 000664), under the responsibility of **Diogo Luiz de Alcantara Lopes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 07/11/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de **07/2018** a **12/2019** Área: **Zootecnia**

Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais		
Espécie:	Peixes	sexo:	Machos
Linhagem:	Oreochromis niloticus		
	idade:	1 a 6 meses	N: 784
	Peso:	1 a 100 g	

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Aquacultura Oeste (LAQUA - Oeste) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/OESTE), localizado no município de Laguna, Santa Catarina, Brasil. Os peixes utilizados nos experimentos serão obtidos de uma piscicultura comercial da região e transportados em uma caixa de transporte específica para peixes (Transfish) com adição de oxigênio puro. Após isso, os peixes serão aclimatados e mantidos em caixas de polipropileno de 1000 L até o início dos experimentos

Lages, 11 de julho de 2019

Marcia Regina Pfuetzenreiter
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

ANEXO II



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Uso de biocolina como promotor de crescimento para tilápia (*Oreochromis niloticus*) em sistema de biofloc ", protocolada sob o CEUA nº 9595130319 (ID 000841), sob a responsabilidade de **Aleksandro Schafer da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 15/03/2019.

We certify that the proposal "Use of biocoline as a growth promoter for tilapia (*Oreochromis niloticus*) in a biofloc system", utilizing 240 Fishes (males or females), protocol number CEUA 9595130319 (ID 000841), under the responsibility of **Aleksandro Schafer da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 03/15/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [04/2019](#) a [07/2019](#) Área: [Zootecnia](#)

Origem:	Animais de proprietários	sexos:	Machos ou Fêmeas	idade:	30 a 45 dias	N:	240
Espécie:	Peixes					Peso:	6 a 8 g
Linhagem:	Tilapias						

Local do experimento: Os animais utilizados neste experimento serão comprados de uma piscicultura. A duração do experimento será de 04/2019 a 07/2019. O experimento será conduzido no galpão de piscicultura da UDESC Oeste.

Lages, 10 de julho de 2019

Marcia Regina Pfuetzenreiter

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Ubirajara Mael da Costa

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina