



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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ÁCIDO CÍTRICO NA DIETA PARA ALEVINOS  
DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)  
EM SISTEMA DE BIOFLOCOS MELHORA O  
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E STATUS  
ANTIOXIDANTE**

**LEONARDO DE DEUS DA SILVA**

CHAPECÓ, 2021

**LEONARDO DE DEUS DA SILVA**

**ÁCIDO CÍTRICO NA DIETA PARA ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO  
(*Oreochromis niloticus*) EM SISTEMA DE BIOFLOCOS MELHORA O  
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E STATUS ANTIOXIDANTE**

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: Diogo Luiz de Alcantara Lopes**  
Co-orientador(s): Aline Zampar

CHAPECÓ, SC, Brasil  
2021

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

Silva, Leonardo de Deus da  
Ácido cítrico na dieta para alevinos de Tilápia do nilo  
(*Oreochromis niloticus*) em sistema de bioflocos melhora o  
desempenho zootécnico e status antioxidante / Leonardo de Deus da  
Silva. -- 2021.

53 p.

Orientador: Diogo Lopes

Coorientadora: Aline Zampar

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de  
Pós-Graduação, Chapecó, 2021.

1. Aditivo. 2. Alimento. 3. Biofoco. 4. Peixe. I. Lopes, Diogo.  
II. Zampar, Aline. III. Universidade do Estado de Santa Catarina,  
Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação  
. IV. Título.

Chapecó, SC, Brasil

2021

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

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

**ÁCIDO CÍTRICO NA DIETA PARA ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO  
(*Oreochromis niloticus*) EM SISTEMA DE BIOFLOCOS MELHORA O  
DESEMPENHO ZOOTÉCNICO E STATUS ANTIOXIDANTE**

Elaborada por  
**Leonardo de Deus da Silva**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Zootecnia**

Comissão Examinadora:



(Presidente/Orientador Diogo Luiz de Alcântara Lopes) (UDESC)



Membro interno ou externo PPGZOO Aleksandro S. da Silva (UDESC)



Membro Externo PPGZOO Sabrina M. Suita (FAPESP)

Chapecó, 26 de fevereiro de 2021.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por proporcionar a vida sempre guiando meu caminho e escolhas.

Agradeço à minha mãe Elizete, ao meu Pai Miguel os quais me fazem acreditar que sonhos aliados à determinação podem se realizar, por mais difíceis que possam parecer.

A minha esposa Fabiana e meu filho Heitor, pela paciência e apoio, incentivando-me a sempre querer mais.

Obrigado ao meu orientador, o Prof. Dr. Diogo Luiz de Alcantara Lopes pelo auxílio, pela paciência e pela dedicação conjunta nesse trabalho, e ainda, por compartilhar seus conhecimentos e inspirar-me a seguir os estudos.

Agradeço ao grupo do laboratório Laqua Oeste pela ajuda no desenvolvimento das pesquisas.

Obrigado a todos os meus professores por compartilharem seus conhecimentos com tanta boa vontade, com tanto desejo de que seus conhecimentos fossem transferidos a mim, obrigado a todos, por tudo!

Agradecer a todas as pessoas, que de uma forma ou outra, fizeram parte da construção desse trabalho e também de quem sou.

## RESUMO

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

### **ÁCIDO CÍTRICO NA DIETA PARA ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) EM SISTEMA DE BIOFLOCOS MELHORA O DESEMPENHO ZOOTECNICO E STATUS ANTIOXIDANTE**

AUTOR: Leonardo de Deus da Silva

ORIENTADOR(A): Diogo Luiz de Alcântara Alcantara Lopes

Chapecó, 26 de fevereiro de 2021

A necessidade de produzir mais em espaços menores, tem feito a tecnologia de bioflocos (BFT) ser largamente aplicado na aquicultura por se tratar de um sistema intensivo, porém sustentável. A técnica é baseada no crescimento de microrganismos que tem função na manutenção da qualidade de água, além de poder servir com fonte nutricional para diversas espécies de peixes e camarões. Neste sentido, um sistema sustentável aliado a uma dieta com inclusão de um aditivo com características acidificantes a nível intestinal pode causar uma melhora na utilização dos nutrientes, elevando o desempenho zootécnico e a saúde dos animais. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho zootécnico de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) linhagem GIFT, alimentadas com diferentes níveis de inclusão de ácido cítrico na dieta, controle (A) 0; (B) 50; (C) 100; (D) 150; (E) 200 mg/Kg de ração totalizando 5 tratamentos com 4 repetições cada. O experimento teve duração de 45 dias e foi utilizado 200 alevinos com peso inicial de  $1,76 \pm 0,11$  divididos aleatoriamente em 20 unidades experimentais, foram avaliados em um delineamento inteiramente casualizado. Os resultados obtidos apresentaram diferença significativa para o peso final, onde o grupo que não recebeu o aditivo na dieta teve o pior desempenho e os demais que receberam tiveram resultados similares. Foi avaliado também o peso de fígado, intestino e índice hepático, intestinal que não tiveram resultados significativamente diferentes entre os grupos testados, o que indica que por mais que o ácido cítrico seja benéfico para o desenvolvimento de tilápias, ainda assim não estimula o desenvolvimento de órgãos no processo de digestão. A análise do sangue revelou uma diferença significativa para parâmetros de avaliação do status antioxidante, onde espécies reativas ao oxigênio (ROS) teve o grupo controle com a maior média apresentada, o que pode ser considerado um indicador de maior número de radicais livres nos animais deste grupo, para os demais grupos testados os resultados foram semelhantes entre si. O resultado da enzima Glutathione S-Transferase (GST) que tem entre suas funções desintoxicar o fígado, teve o grupo D com a maior média exposta, e os demais grupos com resultados semelhantes. Já para os tióis não proteicos (NPSH) o grupo D teve média superior aos grupos A e B, e semelhante aos grupos C e E o que significa que estes grupos tiveram um estímulo maior de antioxidante NPSH, que é benéfico e pode contribuir para um desenvolvimento melhor e mais saudável do animal. Visto que a busca por ingredientes alternativos e aditivos em dietas para organismos aquáticos é de extrema importância para a aquicultura, o experimento demonstrou resultados promissor e que podem contribuir para a nutrição de tilápias em sistemas fechados.

**Palavras-chave:** Aditivo, alimento, biofoco, peixe.

**ABSTRACT**

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina**ÁCIDO CÍTRICO NA DIETA PARA ALEVINOS DE TILÁPIA DO NILO  
(*Oreochromis niloticus*) EM SISTEMA DE BIOFLOCOS MELHORA O  
DESEMPENHO ZOOTECNICO E STATUS ANTIOXIDANTE**

AUTHOR: Leonardo de Deus da Silva

ADVISER: Diogo Luiz de Alcantara Lopes

Chapecó, 26 de fevereiro de 2021.

The need to produce more in smaller spaces has made biofloc technology (BFT) widely applied in aquaculture because it is an intensive but sustainable system. The technique is based on the growth of microorganisms that has a role in maintaining water quality, besides being able to serve as a nutritional source for several species of fish and shrimp. In this sense, a sustainable system combined with a diet with the inclusion of an additive with acidifying characteristics at the intestinal level can cause an eleven in the use of nutrients, increasing zootechnical performance and animal health. Thus, the objective of this work was to evaluate the zootechnical performance of tilapia of the nilo (*Oreochromis niloticus*) GIFT scan, fed with different levels of citric acid inclusion in the diet, control (A) 0; (B) 50; (C) 100; (D) 150; (E) 200 mg/kg of feed totaling 5 treatments with 4 replicates each. The experiment lasted 45 days and used 200 fingerlings with an initial weight of  $1.76 \pm 0.11$  randomly divided into 20 experimental units, which were evaluated in a completely randomized design. The results obtained showed a significant difference for the final weight, where the group that did not receive the additive in the diet had the worst performance and the others who received them had similar results. It was also evaluated the weight of liver, intestine, and liver index, intestinal that did not have significantly different results between the groups tested, which indicates that although citric acid is beneficial for the development of tilapia, it does not stimulate the development of organs in the digestion process. Blood analysis revealed a significant difference for antioxidant status assessment parameters, where oxygen-reactive species (ROS) had the control group with the highest mean presented, which can be considered an indicator of a higher number of free radicals in the animals of this group, for the other groups tested the results were similar to each other. The result of the enzyme Glutathione S-Transferase (GST) that has among its functions detoxifying the liver, had group D with the highest average exposed, and the other groups with similar results. For non-protein tics (SPL) group D had a higher average than groups A and B, and similar to groups C and E, which means that these groups had a higher stimulation of antioxidant SPL, which is beneficial and can contribute to the better and healthier development of the animal. Since the search for alternative ingredients and additives in diets for aquatic organisms is extremely important for aquaculture, the experiment demonstrated promising results that can contribute to the nutrition of tilapia in closed systems.

**Keywords:** Additive, biofloc, fish, food.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Dados da captura e produção de peixes no mundo.....	12
Figura 2 - Consumo de peixes no mundo.....	12
Figura 3 - Ranking global de produção de tilápia (toneladas).....	13
Figura 4 – Processamento de peixes produzidos no Brasil para exportação.....	14
Figura 5 - Sistema de aquaponia. ....	16
Figura 6 – Bioflocos estável proveniente do experimento realizado.....	18
Figura 7 - Fórmula estrutural do ácido cítrico.....	19

**LISTA DE TABELA****CAPÍTULO II – MANUSCRITO 1**

Tabela 1 - Níveis de garantia da ração comercial usada como base para inclusão dos níveis de ácido cítrico. ....	44
Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros de qualidade de água de tilápias alimentadas com diferentes níveis de ácido cítrico produzidas em sistema de bioflocos. ....	45
Tabela 3 - Parâmetros de desempenho zootécnico de tilápias alimentadas com diferentes níveis de ácido cítrico produzidas em sistema de bioflocos. ....	46
Tabela 4 - Parâmetros de desempenho de tilápias alimentadas com diferentes níveis de ácido cítrico na dieta produzidas em sistema de bioflocos. ....	47
Tabela 5 - Análise do plasma sanguíneo de tilápias alimentadas com diferentes níveis de inclusão de ácido cítrico na dieta produzidas em sistema de bioflocos. ....	48

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	11
1.1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1.1 AQUICULTURA .....	11
1.1.2 PRODUÇÃO DE TILÁPIA NO BRASIL .....	14
1.1.3 TECNOLOGIA DE BIOFLOCOS ( <i>BFT</i> ) .....	15
1.1.4 NUTRIÇÃO DE TILÁPIA.....	18
1.1.5 ÁCIDO CÍTRICO .....	19
1.1.6 STATUS ANTIOXIDANTE.....	20
1.2 OBJETIVOS.....	21
1.2.1 Objetivo Geral .....	21
1.2.2 Objetivos Específicos .....	21
2 - CAPÍTULO II .....	22
1 MANUSCRITO.....	22
2.1 MANUSCRITO 1.....	23
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	49
4. REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO.....	50

## **CAPÍTULO I**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

#### **1.1 INTRODUÇÃO**

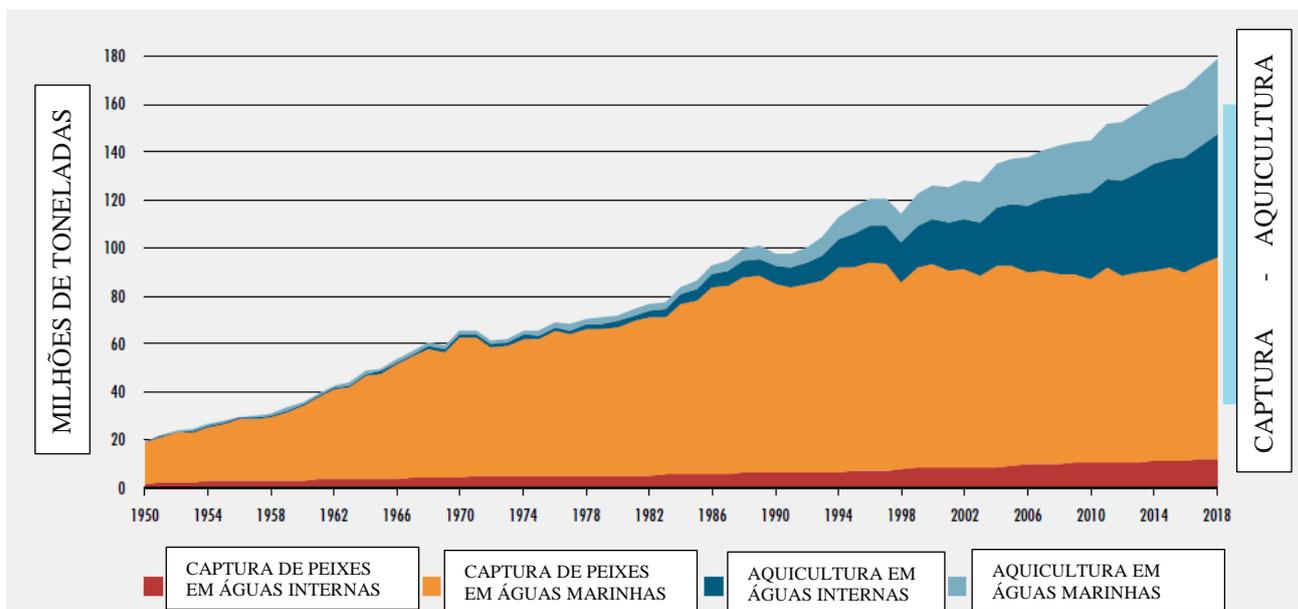
##### **1.1.1 AQUICULTURA**

A aquicultura é a criação de organismos que vivem em ambientes aquáticos, que na maioria das vezes são espaços confinados e controlados. Por outro lado, a pesca é a captura de peixes em ambiente natural. As principais diferenças entre as duas atividades é a qualidade, segurança alimentar, e o principal argumento a sustentabilidade e planejamento que colocam a aquicultura como atividade mais correta para produção de peixes.

Segundo o relatório da PEIXE BR 2019, o brasileiro consome menos de 10 kg de peixes por ano. Abaixo do que é recomendado pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), que é de 12 kg/hab/ano, porém a média mundial é de 20,5 kg/hab/ano. Diante deste cenário, a expansão da aquicultura é fundamental para continuar a contribuir com a oferta de pescado no mundo. De acordo com a FAO 2019, a aquicultura é a mais rápida das atividades agropecuárias em termos de resultados produtivos e uma das poucas capazes de responder com folga ao crescimento populacional, o que pode contribuir para o combate à fome em todo o mundo.

O principal fornecedor mundial de proteína de origem animal aquática, até meados dos anos 90, era a indústria pesqueira e a partir dos anos 2000, a aquicultura começou a contribuir significativamente com o fornecimento de pescados. Isso ocorreu devido à sobre exploração de algumas espécies, que teve como contribuição a estagnação dos estoques naturais e o aumento do consumo de pescadas pela população. A produção mundial de pescado chegou a 179 milhões de toneladas em 2018, que foram capturadas ou despescadas e fizeram a produção mundial de pescado atingir um recorde histórico, a pesca (continental e marítima) capturou 96,4 milhões de toneladas o que demonstra que o crescimento da captura em águas de interiores e em águas marinhas em geral está em estagnação, já a aquicultura cresceu 25% entre 2008 e 2017 e foi responsável por 82,1 milhões de toneladas (figura 1), 4 milhões de toneladas de peixes gerados a mais do que no ano anterior (FAO 2020). Se este crescimento continuar nos próximos anos ocorrerá a inversão de liderança, sendo a produção peixes de cultivo superior aos de captura no patamar global (PEIXE BR 2019).

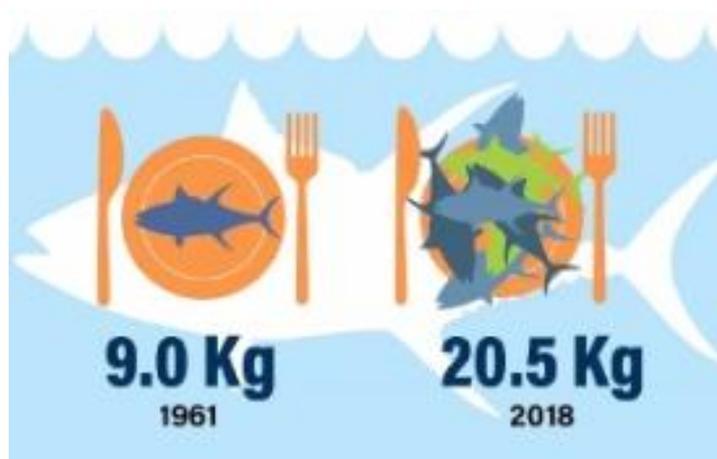
Figura 1 - Dados da captura e produção de peixes no mundo.



Fonte: FAO (2020)

Em 1961, a população mundial consumia 9 kg per capita/ano, mas em 2018 consumo humano de pescado chegou a 156 toneladas outro recorde apontado pela FAO (2020) e passou para 20,5 kg per capita anuais, principalmente em razão da expansão da oferta de produtos aquícolas (Figura 2).

Figura 2 - Consumo de peixes no mundo.



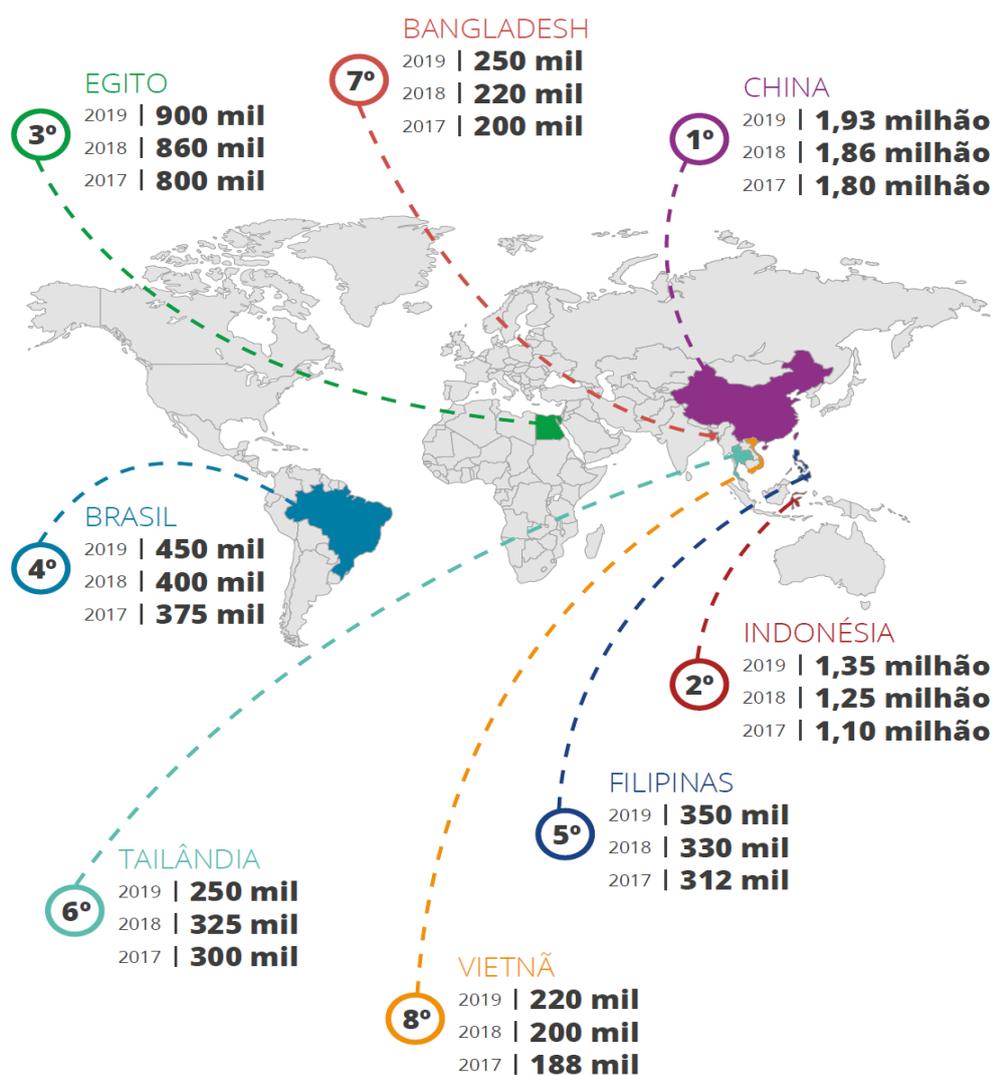
Fonte: FAO (2020)

No Brasil a atividade com maior destaque é a piscicultura continental, que representa a maior parcela de produção de pescados nacional. Estima-se que em 2018 tenham sido produzidos aproximadamente 722.560 toneladas de peixes de água doce, equivalendo a 4,5 %

a mais que o produzido em 2017 (691.700 toneladas) (PEIXE BR, 2019). Vale ressaltar que entre esse volume produzido, 400.280 toneladas foram provenientes do cultivo de tilápia, o que representou um crescimento de 11,9% em relação ao ano anterior, cuja produção ficou estimada em 357.639 toneladas (PEIXE BR, 2018).

Segundo dados da FAO 2020, a espécie mais cultivada no mundo é a tilápia, somente em 2018 foram produzidos quase 6 milhões de toneladas (Figura 3). O Brasil produziu 400.000 toneladas contribuindo com 6,67 % do total da produção global, resultado que colocou o país na 4ª posição entre os maiores produtores de tilápia no cenário global, ficando atrás apenas da China que produziu 1,86 milhão de toneladas, Indonésia com produção de 1,25 milhão de toneladas e o Egito com produção de 860.000 toneladas (PEIXE BR 2020).

Figura 3 - Ranking global de produção de tilápia (toneladas).



Fonte: FAO (2019)

### 1.1.2 PRODUÇÃO DE TILÁPIA NO BRASIL

A tilápia é a espécie de peixe mais produzida no Brasil já há alguns anos, devido suas características biológicas como fácil adaptação, rápido crescimento, rusticidade e boa conversão alimentar. Entre as linhagens utilizadas a GIFT é a mais cultivada no Brasil, pois apresenta bons resultados de desempenho zootécnico, alta rusticidade, fácil domesticação, ciclo de cultivo considerado curto, domínio da reprodução e rendimentos de filé com quase 90% de aproveitamento, além de ter a qualidade da carne com reconhecida aceitação pelo consumidor, e um mercado consolidado e em crescente expansão (WATANABE et al., 2012).

Segundo dados da Secretária de Comércio Exterior SECEX (2019) o Brasil exportou 32.417 toneladas de peixes frescos, refrigerados e congelados no ano de 2018 que gerou uma renda de US\$ 136 milhões (FIGURA 4). A principal espécie cultivada para exportação foi a tilápia com mais de 700 toneladas enviadas para Estados Unidos em 2018, gerou uma renda de cerca de US\$ 5,5 milhões (PEIXE BR 2019).

Figura 4 – Processamento de peixes produzidos no Brasil para exportação.



Fonte: Anuário Peixe BR (2019)

O cultivo da tilápia no Brasil pode ser considerado eficiente, contudo, existem vários desafios a serem cumpridos para que o crescimento dessa atividade continue em ascensão. A intensificação dos sistemas de produção é uma boa alternativa para elevar as taxas de produtividade, porém há necessidade de estabelecer protocolos de boas práticas de manejo, adequação e balanceamento de dietas, disponibilidade de alevinos de boa qualidade e adequação a diversidade climática do Brasil, levando-se em consideração adaptações às regiões de clima temperado, a fim de minimizar o efeito de baixas temperaturas sobre o surgimento de

enfermidades e desempenho na produção dos organismos produzidos, causando prejuízos econômicos ao produtor (KUBITZA, 2008).

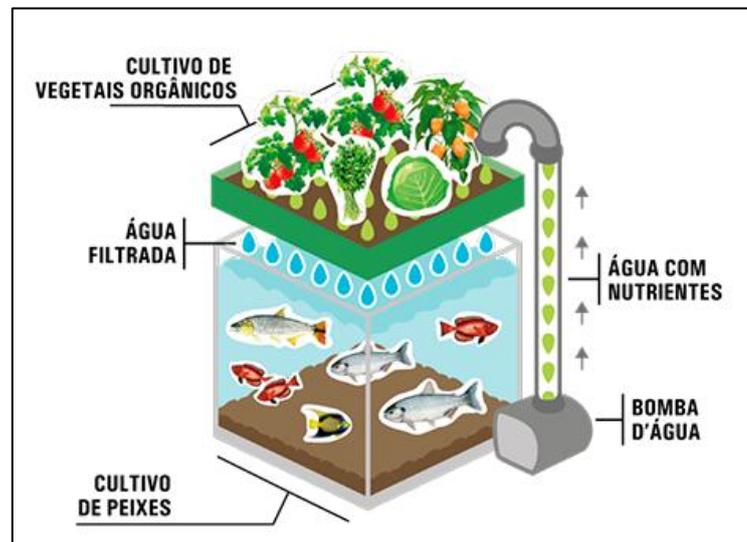
A alta produção da espécie é fortemente ligada a excelente combinação dos aspectos fisiológicos, que são favoráveis à sua adaptação e seu excelente desempenho em diversos sistemas de cultivo (MOREIRA et al., 2001). No Brasil, a tilápia do Nilo é comumente produzida em sistema semi-intensivo (viveiros escavados) e sistema intensivo (tanques-rede), onde ambos os sistemas são responsáveis pelo crescimento expressivo da atividade nos últimos anos (FAO, 2019). Os sistemas tradicionais como extensivo e semi intensivo, 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 reduzir o descarte ou melhorar a qualidade de água a ser descartada (ABIMORAD et al., 2009; FREITAS; ODONÉ, 2015). Ao mesmo tempo, as altas densidades utilizadas em tanques-rede aumentam consideravelmente os surtos de patógenos, resultando em perdas econômicas aos produtores (SALVADOR et al., 2003; CYRINO et al., 2010). Nessa situação, se faz necessário uso de sistemas de produção fechado, mais eficientes e que ofereça maior controle e segurança na produção. Um exemplo que vem dando bons resultados é o uso da tecnologia de bioflocos (*BFT*), que pode oferecer condições para aumento das taxas de produtividade, mantendo a qualidade da água, diminuindo os possíveis impactos inerentes à atividade aquícola (WILD et al., 2014).

### 1.1.3 TECNOLOGIA DE BIOFLOCOS (*BFT*)

A aplicação da tecnologia Bioflocos (*BFT*) oferece benefícios na melhoria da produção aquícola que podem contribuir para a consecução dos objetivos de desenvolvimento sustentável. O emprego desta tecnologia pode resultar em maior produtividade com menos impacto ao meio ambiente, devido a biosegurança que o ambiente oferece aos animais, menor consumo de água de reposição e ao aproveitamento dos flocos como alimento secundário da espécie cultivada. Além disso, sistemas de bioflocos podem ser desenvolvidos e executados em integração com outra produção de alimentos, promovendo sistemas integrados produtivos, com o objetivo de produzir mais alimentos na mesma área de terra com menos insumos (Figura 5).

Exemplos dessa integração são a fertirrigação que nada mais é que do que o aproveitamento da água do efluente de viveiros de criação de peixe para a irrigação de culturas vegetais (DOMINGHETTI et al., 2014). Aquaponia que é o sistema de produção de organismos aquáticos em cativeiro integrado com a hidroponia, de forma que haja benefícios para ambos (MARISCALLAGARDA et al., 2012). Nessa integração, geralmente a água de efluente da aquicultura nutre a hidroponia. Crivelenti et al. (2009) observaram bom crescimento das tilápias com baixa mortalidade (2,7%) e melhor qualidade do vegetal (alface) pela absorção do nitrato, resultante da nitrificação bacteriana, em sistema integrado com uso do bioflocos.

Figura 5 - Sistema de aquaponia.



Fonte: Ilustração Vicente Henrique

Uma das estratégias para melhorar a produção e a sustentabilidade da aquicultura deve se concentrar no aprimoramento da utilização de nutrientes para a alimentação animal. Isso pode ser desenvolvido por abordagens diferentes, aumentando a qualidade da alimentação através do fornecimento de alimentos com maior digestibilidade, melhorando a estratégia de alimentação o que possibilitará melhor aproveitamento do alimento fornecido e reutilizando o desperdício de nutrientes através de modificações na cultura sistema. Esse desperdício de nutrientes em um sistema de aquicultura é gerado principalmente a partir de alimentos não consumidos e dos processos de digestão e metabólicos dos alimentos, os quais quando bem gerenciados podem ser reutilizados diretamente por outros organismos em níveis tróficos mais baixos, o que possibilita a reutilização dos nutrientes por vários processos biogeoquímicos

naturais, principalmente por microrganismos que auxiliam a reincorporação destes componentes nos ciclos de nutrientes (EMERENCIANO et al., 2017).

A tecnologia de Bioflocos é baseada principalmente no princípio da reciclagem de resíduos de nutrientes, em particular o nitrogênio, transformando em biomassa microbiana que pode ser usada *in situ* pelos animais cultivados ou ser colhida e processada em ingredientes alimentares (AVNIMELECH, 2009; KUHN et al., 2010). A microbiota heterotrófica é estimulada a crescer, direcionando a relação C / N na água através da modificação do conteúdo de carboidratos na ração ou pela adição de uma fonte externa de carbono na água, para que as bactérias possam assimilar o desperdício de amônio para nova produção de biomassa. Portanto, o amônio / amônia pode ser mantido em uma concentração baixa e não tóxica, para reduzir a utilização de água durante o ciclo produtivo (AVNIMELECH, 1999).

Esta microbiota rica nutricionalmente é um importante item alimentar dos peixes cultivados, e serve como complemento à dieta alimentar dos animais cultivados pois estão disponíveis constantemente para os animais, e podem contribuir significativamente para melhoria da conversão alimentar (WEI et al., 2016; BOSSIER e EKASARY, 2017). Para que ocorra o aproveitamento integral do biofoco é necessário que a espécie desejada apresente algumas características biológicas específicas como: hábito alimentar filtrador e/ou detritívora, com aparatos morfológicos adaptados para aproveitar os agregados microbianos (bioflocos); resistência a altas densidades de estocagem; baixa sensibilidade a níveis elevados de amônia e nitrito; e tolerância aos sólidos suspensos. Estas características são de extrema importância para que o animal se adapte e aproveite o bioflocos produzido sem causar prejuízos a sua saúde (EMERENCIANO et al., 2013). Neste sentido os organismos mais cultivados e que se adaptam bem ao sistema de BFT são as tilápias (*Oreochromis sp.*) e o camarão branco do Pacífico (*Litopenaus vannamei*) (TINH et al., 2021; EMERENCIANO et al., 2017).

Outra contribuição importante desses microrganismos é a biossegurança do sistema produtivo, pois é na presença deles que ocorre competição biológica entre os patógenos e os microrganismos presentes no biofoco, e a consequente inibição da proliferação dos microrganismos patogênicos (EMERENCIANO et al., 2017).

Diante destas vantagens, é de extrema importância que a tecnologia de bioflocos 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 (Figura 6).

Figura 6 – Bioflocos estável proveniente do experimento realizado.



Fonte: Leonardo de Deus

#### 1.1.4 NUTRIÇÃO DE TILÁPIA

A formulação de dietas para organismos aquáticos exige 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 conseqüentemente, maximiza o desempenho produtivo, melhorando os parâmetros imunológicos, crescimento, reprodução e sobrevivência. (TURCHINI et al., 2018).

Em sistemas convencionais de cultivo de peixes, cerca de 50 – 60% dos custos são referentes a alimentação (SILVA, M. et al). Uma dieta corretamente balanceada influencia diretamente nos custos da produção da atividade, pois a absorção dos nutrientes torna-se mais eficiente, o desperdício de nutrientes através da excreção dos animais é reduzido, refletindo na melhora na qualidade de água do sistema. Para uma correta formulação da dieta, é necessário ter conhecimentos dos hábitos alimentares da espécie, da fisiologia digestiva e das exigências nutricionais do animal. A correta relação entre energia e proteína nas dietas é um fator crucial na exigência da espécie, pois influencia diretamente no crescimento, na eficiência alimentar e na composição corporal dos peixes. (SGNAULIN 2019).

Em relação à alimentação de peixes, se sabe que a proteína/aminoácidos é nutriente essencial e um dos ingredientes mais caros para o crescimento ideal dos peixes e estão diretamente ligados aos processos fisiológicos (ABDEL-TAWWAB et al., 2010). No entanto, é importante considerar não apenas o conteúdo de proteínas na dieta, mas também os níveis de

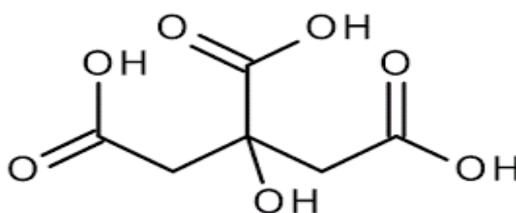
energia (FURUYA et al., 2005), pois níveis desequilibrados de energia podem afetar o crescimento, a eficiência alimentar e a deposição de gordura corporal (SGNAULIN 2019). Também se faz necessário determinar os requisitos nutricionais específicos das espécies de cultura em diferentes sistemas de produção para maximizar a eficiência da absorção de nutrientes, melhorando assim o desempenho do crescimento e reduzindo os custos de produção (ABDEL-TAWWAB E AHMAD, 2009).

Estudos preliminares avaliaram vários compostos para melhorar o aproveitamento dos nutrientes na dieta para tilápia em sistema BFT, mas são escassas informações referente a utilização por exemplo de ácidos como aditivos na alimentação (DA SILVA et al., 2018). Neste contexto, alguns ingredientes alternativos, como ácidos fórmico, fumárico, láctico e cítrico, que já são utilizados com efeitos positivos na saúde, desempenho e digestibilidade para animais terrestres de produção comercial (MAIOKA et al., 2004; DE FREITAS et al., 2006; VIOLA et al., 2007; GHELER, 2009), poderiam ser utilizados na alimentação de tilápia do Nilo, visando redução de custos com alimentação, melhora no desempenho zootécnico, saúde, reprodução, digestibilidade e status antioxidantes (TURCHINI et al., 2018).

### 1.1.5 ÁCIDO CÍTRICO

Dentre os ácidos orgânicos, o ácido cítrico tem sido amplamente utilizado na dieta animal, devido às características como palatabilidade, capacidade tampão, potencial de acidificação devido ao seu poder de reduzir o pH quando presente no estomago e trato gastrointestinal, além de ter menor custo em relação aos outros ácidos orgânicos (HOSSAIN et al., 2007; Figura 7). Na aquicultura é crescente a investigação do uso de ácido cítrico como suplemento na dieta dos peixes e os recentes estudos têm registrado resultados positivos no crescimento, conversão alimentar, biodisponibilidade de minerais, absorção e retenção do fósforo (SARKER; SATOH; KIRON 2007; BARUAH et al.2007).

Figura 7 - Fórmula estrutural do ácido cítrico.



Fonte: Food Ingredients Brasil

O ácido 2-hidroxi-1,2,3- propanotricarboxílico, é um ácido orgânico fraco em temperatura ambiente que é encontrado nos citrinos, também conhecido como citrato de hidrogênio, tem função de acidificação de meios e pode ser aplicado em uma vasta linha de alimentos. Sua forma de apresentação é em pó branco cristal, solúvel em água e quando misturado em algum produto apresenta percepção imediata e acentuada com curta duração (CASTILLO, et al., 2014). O ácido cítrico faz parte do ciclo de Krebs e, por isso, é de extrema importância para o metabolismo. Na natureza, o ácido cítrico pode ser encontrado nas frutas e vegetais, sendo mais recorrente nas frutas cítricas. Sua produção comercial do ácido ocorre, predominantemente, através de fermentação na presença de um fungo (*Aspergillus níger*), através de três processos distintos para a fabricação: o processo Koji (fermentação em estado sólido); fermentação em superfície e fermentação por cultura submersa (ZHANG, et al. 2016). Ele é comercializado na forma anidra ou monohidratada e, ainda, como sal sódico, apresenta diversas características que o torna indispensável na indústria alimentícia e por isso é aplicado na fabricação de bebidas, sobremesas, geléias e outros (RINALDI, et al., 2017). Tem função de diminuir o pH que dessa forma auxilia no controle do crescimento microbiano, pode também neutralizar o sabor doce e alongar ou elevar o potencial de conservantes.

#### 1.1.6 STATUS ANTIOXIDANTE

O estresse oxidativo ocorre a partir de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de radicais livres e/ou espécies reativas não radicais é resultante do metabolismo de oxigênio. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora. O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais. Esse sistema, usualmente, é dividido em enzimático (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e não-enzimático constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética (IBRAHIM et al., 2021).

A geração de radicais livres acontece através de um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons; fertilização do óvulo; ativação de genes; e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção, porém, a produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos (BARBOSA 2010).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos inicia o desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante. Estes têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes.

A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou da perda da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (IBRAHIM et al., 2021). Quando o processo se torna crônico gera relevantes implicações sobre o processo etiológico de numerosas enfermidades crônicas não transmissíveis, entre elas a aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos e câncer. Lannutti et al. (2012), em estudo de revisão, ratificou que a geração de radicais livres desencadeia eventos patológicos que, por sua vez, estão envolvidos nos processos cardiovasculares, carcinogênicos e neurodegenerativos.

Sabendo das funções do ácido cítrico como anti inflamatório, anti microbiano, a utilização dele como aditivo alimentar tende a ser uma ótima alternativa no combate e redução dos radicais livres, com potencial de promover um melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta, modular a microbiota intestinal positivamente e estimular o status antioxidante do organismo dos animais.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Avaliar diferentes níveis de inclusão de ácido cítrico sobre o desempenho zootécnico e status antioxidante de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em sistemas de bioflocos.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar o ganho de peso, biomassa final, peso do fígado, peso do intestino, índice hepático e índice intestinal de alevinos de tilápias produzidas em sistema de bioflocos alimentadas com dietas suplementadas com ácido cítrico nas proporções de 0, 50, 100, 150 e 200mg/Kg.

Avaliar o metabolismo energético e o sistema antioxidante através de níveis de ROS (espécies reativas ao oxigênio), NPSH (tióis não proteicos) e atividade de GST (enzima glutathione s – transferase) sobre o efeito da inclusão do ácido cítrico na dieta de alevinos de tilápia produzidas em sistema de Bioflocos.

## **2 - CAPÍTULO II**

### **1 MANUSCRITO**

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de um artigo com sua formatação de acordo com as orientações da revista Aquaculture ao qual será submetido.

MANUSCRITO I: *Ácido cítrico na dieta para alevinos de tilápia do nilo (Oreochromis niloticus) em sistema de bioflocos melhora o desempenho zootécnico e status antioxidante*

## 2.1 MANUSCRITO 1

### **Ácido cítrico na dieta para alevinos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema de bioflocos melhora o desempenho zootécnico e status antioxidante**

Leonardo de Deus da Silva<sup>a\*</sup>, Charles Marcon Giacomelli<sup>b</sup>, Alexandre Henrique Marcelino<sup>b</sup>, Suelyn de Oliveira Marques<sup>b</sup>, Fernanda Picolli<sup>c</sup>, Aline Zampar<sup>d</sup>, Diogo Luiz de Alcantara Lopes<sup>d</sup>, Bianca F. Bissacotti<sup>e</sup>, Priscila M. Copetti<sup>e</sup>, Nathieli B. Bottari<sup>e</sup>.

<sup>a</sup> Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZOO/UDESC), Chapecó, SC, Brasil,

<sup>b</sup> Acadêmico do Programa de Graduação em Zootecnia (UDESC), Chapecó, SC, Brasil,

<sup>c</sup> Acadêmica do Programa de Doutorado em Ciência Animal (UDESC), Lages, SC, Brasil,

<sup>d</sup> Professora do Programa Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZOO/UDESC), Chapecó, SC, Brasil,

<sup>e</sup> Membro do laboratório de Imunologia da (UFMS), Santa Maria, RG, Brasil,

Autor correspondente\*: [zootecnistaleonardo@gmail.com](mailto:zootecnistaleonardo@gmail.com)

De acordo com normas para publicação em:

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

## Resumo

Em decorrência do aumento expressivo do consumo e da demanda pela produção de peixes, se faz necessário buscar alternativas que auxiliem a produção de alimento de qualidade em sistemas mais sustentáveis. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi investigar a inclusão de diferentes níveis de ácido cítrico na proporção; (A) 0; (B) 50; (C) 100; (D) 150; (E) 200 mg/Kg de ração na dieta de alevinos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) linhagem GIFT, com peso médio de  $1,76 \pm 0,11$  g produzidas em sistema de bioflocos. O experimento teve duração de 45 dias e foram avaliados os parâmetros físico-químicos de qualidade da água, os quais permaneceram com concentrações aceitáveis para um bom desempenho da espécie testada. Quanto ao desempenho zootécnico, peso final médio apresentou diferença significativa, onde os grupos que receberam o aditivo na dieta apresentaram peso até 29,8% maior em relação ao grupo controle. Foi avaliado também o peso de fígado e intestino além do índice hepático e intestinal, os quais não tiveram resultados significativamente diferentes entre os grupos testados, o que indica que por mais que o ácido cítrico seja benéfico para o desenvolvimento de tilápias, ainda assim não estimula o crescimento de órgãos envolvidos no processo de digestão. A análise do sangue revelou uma diferença significativa para parâmetros de avaliação do status antioxidante, onde espécies reativas ao oxigênio (ROS) apresentou a maior média no grupo controle, o que pode ser considerado um indicador de maior número de radicais livres nos animais deste grupo. O resultado da enzima Glutathione S-Transferase (GST) que tem entre suas funções desintoxicar o fígado, teve o grupo (D) com a maior média exposta, em relação aos demais. Já para os tióis não proteicos (NPSH) o grupo (D) teve média superior aos grupos controle e (B), e semelhante aos grupos (C e E) o que significa que estes grupos tiveram um estímulo maior de antioxidante NPSH, que é benéfico e pode contribuir para um desenvolvimento melhor e mais saudável do animal. De acordo com os dados encontrados, recomenda-se um nível de inclusão de 150 mg de ácido cítrico por Kg de ração para alevinos de tilápias do Nilo. Visto que a busca por ingredientes alternativos e aditivos em dietas para organismos aquáticos é de extrema importância para a aquicultura, o experimento demonstrou resultados promissor e que podem contribuir para a nutrição de tilápias em sistemas fechados.

**Palavras-chave:** Aditivo, alimento, bioflocos, peixe.

**Abstract**

Due to the significant increase in consumption and demand for fish production, it is necessary to seek alternatives that help the production of quality food in more sustainable systems. Therefore, the objective of this study was to investigate the inclusion of different citric acid levels in the proportion; (A) 0; (B) 50; (C) 100; (D) 150; (E) 200 mg/kg of feed in the diet of Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) GIFT line, with an average weight of  $1.76 \pm 0.11$ g produced in a biofloc system. The experiment lasted 45 days and the physical-chemical parameters of water quality were evaluated, which remained with acceptable concentrations for a good performance of the tested species. Regarding zootechnical performance, the mean final weight showed a significant difference, where the groups that received the additive in the diet presented weight up to 29.8% higher than in the control group. Liver and bowel weight was also evaluated in addition to the hepatic and intestinal index, which did not have significantly different results among the tested groups, which indicates that however beneficial citric acid is for the development of tilapia, it still does not stimulate the growth of organs involved in the digestion process. Blood analysis revealed a significant difference for antioxidant status assessment parameters, where oxygen-reactive species (ROS) presented the highest mean in the control group, which can be considered an indicator of a higher number of free radicals in the animals of this group. The result of the enzyme Glutathione S-Transferase (GST) that has among its functions detoxifying the liver, had the group (D) with the highest average exposed, about the others. For non-protein tics (SPL) the group (D) had a higher mean than the control and (B) groups, and similar to the groups (C and E), which means that these groups had a higher stimulation of antioxidant NPSH, which is beneficial and can contribute to the better and healthier development of the animal. According to the data found, it is recommended a level of inclusion of 150 mg citric acid per kg of feed for Nile tilapia fingerlings. Since the search for alternative ingredients and additives in diets for aquatic organisms is extremely important for aquaculture, the experiment demonstrated promising results that can contribute to the nutrition of tilapia in closed systems.

**Keywords:** Additive, biofloc, fish, food.

## 1 Introdução

O consumo global de peixes como fonte de alimento aumentou na taxa média anual de 3,1% de 1961 a 2017, uma taxa quase duas vezes maior ao crescimento populacional do mundo anual que foi 1,6% (FAO, 2019). Neste sentido a aquicultura vem crescendo e obtendo destaque no panorama mundial nos últimos anos por ser a principal atividade responsável por suprir a demanda de pescado no mundo (FAO, 2016). Visando a sustentabilidade, o sistema de bioflocos tem como princípio a reciclagem de resíduos de nutrientes, em particular o nitrogênio, em biomassa microbiana que pode ser usada in situ pelos animais cultivados ou ser colhida e processada em ingredientes alimentares (AVNIMELECH, 2009; KUHN et al., 2009). A microbiota heterotrófica é estimulada a crescer, direcionando a relação C / N na água através da modificação do conteúdo de carboidratos na ração ou pela adição de uma fonte externa de carbono na água (AVNIMELECH, 1999). Outra contribuição importante desses microrganismos é a biossegurança do sistema produtivo, pois é na presença deles que ocorre competição biológica entre os patógenos e os microrganismos presentes no biofloco, e a consequente inibição da proliferação dos microrganismos patogênicos (EMERENCIANO et al., 2017).

Este sistema depende do equilíbrio entre carbono e nitrogênio na água para o seu correto funcionamento, estimulando o crescimento dos organismos microbianos no sistema promove a absorção de compostos nitrogenados e transformação de resíduos em proteína microbiana (EMERENCIANO et al., 2013).

Melo et al., (2015) ao testar o cultivo intensivo de camarão marinho (*Litopenaeus vanammei*), com utilização de bioflocos como fonte de alimento suplementar, observou que é possível reduzir os níveis de proteína da ração de 35 para 25% sem comprometer o desempenho zootécnico dos camarões e a qualidade da água. Já Silva et al (2018), avaliando juvenis de tilápia em duas fases distintas, observou este mesmo efeito, podendo o teor de proteína da dieta ser reduzido para 28 e 22% respectivamente para peixes de 10 a 60g e 60 a 230g. Diante destas vantagens, é de extrema importância que a tecnologia de bioflocos 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.

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresenta extrema importância neste cenário de crescimento, principalmente no Brasil onde seu cultivo tem apresentado rápida expansão. O sucesso da espécie está ligado à sua fácil adaptação a diversos tipos de sistemas de cultivo, rusticidade, baixo nível trófico, rápido crescimento, além de apresentar boas taxas de conversão alimentar (FURUYA et al., 2005).

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 (SANTOS et al., 2009). Outro aspecto a ser levado em conta 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 situação, a busca por ingredientes alternativos que apresentem uma composição nutricional semelhante ou até mesmo melhor que os convencionais, surgiram como uma opção na redução de custos, e são temas atuais da aquicultura (EMERENCIANO et al., 2017).

Ácidos orgânicos e seus sais estão sendo cada vez mais pesquisados como suplementos alimentares em cultivos como uma alternativa com potencial para melhorar a utilização de nutrientes, o crescimento e a resistência a doenças em animais aquáticos (LIM et al., 2015 e 2017). Acredita-se que isso se deva principalmente às suas propriedades acidificantes que podem melhorar vários parâmetros, como a utilização de nutrientes, a saúde gastrointestinal do animal e a atividade da enzima digestiva. Embora existam vários tipos de ácidos orgânicos, talvez o mais estudado como complemento alimentar de animais aquáticos seja o ácido cítrico e seus sais (por exemplo, citrato de sódio), que demonstrou ter um bom sucesso com uma variedade de espécies aquáticas (SUGIURA et al., 1998; KHAJEPOUR et al., 2012; CARDOSO 2016). No entanto, pesquisas sugerem que os efeitos dos ácidos orgânicos da dieta são altamente específicos para cada espécie (NG et al., 2009; ABWAO et al., 2014; NEVES 2018).

O efeito promotor de crescimento do ácido cítrico pode ocorrer devido à acidificação gastrointestinal e aos efeitos antimicrobianos. Considerando que um pH gástrico mais baixo induzido pelo ácido cítrico resulta em aumento da atividade das enzimas digestivas, o que leva a uma maior disponibilidade de nutrientes. Além disso, a quelação e a formação complexa de minerais podem ser afetados pelo efeito do ácido cítrico, resultando em maior biodisponibilidade de minerais da dieta (KHAJEPOUR et al., 2012). A suplementação de 2% de ácido cítrico melhora a disponibilidade de cálcio e fósforo e influencia positivamente a morfologia intestinal de juvenis de tilápia do nilo (CARDOSO 2016). Além disso, na bioquímica, este ácido apresenta um papel importante no ciclo de Krebs, como intermediário para produção de ATP que ocorre na célula animal (LEHNINGER, 2007). Segundo Neves (2018) a suplementação de 1,5% de ácido fumárico melhora o desempenho zootécnico e resulta em efeito antibacteriano em tilápias do Nilo.

Portanto se faz necessário investigar as formas de ação do ácido cítrico sobre o desempenho de tilápias em sistema de bioflocos. Devido a escassez de informação, é preciso

avaliar se o comportamento e desempenho dos animais é afetado com a inclusão do ácido cítrico na dieta, assim como nos sistemas de produção em água clara. 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.

## **Material e métodos**

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Aquicultura do Oeste (LAQUA-OESTE) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), localizado em Chapecó - SC, totalizando 45 dias, CEUA N: 2276141219.

Os peixes utilizados no experimento foram adquiridos de uma piscicultura comercial localizado no litoral de Santa Catarina, transportados até o LAQUA, onde foram aclimatados, sendo mantidos em caixas de polietileno de 1000 L por cinco dias até o início do experimento. Foram utilizados 200 alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) variedade GIFT, com peso médio inicial de  $1,76 \pm 0,11$  g. As unidades experimentais utilizadas foram caixas de polietileno com capacidade de 100 L, e volume útil de 60 L cada, canalizadas até uma caixa de 1000 L com volume útil de 400 L com recirculação da água, ilustrado na Figura 1.

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 para manter as mesmas características de qualidade de água em todas as unidades experimentais. A água era captada da rede de abastecimento da cidade (CASAN) que permanecia durante um período de 48 horas com aeração contínua para a volatilização de resíduos de hipoclorito de sódio. A aeração foi contínua através de anéis de mangueira micro perfurada (50 cm), localizados no centro da caixa de 1000 L, e nas unidades experimentais, utilizado uma pedra porosa (15 mm x 20 mm) abastecida por uma tubulação interligada a um por um compressor de ar radial (1,5 CV).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente com o mesmo número de indivíduos por grupo, sendo cinco tratamentos com quatro repetições em um delineamento inteiramente ao acaso, totalizando 20 unidades experimentais. Os tratamentos foram compostos por diferentes níveis de inclusão de ácido cítrico na dieta (0; 25; 50; 100 e 200 mg/Kg de ração). A inclusão do ácido cítrico foi realizada no laboratório LANA localizado na (UDESC Chapecó, Santa

Catarina, Brasil) e os níveis de garantia da ração utilizada como base, de acordo com as informações do rótulo (Tabela 1).

O fornecimento de ração foi dividido em três horários (09:00, 13:00 e 17:00 h). A quantidade inicial fornecida foi de 7% da biomassa, sendo ajustados através de biometria realizada a cada 15 dias (balança digital, modelo HBF 214), de acordo com Kubtza (2011).

Para os parâmetros de avaliação de qualidade da água, foi verificado todos os dias às 09:00 e às 17:00 horas, temperatura com a utilização de um termômetro digital (AKSO modelo AK 02), pH verificado com o medidor de pH portátil (AKSO modelo AK 90) resolução pH: 0,01 para pH / 1 mV para Potencial Redox. Já o oxigênio dissolvido foi verificado cinco vezes por semana com aparelho oxímetro digital com sonda (ALFAKIT modelo AT 160 SP) método de Winkler e ponto zero com Solução de Sulfito de Sódio, de acordo com o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition 2005, método 4500 – G e método 2520 B para Salinidade. Baseado nas normas NBR 10559 a Determinação de Oxigênio Iodométrico de Winkler e suas modificações e MB 3030 a Determinação de Oxigênio Dissolvido a Método do Eletrodo de Membrana. Uma vez por semana foi avaliado amônia, nitrito, nitrato através de um fotolorímetro (Alfakit modelo AT 100P), que usa o método de reação de Griess, Alfaftilamina, NTD e Digestão – Nessler. Para a formação e manutenção da comunidade microbiana do sistema de bioflocos, cinco dias antes do início do experimento, foram inoculados 200 L de bioflocos em de cada macrocosmo. Este inóculo veio de uma cultura intensiva de camarão (*Litopenaeus vannameio*) em BFT (salinda de 6) estabilizado e mantido a mais de dois meses. Para auxiliar na manutenção do biofloco em cada macrocosmo foi inserido uma biomassa de 600 grama de tilápia. A manutenção da relação carbono - nitrogênio foi seguindo a metodologia sugerida por (AVNIMELECH, 1999).

No final do experimento, após jejum de 24 horas, todos os animais foram pesados individualmente em balança digital com precisão de 0,01g (OHAUS modelo PA 4102 P), com o intuito de avaliar o desempenho zootécnico. Também foi analisado as seguintes variáveis: ganho de peso (GP); biomassa inicial e final (BI/BF); comprimento inicial e final (CI/CF); peso do fígado (PF); peso intestino (PI); e sobrevivência. Três animais de cada unidade experimental foram anestesiados, sendo expostos ao (eugenol a 75 mg/L) em uma caixa de água com capacidade de 10 litros, até que não apresentassem movimentos corporais por meio de visualização comportamental até que não apresentem nenhum movimento, após isso, foi coletado sangue com auxílio de seringas de 3 ml contendo EDTA a 10% por punção na região caudal dos animais, para avaliação de estresse oxidativo através de ROS (Halliwell, B.,

Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine, 4th edn. Oxford University Press, New York 2007), GST (Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249, 7130–7139) e NPSH (ELLMAN, 1959). Posteriormente os peixes foram submetidos a eutanásia em 300mg/l de eugenol por 600 s e decapitados para realização da coleta dos órgãos e tecidos e para determinar os índices.

#### Análise estatística

Para sobrevivência foi utilizada análise não-paramétrica, pois para essa variável não houve distribuição normal de resíduos, sendo aplicado o Teste de Kruskal-Wallis, Sobrevivência ( $p = 0,2240$ ).

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, foram submetidos a análise de variância (ANOVA); e posteriormente diferenças significativas entre os tratamentos foram detectadas por meio do teste de Tukey, SAS® (Statistical Analysis System), com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### **Resultados e discussão**

Os parâmetros avaliados para qualidade de água, permaneceram dentro de uma faixa aceitável para produção de tilápias, de acordo com (OSTI *et al.*, 2018). As médias e desvio padrão das variáveis analisadas estão apresentadas na Tabela 2. A coleta dos dados de qualidade de água não apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para nenhum parâmetro verificado.

Os resultados para sobrevivência não apresentaram diferença significativa entre os grupos testados ( $p = 0,2240$ ), esse resultado pode ocorrer devido a nenhum dos tratamentos oferecer exposição a algum agente que cause um desafio para saúde dos animais ou fator estressante que possa ocasionar em uma baixa da imunidade dos indivíduos testados (NG *et al.*, 2009). Resultado que se assemelha ao de Dai *et al.*, (2018), que utilizou a espécie pregado em sistema de água clara, alimentado com dietas com diferentes níveis de ácido cítrico em comparação com a dieta controle e não observou alteração na sobrevivência dos peixes.

Em relação aos parâmetros zootécnicos, os resultados de ganho de peso apresentaram efeito significativo entre os tratamentos testados (Tabela 3). O ganho de peso nos grupos que receberam o ácido cítrico na dieta foram todos superior ( $p < 0,05$ ) ao grupo controle que não recebeu a dieta com aditivo. Esses resultados vão ao encontro a vários estudos que demonstraram as suplementações dietéticas de ácido cítrico ou citrato de sódio tiveram um efeito benéfico no crescimento de várias espécies de peixes (BARUAH *et al.*, 2007, HOSSAIN

et al., 2007, KHAJEPOUR et al., 2012, CASTILLO et al., 2014, ZHU et al., 2015). Uma das causas sugeridas foi devido à maior utilização de nutrientes, particularmente para minerais como o fósforo (P) (BARUAH et al., 2007, KHAJEPOUR et al., 2012, CASTILLO et al., 2014). Isso parece ser particularmente importante ao usar proteínas baseadas em plantas, uma vez que o ácido cítrico pode atuar como um quelante competitivo do ácido fítico, que é um fator anti-nutricional que as plantas usam para armazenar P em uma forma inacessível aos peixes, mas também pode se ligar a outros nutrientes, incluindo proteínas e minerais (FRANCIS et al., 2001). Em termos de nutrição da tilápia, níveis elevados de ácido fítico e baixa disponibilidade de P foram citados como contribuintes para limitar o crescimento da tilápia ao usar dietas à base de farelo de soja (NG; ROMANO, 2013).

Os dados de biomassa final apresentaram resultados significativos ( $p < 0,005$ ) em que os grupos que receberam ácido cítrico na dieta foram similares entre si e superior ao grupo controle que não recebeu o aditivo na dieta. O aumento do pH no estômago afeta negativamente a ativação da pepsina e, possivelmente, diminui a capacidade de digestão de proteínas em peixes (LUCKSTADT, 2008; MÁRQUEZ et al., 2012). Desta forma, ao suplementar ácido cítrico na dieta, há redução do pH estomacal com possível melhoria da digestão de proteína. Segundo Dai *et al.*, (2018) dietas suplementadas com ácido cítrico aumentaram significativamente a atividade da pepsina e tem correlação negativa com o pH do conteúdo estomacal o que pode influenciar positivamente na absorção dos nutrientes para pregado. Da mesma forma, o ácido cítrico melhorou as atividades das enzimas digestivas gastrointestinais em tambor vermelho (*Sciaenops ocellatus*) e tilápia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) (CASTILLO et al., 2014; LI et al., 2009). Isso pode nos fornecer base para acreditar que a inclusão de um ácido orgânico via dieta pode corrigir o pH estomacal ou deficiência de pepsina, aumentando assim o aproveitamento das proteínas da dieta e impedindo também uma elevação de bactérias indesejadas no trato digestivo, que causam doenças e conseqüentemente perdas na produção.

Além disso, o ácido cítrico tem efeitos potenciais sobre a biodisponibilidade de minerais em animais terrestres (PAK et al., 1987; RAVINDRAN & KORNEGAY, 1993; CRAWFORD, 1995). Tia et al. (2010) relataram que a acidificação da dieta por ácido cítrico aumentou significativamente o ferro corporal total em peixes. Sugiura et al. (1998) também observaram um aumento na disponibilidade aparente de Calcio, Fosforo, Magnésio, Manganês e Ferro em trutas arco-íris alimentadas com dietas à base de farinha de peixe suplementadas com ácido cítrico. Boling et al., (2001) observaram que em frangos, a utilização de Zinco aumentou com a adição de ácido cítrico. Boling et al., (2001) em outro estudo verificou-se que concentrações elevadas de Cobre, Ferro e Zinco podem promover a atividade da protease no estômago da

tilápia. É possível que os oligoelementos liberados pelo ácido cítrico possam ter contribuído para o aumento da atividade da protease. Ele também aumenta as atividades da amilase no hepatopâncreas e no intestino (BOLING et al., 2001). Provavelmente, isso se deve às mudanças no pH intestinal pelo ácido cítrico, visto que foi relatado que o pH da digesta também é um fator que influencia a liberação de colecistoquinina (CCK) e a secreção pancreática exócrina. Além disso, o efeito do ácido cítrico na liberação de íons metálicos pode ser responsável pelas alterações da amilase no intestino da tilápia (MÁRQUEZ et al., 2012).

Os parâmetros de peso de fígado, peso do intestino, índice hepático e índice intestinal não apresentaram diferença significativa entre os grupos testados (Tabela 4). O que nos leva a crer que por mais que a inclusão de ácido cítrico na dieta seja benéfica, ainda assim não causou alteração nos órgãos envolvidos no processo de digestão. Já que estes índices 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). Além disso, a inclusão de ácido na dieta pode reduzir o número de bactérias no intestino conforme encontrado por Ng (2009), que observou que as contagens bacterianas totais no intestino e nas fezes de tilápias do nilo foram significativamente ( $p < 0,05$ ) afetadas pela suplementação dietética com ácido málico, e uma interação significativa foi observada entre o ácido málico e (*Bacillus subtilis*). A redução na contagem bacteriana total decorre principalmente da difusão de ácidos orgânicos nas células bacterianas, da dissociação desses ácidos no interior das células, a consequente diminuição do pH citoplasmático e eventual morte celular (YOGATA; OKU, 2000).

Os modos de ação dos ácidos orgânicos parecem ser diferentes. Várias hipóteses foram sugeridas para explicar os efeitos dos ácidos orgânicos no aumento da utilização de nutrientes em animais terrestres, que incluem o seguinte: redução do pH gástrico levando ao aumento da ativação da pepsina; redução do pH intestinal que pode aumentar a solubilização de minerais, resultando em aumento da absorção de minerais; ou como resultado da diminuição da atividade microbiana intestinal que poderia utilizar nutrientes agora poupados para o animal hospedeiro (NG, 2009).

O aumento da resposta imune associado à acidificação da dieta ou suplementação pode ser devido aos seus efeitos inibitórios contra os microrganismos patogênicos em todo o trato gastrointestinal. A resposta imune do organismo se origina no intestino, entre outros locais, e a presença de bactérias patogênicas enfraquece o sistema imunológico local, que é altamente mobilizado para combater invasores. A administração de ácidos orgânicos reduz a incidência e

a duração das doenças ao aumentar a resistência à colonização e efeitos inibitórios diretos contra patógenos (BALCÁZAR et al., 2006).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) surgem da instabilidade de seus elétrons desemparelhados, o que gera alto potencial de reatividade com moléculas biológicas. O ataque que é proporcionado possibilita oxidação de estruturas de membranas celulares e até mesmo do ácido desoxirribonucleico (DNA). Em situação extrema, observa-se a instalação do quadro de estresse oxidativo, caracterizado, sobretudo, pela diminuição da atividade do sistema antioxidante (BALCÁZAR et al., 2006).

A atividade biológica de ROS é limitada por uma série de antioxidantes endógenos e proteínas relacionadas ao estresse (SMOLKA et al., 2000). Os principais sistemas de defesa endógenos compreendem as vitaminas antioxidantes (vitaminas A, C e E), ácido úrico, glutathione reduzida (GSH), grupamentos sulfidril livres e enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e sistema glutathione peroxidase/glutathione redutase). As enzimas antioxidantes constituem o principal mecanismo de defesa antioxidante intracelular, pois eliminam  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  e hidroperóxidos que poderiam oxidar os substratos celulares, prevenindo as reações em cadeia dos radicais livres, através da diminuição na concentração disponível destes para iniciar o processo (YU, 1994).

No estudo demonstra-se que o status oxidativo sistêmico tendeu à melhora, o que pode ter reduzido possíveis inflamações nos animais que receberam o ácido cítrico na dieta, após o período de 45 dias de experimento, possivelmente em razão da diminuição do nível de ROS, causadas pela ação do aditivo testado (tabela 5). Apesar de os resultados iniciais serem promissores e indicarem que o uso desse composto pode ser útil na prevenção de doenças inflamatórias, ainda é preciso expandir conhecimentos sobre o assunto antes de aplicar sua utilização em larga escala, uma vez que não se tem o conhecimento de todas as alterações clínicas geradas pela utilização do ácido cítrico.

As enzimas de detoxificação são largamente utilizadas para detectar toxicidade em diferentes ambientes. Entre estas enzimas, a glutathione-S-transferase (GST) desempenha um papel fundamental na desintoxicação de uma ampla gama de compostos (LANNUTTI; MARRONE; NAZZARENO, 2012). As glutathione-S-transferases são membros de uma superfamília de proteínas diméricas multifuncionais envolvidas na detoxificação celular de compostos citotóxicos e genotóxicos e na prevenção de danos oxidativos aos tecidos (ARMSTRONG, 1997). Seu mecanismo catalítico é promover a adição nucleofílica do peptídeo glutathione (GSH-Glu Cis-Gli) a uma extensa variedade de eletrófilos hidrofóbicos endógenos e exógenos, formando produtos conjugados que são mais polares e mais facilmente excretados

do que os seus correspondentes precursores (LANNUTTI; MARRONE; NAZZARENO, 2012). Estudos comparando a sequência de aminoácidos confirmam que as classes de GSTs existem numa gama surpreendentemente ampla de organismos. Pesquisas relacionadas à elucidação de processos detoxificantes e respostas adaptativas de proteínas como a GST podem ser úteis para uma melhor compreensão da toxicidade em organismos expostos a substâncias químicas (OTITOJU Y ONWURAH, 2007).

Os resultados deste estudo apresentaram aumento significativo da atividade da enzima GST para o tratamento em que foi utilizado a dosagem de 150 mg/Kg de ácido cítrico na dieta de tilápias do Nilo, sendo superior aos demais tratamentos e ao grupo controle. Isso pode ser considerado efeito benéfico, pois o aumento desta enzima pode elevar o potencial de desintoxicação do fígado. Dados semelhantes foram observados por Rizwan-ul-haq et al. (2012) que relataram indução da GST expostas à elevadas concentrações de roxarsona e ácido arsenílico. A exposição a fatores de estresse ambiental pode regular vários genes, estimulando ou inibindo a expressão gênica de proteínas relacionadas a funções de proteção celular (RIZWAN-UL-HAQ et al. 2012). A indução da GST é um processo fundamental na proteção celular contra uma variedade de substâncias tóxicas pró-oxidantes. Além disso, promove uma melhor detoxificação dos xenobióticos que são substâncias químicas prejudiciais ao organismo, através da formação de um complexo com a GSH (OTITOJU Y ONWURAH, 2007).

A GSH é um tampão redox intracelular essencial por ter a função de proteção celular contra os danos causados pela oxidação (FANG et al., 2002). Além disso, mantém os grupos tióis das proteínas em estado reduzido e impede a inativação de proteínas e enzimas funcionais, protegendo esses grupos contra oxidação (MANVERMEZ AND CELIK, 2004).

Os tióis são antioxidantes não enzimáticos celulares, estão entre os alvos principais de ROS, e conseqüentemente estão no centro de todos os processos redox celulares (WINTERBOURN; HAMPTON, 2008). A oxidação de tióis de proteínas por trocas tióis/disulfeto ou outros processos, pode resultar em formação de disulfetos intra- ou inter-moleculares e perda de função. Dessa forma, a homeostasia dos tióis celulares é crítica para a sobrevivência e função celular (NETTO et al., 2016; WINTERBOURN; HAMPTON, 2008).

Os níveis de NPSH (tióis não proteicos) para os grupos testados estão demonstradas na tabela 5. O tratamento 150mg/kg foi superior aos grupos controle e 50mg/kg, e semelhante aos 100 e 200 mg/kg o que significa que estes grupos tiveram um estímulo maior de antioxidante NPSH, que é benéfico e pode contribuir para um desenvolvimento melhor e mais saudável do animal.

Tie et al. (2010) observaram em um estudo com inclusão de diferentes níveis de ácido cítrico na dieta de pregado, (*Scophthalmus maximus L*) que o ácido cítrico teve função anti-inflamatória por meio da ativação mediada por proteínas da família (TLR), e além disso, o ácido cítrico contribui para a manutenção das proteínas Tight Junctions que são proteínas que se formam dentro de domínios lipídicos da membrana plasmática. Balcázar et al., (2006) acredita que os ácidos orgânicos estimulam a resposta imune ao afetar a flora intestinal, que é necessária para o desenvolvimento do sistema imunológico intestinal. Além disso, uma função semelhante à da acetil glucosaminidase foi relatada para o ácido cítrico, que exerce um papel fundamental na digestão de quitina e resistência a vírus e parasita, influenciando assim o função imunológica dos peixes e crustáceos (XIE et al., 2010). Outro resultado positivo foi a melhora da capacidade antioxidante demonstrada no camarão branco por meio da suplementação dietética de ácido cítrico (SU et al., 2016). Muitas combinações importantes de antioxidantes ainda não foram testadas e seus efeitos clínicos e alterações no “status” oxidativo do organismo permanecem inconclusivas. Por fim, para que no futuro essas substâncias possam fazer parte das várias fórmulas de combate às principais doenças causadas pela oxidação, é importante concentrar esforços principalmente nos efeitos clínicos da terapia antioxidante, e não só nas habituais avaliações bioquímicas.

### **Conclusão**

De acordo com os resultados obtidos, recomenda-se um nível de inclusão de 150 mg/Kg de ácido cítrico em rações extrusadas para alevinos de tilápia do Nilo, uma vez que proporcionou melhor desempenho zootécnico com aumento de até 29,8% no ganho de peso e melhora no “status” antioxidantes, aumentando atividade de GST e níveis de NPSH ao mesmo tempo que diminui nível de ROS.

### **Agradecimentos**

A UDESC Chapecó e toda equipe do Laboratório de Aquicultura do Oeste (LAQUA-OESTE) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) pelo apoio técnico durante a realização do estudo. Ao laboratório de Imunologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSM.

### **Conflito de interesses**

Os autores não declaram conflitos de interesse.

## **Comitê de Ética**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética sobre o Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Estadual de Santa Catarina, número: 2649171219

## **Referências**

- ABWAO, J. O. et al. 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, ago., 2014. <https://www.researchgate.net/publication/265612111> The potential of periphyton based aquaculture for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L production a review.
- ARMSTRONG, R. N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*, v. 10, p. 2–18, abr., 1997. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/tx960072x>.
- AVNIMELECH, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture*, v. 176, p. 227-235, jun., 1999. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X).
- AVNIMELECH, Y. Tilapia production using biofloc technology - saving water, waste recycling improves economics. *Global Aquaculture Advocate*, p. 66-68, Maio/Jun., 2011. [https://www.researchgate.net/publication/285805143\\_Tilapia\\_production\\_using\\_biofloc\\_technology\\_saving\\_water\\_waste\\_recycling\\_improves\\_economics](https://www.researchgate.net/publication/285805143_Tilapia_production_using_biofloc_technology_saving_water_waste_recycling_improves_economics).
- AVNIMELECH, Y., KOCHBA, M. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks, using <sup>15</sup>N tracing. *Aquaculture*, v. 287, 163-168, fev., 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.009>.
- BALCÁZAR, J. L. et al. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, v. 114, p. 173-186, maio, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.009>.
- BARUAH, K. et al. Dietary microbial phytase and citric acid synergistically increase nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles in suboptimal proteins. *Aquaculture Research*, v. 38, p. 109-120, jan., 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01624.x>.

- BARUAH, K. et al. Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude protein level on mineral utilization by rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), juveniles. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 38, n. 2, p. 238-249, jun., 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00092.x> .
- BOLING-FRANKENBACH, S. D. et al. O efeito do ácido cítrico nas necessidades de cálcio e fósforo de pintos alimentados com dietas com farelo de milho soja. *Poultry. Science*, v. 80, p. 783-78, jun., 2001. <https://doi.org/10.1093/ps/80.6.783>.
- CABALLERO, M. J. 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, set., 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00572.x>.
- CARDOSO, I. L. Citric acid in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Dissertation (Master), Animal Science - State University of Mato Grosso do Sul, 59 p. 2016. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1065374/1/2016ts08.pdf>.
- CASTILLO, S. et al. Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, v. 433, p. 6-12, set., 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.038>.
- CASTILLO, S. et al. Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus* *Aquaculture*, v. 433, p. 6-12, set., 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.038>.
- CRAWFORD, R. D. Proposta de papel para uma combinação de ácido cítrico e ácido ascórbico na produção de sobrecarga de ferro na dieta: uma causa fundamental de doença. *Biochemical and Molecular Medicine*, v. 54, p. 1-11, fev., 1995. <https://doi.org/10.1006/bmme.1995.1001>.
- DAI, J. et al. Citric acid as a functional supplement in diets for juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L.: Effects on phosphorus discharge, growth performance, and intestinal health. *Aquaculture*, v. 495, p. 643-653, out., 2018.://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.004.

DOMINGHETTI, et al. Phosphorus doses and irrigation on nutrition of coffee leaf/Doses de fosforo e irrigacao na nutricao foliar do cafeeiro Citation metadata.

Revista Brasileira de Engenharia Agricola e Ambiental, vol. 18, pag. 3-5, dez. 2014. <http://dx-doi.ez74.agriambi.v18n12p1235-1240>.

EMERENCIANO, M. G. C. et al. Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. InTech open science, open minds, v. 1, p. 91-109, jan., 2017. <http://dx.doi.org/10.5772/66416>.

EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G.; CUZON, G. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. InTech open science, open minds, v. 12, p. 301-327, 2013. <http://dx.doi.org/10.5772/53902>.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. Nutrition, v. 18, p. 872-879, out., 2002. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4).

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture, 243 p., 2014. <http://www.fao.org/3/i3720e/i3720e.pdf>.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. El estado mundial de la pesca y la acuicultura, 226 p., 2016. <http://www.fao.org/3/i5555s/i5555s.pdf>.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of Food and Agriculture, 182 p., 2019. <http://www.fao.org/3/ca6030en/ca6030en.pdf>.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture. 244 p., 2020. <http://www.fao.org/3/ca9229en/CA9229EN.pdf>.

FRANCIS, G.; MAKKAR H. P. S.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture, v. 199, p. 197-227, ago., 2001. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9).

- FURUYA, W. M. et al. Aplicação do conceito de proteína ideal para redução dos níveis de proteína em dietas para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, p. 1433-1441, 2005. <https://www.scielo.br/pdf/rbz/v34n5/26622.pdf>.
- HOSSAIN, M. et al. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream (*Pagrus major*). *Fisheries Science*, v. 73, n. 1, p. 1309–1317, Toquio – Japão, jun., 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01469.x>.
- KHAJEPOUR F.; HOSSEINI, S. A. Calcium and phosphorus status in juvenile Beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets. *Aquaculture Research*, v. 43, p. 407-411, fev, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02843.x>.
- KUBITZA, F. *Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial*. Jundiaí: Kubitza, 289 p. 2011.
- KUBITZA, F. *Panorama da aquicultura*. v.18, n. 11, Nov/dez. 2008. [http://www.acquaimagem.com.br/docs/Pan110\\_Kubitza.pdf](http://www.acquaimagem.com.br/docs/Pan110_Kubitza.pdf).
- KUHN, D. D. et al. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. *Aquaculture*, v. 296, p. 51–57. 585, nov. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.07.025>.
- LANNUTTI F.; MARRONE A.; NAZZARENO R. E. Binding of GSH conjugates to  $\pi$ -GST: A cross-docking approach. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 32, p. 9-18, fev., 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2011.09.006>.
- LEHNINGER, A.L. et al. *Principles of biochemistry*. New York: worth Publishers, 1232p, 2007.
- LI, P. et al. New developments in fish amino acid nutrition: Towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*, v. 37, p. 43-53, 2009. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-008-0171-1>.
- LIM, C. et al. *Organic acids and their salts. Dietary Nutrients, Additives, and Fish Health*. 2015. <https://doi.org/10.1002/9781119005568.ch15>.

- Lin, Y.-H. & Cheng, M.-Y. Efeitos da suplementação de ácidos orgânicos na dieta sobre o crescimento, digestibilidade de nutrientes e histologia intestinal da garoupa gigante *Epinephelus lanceolatus* alimentada com dieta à base de farelo de soja. *Aquaculture* 469, 106-111 (2017).
- LEE, C. S. et al. *Dietary Nutrients, Additives and Fish Health*. Wiley Blackwell p. 305-315, 2015. [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=6jT-CAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA249&dq=Webster+\(Eds.\),+Dietary+Nutrients,+Additives+and+Fish+Health,+Wiley-Blackwell&ots=e3OSBsxa5S&sig=AyadFEeaiHo2jXcGrT90fcF7TMA#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=6jT-CAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA249&dq=Webster+(Eds.),+Dietary+Nutrients,+Additives+and+Fish+Health,+Wiley-Blackwell&ots=e3OSBsxa5S&sig=AyadFEeaiHo2jXcGrT90fcF7TMA#v=onepage&q&f=false).
- LUCKSTADT, C. The use of acidifiers in fish nutrition. *Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, v. 3, n. 44, 2008. <https://pdfs.semanticscholar.org/c93a/a1c7dc6677982c774460a03d4bfe1e19f7f7.pdf>.
- MANVERMEZ, R., CELIK, C. Superoxide dismutase, glutathione, vitamin C, total antioxidant and total thiol levels in hydatid cysts. *Turk. Clin. J. Med. Sci.*, n. 24, p. 213–218, 2004.
- MÁRQUEZ, L. et al. Gut pH as a limiting factor for digestive proteolysis in cultured juveniles of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 38, p. 859-869, 2012. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10695-011-9573-1>.
- MELO, F. P. et al. Cultivo do camarão marinho com bioflocos sob diferentes níveis de proteína com e sem probiótico. *Revista Caatinga*, v. 28, n. 4, p. 202-210, out.-dez., 2015. <https://www.scielo.br/pdf/rcaat/v28n4/1983-2125-rcaat-28-04-00202.pdf>.
- NETO, J. M. F. A. Formação de espécies reativas de oxigênio e exercício físico. *EFDeportes.com, Revista Digital*. Buenos Aires, v. 17, n. 168, maio, 2012. <https://www.efdeportes.com/efd168/especies-reativas-de-oxigenio-e-exercicio-fisico.htm>.
- NEVES, S. C. V. *Ácido fumárico em dietas para juvenis de tilapia-do-NILO*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em

Recursos Pesqueiros e Aquicultura, 40 p.,

2018.://www.pgpa.ufrpe.br/sites/ww2.pgpa.ufrpe.br/files/documentos/dissertacao\_final\_-\_suzane\_ficha\_2018.1\_obs\_entregou\_fora\_do\_prazo.pdf.

NG, W. et al. Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.*, and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research*, v. 40, p. 1490-1500, set., 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02249.x>.

NG, W. K. et al. Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.*, and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture Research*, v. 40, p. 1490-1500, set. 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02249.x>.

NG, W. K.; ROMANO, N. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Aquaculture*, v. 5, p. 220-254, Dez, 2013.

<https://doi.org/10.1111/raq.12014>.

OTITOJU, O.; ONWURAH, I. N. E. Glutathione S-transferase (GST) activity as a biomarker in ecological risk assessment of pesticide contaminated environment. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 12, p. 455-1459, 2007.

[https://scholar.google.com.br/scholar?q=Glutathione+Stransferase+\(GST\)+activity+as+a+bio+marker+in+ecological+risk+assessment+of+pesticide+contaminated+environment&hl=pt-BR&as\\_sdt=0&as\\_vis=1&oi=scholart](https://scholar.google.com.br/scholar?q=Glutathione+Stransferase+(GST)+activity+as+a+bio+marker+in+ecological+risk+assessment+of+pesticide+contaminated+environment&hl=pt-BR&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholart).

OSTI, J. A. S. et al. Nitrogen and phosphorus flux from the production of Nile tilapia through the application of environmental indicators. *Brazilian Journal of Biology*, v. 78, n. 1, p. 25-31,

2018. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.02116>.

PAK, C.; HARVEY, J. A.; HSU, M. C. Enhanced Calcium Bioavailability from a Solubilized Form of Calcium Citrate. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 65, p. 801-805, out., 1987. <https://doi.org/10.1210/jcem-65-4-801>.

- RAVINDRAN, V.; KORNEGAY, E. T. Acidification of weaner pig diets: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 62, p. 313-322, 1993.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740620402>.
- RIZWAN-UL-HAQ, M. et al. Evaluation of glutathione s-transferase as toxicity indicator for roxarsone and arsanilic acid in *Eisenia fetida*. *Journal of Applied Toxicology*, v. 32, p. 731–738, set., 2012.
- SANTOS, E. L. et al. Digestibilidade aparente do farelo de coco e resíduo de goiaba pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), *Revista Caatinga*, v. 22, n. 2, p. 175-180, abr./jun., 2009.  
<https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/caatinga/article/view/754/593>.
- SARKER, M. S. A. et al. Inclusion of citric acid and/or acid- chelated trace elements in alternate plant protein source diets affects growth and excretion of nitrogen and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture*, v. 262, n. 2, p. 436- 443, fev., 2007.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.007>.
- SMOLKA, M. L. R. M. et al. A autonomia do estudante na educação médica. *Revista da Jornada de Pesquisa e Iniciação Científica*, v. 3, n. 6, p. 60-67, 2000.  
<http://www.revista.unifeso.edu.br/index.php/jopic/article/view/2041/815>.
- SNAULIN, T. Nutrição de tilápias (linhagem gift) em sistemas de bioflocos: é possível otimizar os níveis proteicos e energéticos na fase de berçário? Dissertação (mestrado) universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 65 p.,  
2019.://sistemabu.udesc.br/pergamumweb/vinculos/000077/00007746.pdf.
- SU, S. et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, v. 24, n. 6, p. 490-502, jun. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>.
- SUGIURA, S. H. et al. Effects of dietary supplements on the availability of minerals in fish meal; preliminary observations. *Aquaculture*, v. 160, p. 283-30, jan., 1998.  
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00302-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00302-5).

SUGIURA, S. H. et al. Apparent protein digestibility and mineral availability in various feed ingredients for salmonids. *Aquicultura*, v. 159, p. 177-202, jan. 1998.

[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00177-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00177-4).

TIE, J. et al. MiR-218 Inhibits Invasion and Metastasis of Gastric Cancer by Targeting the Robo1 Receptor. *Plos Genetics*, 2010. [://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000879](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000879).

THAELA, M. J. et al. Effect of lactic acid supplementation on pancreatic secretion in pigs after weaning. *Journal of Animal and Feed Sciences*, v.7, p. 181-183, 1998.

<https://pdfs.semanticscholar.org/ad94/fd1bde34f342d8893554570d9a2418667e68.pdf>.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 45, p. 549-56, set., 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004>.

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, dez., 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2000.00175.x>.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, v. 74, p. 139-162, 1994. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.1.139>.

ZHU, Y. et al. The effects of concurrent supplementation of dietary phytase, citric acid and vitamin D3 on growth and mineral utilization in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*, v. 436, p. 143-150, jan., 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.006>.

Tabela 1 - Níveis de garantia da ração comercial usada como base para inclusão dos níveis de ácido cítrico.

<b>Níveis de Garantia</b>	
<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade</b>
Proteína Bruta (mín)	320g/kg (32%)
Extrato Etéreo (mín)	60g/kg (6%)
Matéria Fibrosa (máx)	60g/kg (6%)
Matéria Mineral (máx)	130g/kg (13%)
Cálcio (mín)	10g/kg (1%)
Cálcio (máx)	30g/kg (3%)
Fósforo (mín)	9000mg/kg (0.9%)
Energia Digestível	(mín) 3000kcal/kg
Vitamina A (mín)	8000UI/kg
Vitamina C (mín)	300mg/kg
Vitamina D3 (mín)	2000UI/kg
Vitamina E (mín)	64UI/kg
Vitamina K3 (mín)	4mg/kg
Vitamina B1 (mín)	8mg/kg
Vitamina B2 (mín)	10mg/kg
Vitamina B6 (mín)	7mg/kg
Vitamina B12 (mín)	55mcg/kg
Ácido Fólico (mín)	3.5mg/kg
Ácido Pantotênico (mín)	40mg/kg
Biotina (mín)	0.3mg/kg
Colina (mín)	2000mg/kg
Niacina (mín)	65mg/kg
Cobre (mín)	5mg/kg
Ferro (mín)	40mg/kg
Iodo (mín)	1.1mg/kg
Manganês (mín)	13mg/kg
Selênio (mín)	0.25mg/kg
Zinco (mín)	85mg/kg
Inositol (mín)	100mg/kg

Fonte: Alisul alimentos.

Tabela 2 - Valores médios e desvio padrão dos parâmetros de qualidade de água de tilápias alimentadas com diferentes níveis de ácido cítrico produzidas em sistema de bioflocos.

<b>Parametros</b>	<b>temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Amônia (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Nitrito (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Nitrato (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Oxigênio dissolvido (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Macrocosmo 1</b>	23,8 ± 0,90	7,20 ± 0,49	0,04 ± 0,67	0,01 ± 0,10	0,03 ± 0,81	8,10 ± 0,46
<b>Macrocosmo 2</b>	23,7 ± 0,83	6,90 ± 0,38	0,03 ± 0,93	0,02 ± 0,23	0,01 ± 0,61	8,30 ± 0,49

Macrocosmo: Caixas de polietileno de 1000 L com volume útil de 400 L de onde era bombeada a água para as unidades experimentais.

Tabela 3 - Parâmetros de desempenho zootécnico de tilápias alimentadas com diferentes níveis de ácido cítrico produzidas em sistema de bioflocos.

<b>Tratamentos</b>	0,0	50 mg/Kg	100 mg/Kg	150 mg/Kg	200 mg/Kg	P < 0,05	F
<b>Ganho de Peso(g)</b>	71,65 ± 6,01 b	93,00 ± 487 a	88,64 ± 7,52 a	89,90 ± 6,63 a	93,02 ± 6,84 a	0,0014	7,68
<b>Biomassa inicial(g)</b>	17,59 ± 1,00	17,72 ± 1,07	17,60 ± 0,85	16,74 ± 0,96	18,61 ± 1,31	NS	---
<b>Biomassa final(g)</b>	89,25 ± 6,17 b	110,72 ± 3,82 a	106,23 ± 6,75 a	106,64 ± 6,76 a	111,63 ± 6,74 a	0,0008	8,63

Média ± Desvio Padrão, letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa

(P<0,05) entre os tratamentos.

Tabela 4 - Parâmetros de desempenho de tilápias alimentadas com diferentes níveis de ácido cítrico na dieta produzidas em sistema de biofloco.

Tratamentos	Parâmetros (g)			
	Peso Fígado	Peso Intestino	I. Hepático	I. Intestino
0,0	0.3654	0.7086	4.0812	7.8731
50 mg/Kg	0.4145	0.8240	3.6553	7.2405
100 mg/Kg	0.3491	0.7003	3.1929	6.4338
150 mg/Kg	0.3054	0.7119	2.5861	5.9175
200 mg/Kg	0.3491	0.7078	3.1107	6.3294
V. P	0.3624	0.7130	0.0525	0.1197
C.V	20,34%	19,64%	19,70%	15,72%

I. Hepático = Índice hepático, I. Intestino = Índice Intestinal, V. P = valor de  $p < 0,05$ , C.V = Coeficiente de variação.

Tabela 5 - Análise do plasma sanguíneo de tilápias alimentadas com diferentes níveis de inclusão de ácido cítrico na dieta produzidas em sistema de biofoco.

Parametros - Unidade	Nível de inclusão					C.V
	0,0	50 mg/Kg	100 mg/Kg	150 mg/Kg	200 mg/Kg	
<b>ROS</b> U DCFH/mL	15,94 x 10 <sup>6</sup> a	4,82 x 10 <sup>6</sup> b	3,80 x 10 <sup>6</sup> b	3,45 x 10 <sup>6</sup> b	8,29 x 10 <sup>6</sup> b	4,03
<b>GST</b> μmol CDNB/min/mL	164,27 <sup>b</sup>	174,01 <sup>b</sup>	170,42 <sup>b</sup>	266,71 <sup>a</sup>	135,65 <sup>b</sup>	22,04
<b>NPSH</b> Mmol NPSH/mL	31,833 <sup>c</sup>	36,308 <sup>b c</sup>	42,582 <sup>a b</sup>	51,536 <sup>a</sup>	42,545 <sup>a b</sup>	18,94

Médias não seguidas por mesma letra minúscula na horizontal diferem pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade. ROS = Espécies reativas ao oxigênio, GST = enzima Glutathione S-Transferase, NPSH = tióis não proteicos, CV = coeficiente de variação.

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A adição do ácido cítrico nas dietas de tilápia do Nilo em sistema de biofloco apresentou efeitos positivos nos parâmetros zootécnicos de desempenho. Também foi capaz de melhorar status antioxidante, reduziu a quantidade de (ROS) e elevou os níveis de (NPSH e GST) sanguíneo. Com tudo, estes resultados não são suficientes para elucidar todas as vias de ação do aditivo testado, sendo necessário maiores investigações. Estudos voltados à nutrição de organismos aquáticos são extremamente importantes para melhorar a eficiência do crescimento, e ao mesmo tempo identificar alimentos alternativos que supram a necessidade dos animais com o menor custo.

#### 4. REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO

ABDEL-TAWWAB, M. *et al.* Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture Research**, v. 298, p. 267-274, jan., 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.10.027>>. Acesso em: 30 set. 2020.

ABDEL-TAWWAB, M.; AHMAD, M. H. Effect of dietary protein regime during growth period on growth performance, feed utilization and body chemical composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) **Aquaculture Research**, v. 40, n. 13, p. 1532-1537, set., 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02254.x>>. Acesso em: 30 set. 2020.

ABIMORAD, E. G. *et al.* Silagem de peixe em ração artesanal para tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 5, p. 519-525, maio, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000500012>>. Acesso em 01 out. 2020.

HERNÁNDEZ, A. J.; SATOH, S.; KIRON, V. Supplementation of citric acid and chelated trace elements with amino acids in a diet low in fishmeal for rainbow trout affects the growth and use of phosphorus. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 43, p. 688-696, out., 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00589.x>>. Acesso em: 29 jan. 2021.

AVNIMELECH, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in quaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, p. 227-235, jun., 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X)>. Acesso em 07 out. 2020.

AVNIMELECH, Y. Tilapia production using biofloc technology - saving water, waste recycling improves economics. **Global Aquaculture Advocate**, p. 66-68, Maio/Jun., 2011. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/285805143\\_Tilapia\\_production\\_using\\_biofloc\\_technology\\_saving\\_water\\_waste\\_recycling\\_improves\\_economics](https://www.researchgate.net/publication/285805143_Tilapia_production_using_biofloc_technology_saving_water_waste_recycling_improves_economics)> . Acesso em: 06 out. 2020.

AVNIMELECH, Y., KOCHBA, M. Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in biofloc tanks, using 15N tracing. **Aquaculture**, v. 287, 163-168, fev., 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.009>>. Acesso em: 07 out. 2020.

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, p. 29-35, out., 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.036>>. Acesso em: 10 out 2020.

BARBOSA, A. C. L. **Estudo das interações isoflavonas e proteínas da soja: efeitos sobre a digestibilidade e capacidade antioxidante.** Tese (doutorado) faculdade de ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, 140 p., 2008. Disponível em: <[https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-05122016-172803/publico/ANA\\_CRISTINA\\_LOPES\\_BARBOSA\\_DOUTORADO.pdf](https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-05122016-172803/publico/ANA_CRISTINA_LOPES_BARBOSA_DOUTORADO.pdf)>. Acesso em: 14 jan. 2021.

BARUAH, K. *et al.* Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude protein level on mineral utilization by rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), juveniles. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, n. 2, p. 238-249, jun., 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00092.x>>. Acesso em: 01 nov. 2020.

BOSSIER, P.; EKASARI, J. Biofloc technology application in aquaculture to support sustainable development goals. **Microbial Biotechnology**. V., 10, p. 1012-1016, jul., 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12836>>. Acesso em: 10 out. 2020.

CASTILLO, S. *et al.* Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus* **Aquaculture**, v. 433, p. 6-12, set., 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.038>>. Acesso em: 10 out. 2020.

CRIVELENTI, L. Z. *et al.* Piscicultura superintensiva associada à hidroponia em sistema de recirculação de água. **Archives of Veterinary Science**, v.14, n. 2, p.109-116, 2009. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/13365/11159>>. Acesso em: 21 jan. 2021.

CYRINO, J. E. P. *et al.* A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 68-87, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/rbz/v39sspe/09.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2020.

DE FREITAS, J. M. A. *et al.* Proteína e energia na dieta de jundiás criados em tanques-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 12, p. 2628-2633, mar. 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/rbz/v40n12/02.pdf>>. Acesso em: 14 out. 2020.

DE FREITAS, L. S. *et al.* Avaliação de ácidos orgânicos em dietas para leitões de 21 a 49 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1711-1719, abr., 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v35n4s0/a19v354s.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2020.

FREITAS, V. P.; ODONÉ, S. J. Poluição ambiental por espécies exóticas invasoras. Lusíada. **Direito e Ambiente**, N. 2-3, p. 263-285, 2015. Disponível em: <<http://revistas.lis.ulsiada.pt/index.php/lda/article/view/2139/2258#>>. Acesso em: 14 jan. 2021.

EMERENCIANO, M. G. C. *et al.* Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. **InTech open science, open minds**, v. 1, p. 91-109, jan., 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/66416>>. Acesso em: 15 out. 2020.

EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G.; CUZON, G. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. **InTech open science, open minds**, v. 12, p. 301-327, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/53902>>. Acesso em: 16 out 2020.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture**, 243 p., 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/i3720e/i3720e.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2020.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**, 226 p., 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/i5555s/i5555s.pdf>>. Acesso em: 11 maio. 2020.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of Food and Agriculture**, 182 p., 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/ca6030en/ca6030en.pdf>>. Acesso em: 15b jan. 2021.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. 244 p., 2020. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/ca9229en/CA9229EN.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2021.

FURUYA, W. M. *et al.* Aplicação do conceito de proteína ideal para redução dos níveis de proteína em dietas para tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1433-1441, 2005. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/rbz/v34n5/26622.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2020.

GHELER, T. R. *et al.* Uso de ácido benzóico na dieta de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 11, p. 2182-2187, Pirassununga, SP, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v38n11/a16v3811.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2020.

HARIKRISHNAN, R. *et al.* Protective effect of herbal and probiotics enriched diet on haematological and immunity status of *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel) against *Edwardsiella tarda*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, p. 886-893. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.01.013>>. Acesso em: 12 nov. 2020.

HOSSAIN, M. *et al.* Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream (*Pagrus major*). **Fisheries Science**, v. 73, n. 1, p. 1309–1317, Toquio – Japão, jun., 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01469.x>>. Acesso em: 01 nov. 2019.

IBRAHIM, E. R. *et al.* The effects of chitosan-vitamin C nanocomposite supplementation on the growth performance, antioxidant status, immune response, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. **Aquaculture**, v 534, p. 12-23, mar. 2021. Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736269>>. Acesso em 21 mar 2021.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Kubitza, 289 p. 2011.

KUBITZA, F. **Panorama da aquicultura**. V.18, nº 11, Nov/Dez. 2008. Disponível em: <[http://www.acquaimagem.com.br/docs/Pan110\\_Kubitza.pdf](http://www.acquaimagem.com.br/docs/Pan110_Kubitza.pdf)>. Acesso em: 11 maio. 2020.

KUHN, D. D. *et al.* Microbial flocc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. **Aquaculture**, v. 296, p. 51–57. 585, nov. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.07.025>>. Acesso em: 12 set 2020.

LI, J. S. *et al.* Effects of non-starch polysaccharides enzyme, phytase and citric acid on activities of endogenous digestive enzymes of tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis*

*aureus*) **Aquaculture Nutrition**, v. 15, p. 415-420, ago., 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00606.x>>. Acesso em: 17 nov. 2020.

LI, P. *et al.* New developments in fish amino acid nutrition: Towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino Acids**, v. 37, p. 43-53, 2009. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-008-0171-1>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

LIM, C. *et al.* Organic acids and their salts. Dietary Nutrients, **Additives, and Fish Health**. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9781119005568.ch15>>. Acesso em: 15 jan. 2021.

LEE, C. S. *et al.* **Dietary Nutrients, Additives and Fish Health**. Wiley Blackwell p. 305-315, 2015. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=6jT-CAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA249&dq=Webster+\(Eds.\),+Dietary+Nutrients,+Additives+and+Fish+Health,+Wiley-Blackwell&ots=e3OSBsxa5S&sig=AyadFEeaiHo2jXcGrT90fcF7TMA#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=6jT-CAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA249&dq=Webster+(Eds.),+Dietary+Nutrients,+Additives+and+Fish+Health,+Wiley-Blackwell&ots=e3OSBsxa5S&sig=AyadFEeaiHo2jXcGrT90fcF7TMA#v=onepage&q&f=false)>. Acesso em: 21 jan. 2021.

MAIOKA, A. *et al.* Emprego de uma mistura de ácidos fumárico, láctico, cítrico e ascorbico em dietas iniciais de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 91, n. 1, p. 31-37, Curitiba – PR, 2004. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/4043/3274>>. Acesso em 01 nov. 2020.

MARISCAL-LAGARDA, M. M. *et al.* Integrated culture of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) with low salinity groundwater: management and production. **Aquaculture**, v. 366-367, p. 76-84, nov., 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.003>>. Acesso em 15 jan. 2021.

MEDEIROS, F. **Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2018**: Veículo oficial da Associação Brasileira da Piscicultura. São Paulo, 2018. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario2018/>>. Acesso em: 11 maio. 2020.

MEDEIROS, F. **Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2019**: Veículo oficial da Associação Brasileira da Piscicultura. São Paulo, 2019. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/Anuario2019/AnuarioPeixeBR2019.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2020.

MOREIRA, H. L. M. *et al.* Espécies exóticas. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: Ulbra, p. 91-121. 2001. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?id=7mW0cYMJKc8C&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?id=7mW0cYMJKc8C&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)>. Acesso em: 25 jan. 2021.

RINALDI, M. M. *et al.* Utilização de ácido cítrico para a conservação pós-colheita de raízes de mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/bjft/v20/1981-6723-bjft-20-e2017072.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2021.

SALVADOR, R. *et al.* Isolation of *Streptococcus* spp. from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and quality of water in hapas nets in North Region of Parana State, Brazil. **Semina**:

**ciências agrárias**, v. 24, n. 1, p. 35-42, 2003. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2003v24n1p35>>. Acesso em: 09 dez. 2020.

SARKER M. S. A. *et al.* Supplementation effect(s) of organic acids and/or lipid to plant protein-based diets on juvenile yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck et Schlegel 1845, growth and, nitrogen and phosphorus excretion. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 538-545, mar., 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02859.x>>. Acesso em: 25 out. 2020.

SARKER, M. S. A. *et al.* Inclusion of citric acid and/or acid- chelated trace elements in alternate plant protein source diets affects growth and excretion of nitrogen and phosphorus in red sea bream *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 262, n. 2, p. 436- 443, fev., 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.007>>. Acesso em 01 nov. 2020.

SCORVO FILHO, J. D. *et al.* Custo operacional de produção da criação de tilápias vermelha da flórida e tailandesa em tanques-rede de pequeno volume. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 36, n. 10, p. 71-79, 2006. Disponível em:  
<<http://www.iea.sp.gov.br/ftp/iea/2006/tec5-1006.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2021.

SGNAULIN, T. **Nutrição de tilápias (linhagem gift) em sistemas de bioflocos: é possível otimizar os níveis proteicos e energéticos na fase de berçário?** Dissertação (mestrado) universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 65 p., 2019. Disponível em:  
<<http://sistemabu.udesc.br/pergamumweb/vinculos/000077/00007746.pdf>>. Acesso em: 29 jan. 2021.

SILVA, M. *et al.* Crude protein levels in diets for two growth stages of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in a biofloc system. **Aquaculture Research**, v. 49, p. 2693-2703, Ago., 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/are.13730>>. Acesso em: 13 nov. 2020.

SILVA, M. S. G. M. **Aquicultura: manejo e aproveitamento de efluentes**. Embrapa Meio Ambiente, 39 p., 2013. Disponível em:  
<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/972692/1/Doc95.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2021.

STOSIK, M. *et al.* Phagocytic and bactericidal activity of blood thrombocytes in carps (*Cyprinus carpio*). **Veterinárni Medicína**, v.47, p. 1,21-25, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.17221/5798-VETMED>>. Acesso em: 20 dez. 2020.

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. Disponível em: <<https://www.pesca.sp.gov.br/TilapiculturaEntraves2013.pdf>>. Acesso em: 13 dez. 2020.

TINH, T.H. *et al.* Effects of carbohydrate addition frequencies on biofloc culture of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v.534, p.7-20, mar., 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736271>>. Acesso em 25 mar. 2021.

TURCHINI, G. M.; TRUSHENSKI, J. T.; GLENCROSS, B. D. Thoughts for the future of aquaculture nutrition: realigning perspectives to reflect contemporary issues related to judicious use of marine resources in aquafeeds. **Aquaculture**, v. 81, p. 13-39, jan., 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/naaq.10067>>. Acesso em: 25 ago. 2020.

VIADANNA, P. H. O. **Uso de imunoestimulante *Saccharomyces cerevisiae* em peixes da espécie *Cyprinus carpio***. Dissertação apresentada no Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental e comparada. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de patologia, Universidade de São Paulo. 2012. Disponível em: <[https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-23052013-141853/publico/PEDRO\\_HENRIQUE\\_DE\\_OLIVEIRA\\_VIADANNA\\_Corrigida.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-23052013-141853/publico/PEDRO_HENRIQUE_DE_OLIVEIRA_VIADANNA_Corrigida.pdf)>. Acesso em: 13 nov. 2020.

VIOLA, E. S.; VIEIRA, S. L. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 1097- 1104, Porto Alegre – RS, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v36n4s0/16.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2020.

WATANABE, W.O. Tilapia Production Systems in the Americas: Technological Advances, Trends, and Challenges. **Reviews in Fisheries Science**, v. 10, p. 465-498, jul. 2002. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/237777002\\_Tilapia\\_Production\\_Systems\\_in\\_the\\_Americas\\_Technological\\_Advances\\_Trends\\_and\\_Challenges](https://www.researchgate.net/publication/237777002_Tilapia_Production_Systems_in_the_Americas_Technological_Advances_Trends_and_Challenges)>. Acesso em: 15 nov. 2020.

WEI, Y.; LIAO, S.; WANG, A. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. **Aquaculture**, v. 465, p. 88-93, dez. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.040>>. Acesso em: 15 set. 2020.

WILD, M. B. *et al.* 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. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/269925628\\_Probiotico\\_dietetico\\_em\\_sistemas\\_de\\_producao\\_de\\_tilapia\\_do\\_Nilo\\_efeitos\\_sobre\\_o\\_crescimento\\_balanco\\_de\\_N\\_e\\_P\\_retencao\\_d\\_e\\_nutrientes\\_e\\_viabilidade\\_economica](https://www.researchgate.net/publication/269925628_Probiotico_dietetico_em_sistemas_de_producao_de_tilapia_do_Nilo_efeitos_sobre_o_crescimento_balanco_de_N_e_P_retencao_d_e_nutrientes_e_viabilidade_economica)>. Acesso em: 23 dez. 2020.

ZHANG, H. *et al.* Effects of dietary citric acid on growth performance, mineral status and intestinal digestive enzyme activities of large yellow croaker *Larimichthys crocea* (Richardson, 1846) fed high plant protein diets. **Aquaculture**, v. 453, n. 1, p. 147-153, fev., 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004484861530260X>>. Acesso em: 01 nov. 2020.

## 5. CARTA DE APROVAÇÃO DO CETEA



**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 "O uso de diferentes fontes de ácidos cítrico durante a produção de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) pode melhorar o desempenho dos peixes?", protocolada sob o CEUA nº 2649171219 (ID 001299), sob a responsabilidade de **Diogo Luiz de Alcantara Lopes e equipe; 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 12/03/2021.

We certify that the proposal "Can the use of different sources of citric acids during tilapia do nilo (*Oreochromis niloticus*) production improve fish performance?", utilizing 1440 Fishes (1440 males), protocol number CEUA 2649171219 (ID 001299), under the responsibility of **Diogo Luiz de Alcantara Lopes and team; 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 03/12/2021.

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

Vigência da Proposta: de [01/2020](#) a [12/2021](#) Área: [Zootecnia](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Peixes](#) sexo: [Machos](#) idade: [1 a 6 meses](#) N: [1440](#)

Linhagem: [Oreochromis niloticus](#) 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, 18 de abril de 2021

José Cristani

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

Pedro Volkmer de Castilhos

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