



UNICAMP UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

PATRICIA DA SILVA DIAS

Estudo da farinha de folhas nas dietas de peixes: amoreira para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e de ora-pro-nóbis para pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

CAMPINAS

2024

PATRICIA DA SILVA DIAS

Estudo da farinha de folhas nas dietas de peixes: amoreira para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e de ora-pro-nóbis para pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutora em Biologia Animal.

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Mayumi Ishikawa.

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Meurer.

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELA ALUNA PATRICIA DA SILVA DIAS, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MÁRCIA MAYUMI ISHIKAWA.

Campinas

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

D543e Dias, Patricia da Silva, 1995-
Estudo da farinha de folhas nas dietas de peixes : amoreira para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e de ora-pro-nóbis para pacu (*Piaractus mesopotamicus*) / Patricia da Silva Dias. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador(es): Marcia Mayumi Ishikawa.
Coorientador(es): Fábio Meurer.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Aquicultura. 2. Desempenho. 3. Digestibilidade. 4. Toxicologia aquática.
I. Ishikawa, Marcia Mayumi. II. Meurer, Fábio, 1973-. III. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Study of leaf meal in fish diets : mulberry for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and ora-pro-nóbis for pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Palavras-chave em inglês:

Aquaculture

Performance

Digestibility

Aquatic toxicology

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Doutora em Biologia Animal

Banca examinadora:

Marcia Mayumi Ishikawa [Orientador]

Marlene Tiduko Ueta

Renata Guimarães Moreira Whitton

Marcos Tavares Dias

Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz

Data de defesa: 17-10-2024

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5161-9693>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7697986281641172>

Campinas, 17 outubro de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Mayumi Ishikawa

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta

Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton

Profa. Dra. Sônia Claudia do Nascimento de Queiroz

Prof. Dr. Marcos Tavares Dias

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Animal da Unidade do Instituto de Biologia.

“Nunca deixe que alguém lhe diga que não pode fazer algo. Se você tem um sonho, tem que protegê-lo. As pessoas que não podem fazer por si mesmas, dirão que você não consegue. Se quer alguma coisa, vá e lute por ela.”

Frase do filme À Procura da Felicidade

DEDICATÓRIA

A minha querida avó Inez Eduardo Lemes (*in memoriam*), cujo empenho em orações sempre veio em primeiro lugar, e me ensinou como se reerguer diante das adversidades da vida, estando sempre ao meu lado, a maior incentivadora desde o início.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS por me orientar nos momentos mais difíceis desta jornada quando pensei em desistir, e também por me ter dado paciência, discernimento e forças quando eu não acreditava no meu potencial.

À minha família, que não mediu esforços para me apoiar e me ajudar a chegar até aqui, em especial, a minha mãe (Maria de Fátima – Nena) e minha tia (Neide Regina) que são exemplos de pessoas fortes, guerreiras e determinadas, que fizeram as coletas das folhas quando eu não estava presente. Agradeço por me ensinarem a importância de sonhar que nada é impossível, dando o que temos de melhor, com amor em cada coisa que fazemos e permanecendo fiéis em nosso propósito e, ainda que desistir nunca esteja no nosso vocabulário, pois dificuldades e obstáculos sempre estarão no caminho, basta ser determinado e vencer cada um deles.

A minha avó (Inêz) que não mediu esforços nas orações para que Deus me guiasse sempre. Ela, mesmo sem entender profundamente sobre os experimentos, estava sempre disposta a perguntar sobre eles e a torcer pelos resultados, sua dedicação e apoio constante foram fundamentais.

A professora Dr. Márcia Mayumi Ishikawa, minha profunda gratidão por ter a oportunidade de tê-la como orientadora. Seu exemplo de simplicidade, compreensão e competência me inspira imensamente. Agradeço não apenas pelas orientações acadêmicas, mas também pelas valiosas conversas e conselhos que foram muito além de sua responsabilidade e obrigações como orientadora. Sua dedicação e profissionalismo são verdadeiros exemplos a serem seguidos.

Ao professor Dr. Fábio Meurer, sou profundamente grata pela oportunidade de continuar sob sua orientação, agora como coorientador. É um grande orgulho de citá-lo como um dos responsáveis pela minha formação profissional um dos pilares da minha carreira como pesquisadora. Agradeço profundamente por toda a confiança, amizade, pelos inúmeros valiosos conselhos ao longo dessa jornada, e claro a paciência que não foi pouca para me ensinar e lidar com meu comportamento ao longo deste período. Sua capacidade de orientar com compreensão, dedicação, temperamento forte, que

pode até intimidar, e sua honestidade em não deixar enrolações são admiráveis e me ajudaram a crescer.

E, claro, minha gratidão também à sua esposa, minha “mãe científica” Ledinha, que sempre me ajudou nas análises desde o mestrado, oferecendo sabedoria e carinho. Lembro-me bem das vezes em que eu estava em apuros com os cálculos de química das análises, me descabelando, e você Leda, com toda a sua calma e tranquilidade, estava sempre disposta a me ensinar e explicar passo a passo, garantido minha compreensão, sempre esteve ao meu lado, me ajudando em momentos de dificuldades. Mesmo não fazendo parte da minha orientação formal, estava sempre presente nos bastidores, proporcionando suporte e compartilhando momentos de conversas, além dos momentos de passeios inesquecíveis. Leda é um exemplo inspirador de mulher, mãe e pesquisadora. Juntos, vocês me acolheram como uma família, da UFPR para a vida.

Ao pesquisador Dr. Julio de Queiroz, minha gratidão pela oportunidade de poder trabalhar ao lado de uma referência na área de qualidade de água, agradeço pelos valiosos ensinamentos, conselhos e pela amizade.

Ao pesquisador Ms. Marcos Losekann, obrigado pelas assistências nos experimentos, pelas ideias nos delineamentos, pelos conselhos e conversas enriquecedoras durante os dias que permaneci na Embrapa.

A equipe do LATAq (Rafa, Jailson e Émerson), que sempre estavam dispostos a me ajudar e auxiliar nos processamentos de rações e análises. Não posso deixar de citar o Fabiano, o segurança, que é mais um IC do que muitos no laboratório, sempre disposto a ajudar nas coletas. Também agradeço aos colegas que durante esse período compartilharam momentos de alegrias, experiências, descobertas, dificuldades e muito aprendizado e conhecimentos, cada um de vocês acrescentou algo na minha formação profissional e pessoal.

E, é com muito carinho que agradeço a todos os meus colegas e amigos da EMBRAPA, pessoas especiais, que mesmo ocupadas em seus próprios trabalhos, sempre tiveram um tempinho para me ajudar em uma análise qualquer, discutir uma hipótese, tomar um cafezinho ou compartilhar um momento de diversão. Em especial à Itala, Danaya e Gabi, que além de estar comigo em todos os momentos, sempre mantiveram minha alegria constante durante nossos almoços, companheira de dificuldades, chocolates

compartilhados e pelos inúmeros momentos de diversão nos intervalos da pesquisa na “nossa” sala. Também à toda equipe de analistas e técnicos pela ajuda durante os experimentos, minha eterna gratidão pelo apoio e por permanecerem ao meu lado.

À Ilza e toda a sua equipe da UNIFAJ, minha profunda gratidão pelo conhecimento compartilhado e disponibilidade de tempo em ajudar nas minhas análises. Sempre que havia algo que vocês não sabiam, se empenhavam em buscar as informações necessárias.

À Professora Dr^a. Clarice Arns, minha imensa gratidão por me acolher com um carinho gigantesco, mesmo sem me conhecer. Ao longo do PED, tivemos a oportunidade de nos conhecer melhor, e você me apresentou à sua equipe do laboratório, que é composta por pessoas maravilhosas que, assim como você, me acolheram e fizeram com que eu me sentisse parte do laboratório, mesmo não sendo oficialmente integrante. É uma equipe incrível que sempre que tenho a oportunidade, estou no laboratório para trocar ideias, ter conversas, receber conselhos e até participar de passeios em feiras científicas. Fico feliz em ser lembrada até nas festinhas do laboratório, o que faz com que eu me sinta acolhida e valorizada. Sou profundamente grata pelo apoio que recebi para a finalização das análises, a escrita da tese, a torcida para a defesa, e também pela motivação para o pós-doutorado. O convívio e o acolhimento da professora me inspiraram a querer fazer parte do laboratório oficialmente. Professora Clarice, não tenho palavras para descrever o quanto sou grata e o carinho que sinto pela senhora, que, mesmo sem me conhecer, me abraçou como mais uma “filha científica”.

A Gaby amiga de pensionato, parceira nos dias mais intensos, obrigada por estar sempre presente quando precisei. Você foi a primeira pessoa que conheci do pensionato ao chegar em Campinas, e mesmo não morando mais juntas, sei que sempre poderei contar contigo, assim como, você comigo. Sou imensamente grata por todo o apoio que me deu, as noites de conversas, os almoços e jantares que compartilhamos em meios aos nossos perrengues, as idas à academia, as noites de diversão em casa entre nós, muito obrigado por fazer parte deste ciclo tão importante e especial.

Agradeço também com muito carinho aos amigos que estiveram sempre comigo do “lado de fora”, compartilhando as alegrias e as tristezas, os

momentos bons e ruins. Um abraço especial a Lídia Cavalcante, minha amiga de viagem, passeios, treinos e noites de conversas, e não poderia deixar meu agradecimento a minha segunda família de coração a Bruna, Pedro e Jacqueline Camini, que me acolheram imensamente como família.

E não posso deixar de expressar minha gratidão ao meu grupo de amigas da infância. Mesmo distantes e sem o contato diário que costumávamos ter, sabemos que sempre poderemos contar umas com as outras. A torcida mútua é constante, e cada vitória é comemorada por todas. Colegas, amigas e irmãs de coração que, mesmo em áreas tão diversas, estão sempre prontas para ajudar. Amo vocês.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, expressei minha eterna gratidão!

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

RESUMO

Este estudo investigou o potencial das farinhas de folhas de amoreira (FFA) e ora-pro-nóbis (FFO) como ingredientes alternativos em rações para peixes. A pesquisa avaliou a digestibilidade de FFA e FFO para *Piaractus mesopotamicus* (Pacu) e os efeitos da FFA no desempenho, saúde e qualidade da água para *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo). Além disso, analisou a resposta fisiológica ao desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*, e ensaios de toxicidade em microcrustáceos (*Daphnia Magna*) e embrião de peixes zebrafish (*Danio rerio*). Para o Coeficiente de Digestibilidade aparente (CDA) foram utilizados 150 juvenis de pacu, durante 104 dias. O método utilizado foi indireto de coleta parcial de excreta com óxido crômico como marcador inerte. As dietas foram formuladas com 70% de ração referência e 30% do ingrediente testado. Foram realizadas análises químico-bromatológicas das fezes, das rações e dos ingredientes para valores de proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria seca (MS), cinzas, FDA (Fibra de Detergente Ácido) e FDN (Fibra de Detergente Neutro), aminoácidos e minerais. Para avaliação do desempenho dos juvenis de tilápia do Nilo foram utilizados 240 indivíduos, durante 60 dias. Para avaliar o efeito de diferentes níveis crescentes de inclusão de FFA (0, 6, 16 e 24%), foram medidos parâmetros de desempenho zootécnico, índices viscerossomáticos (IVS), índice de gordura visceral (IGV) e índice hepatossomático (IHS), avaliação de composição centesimal. Além das análises hematológicas e bioquímicas do sangue. O desafio com *A. hydrophila* foi realizado simultaneamente em unidades diferentes, utilizando 6% FFA e 32% FFO. Foram utilizados 60 animais para cada espécie, sendo que os pacus e as tilápias foram alimentados, respectivamente, durante 45 e 40 dias. Foram realizadas as mesmas análises de sangue do ensaio de desempenho para os pacus, porém, para as tilápias apenas a sobrevivência foi observada. Os testes agudos de toxicologia das plantas foram realizados com organismos testes, normalmente, utilizados como biomarcadores. Os testes foram realizados em placas de polietileno de 12 poços para *D. magna* durante 48h, e 24 poços para embrião de zebrafish em 96h. As conclusões deste estudo revelaram que a inclusão das farinhas de FFA e FFO nas dietas de pacu e tilápia do Nilo mostrou-se promissora para a digestibilidade. Além disso, a FFA não

comprometeu o crescimento das tilápias, resultando em benefícios para a saúde dos animais. As dietas contendo 6% de FFA e 32% de FFO melhoraram a resposta imunológica de ambas as espécies frente ao desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*, evidenciando, melhorias na sobrevivência. Embora, as farinhas de FFA e FFO não terem apresentado valores de CE_{50-48h} para *D. magna*, a CL_{50} para embriões de zebrafish foi de 562,25 mg/L⁻¹ para FFA e 613,74 mg/L⁻¹ para FFO, indicando baixa toxicidade para as farinhas. No entanto, os compostos polifenólicos presentes na composição das farinhas podem ter efeitos adversos, principalmente, no desenvolvimento dos embriões de zebrafish e nas taxas de eclosão.

Palavras-chaves: Aquicultura; Desempenho; Digestibilidade; Ecotoxicologia.

ABSTRACT

This study investigates the potential of mulberry leaf meal (FFA) and ora-pro-nóbis meal (FFO) as alternative ingredients in fish diets. The research evaluated the digestibility of FFA and FFO for *Piaractus mesopotamicus* (pacu) and the effects of FFA on the performance, health, and water quality of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). Additionally, it analyzed the physiological response to bacterial challenge with *Aeromonas hydrophila* and conducted ecotoxicity tests using microcrustaceans (*Daphnia magna*) and zebrafish embryos (*Danio rerio*). For the apparent digestibility coefficient (ADC), 150 juvenile pacu were studied over 104 days using an indirect method of partial feces collection with chromic oxide as an inert marker. Diets were formulated with 70% reference feed and 30% of the tested ingredient. Chemical-bromatological analyses were performed on feces, feeds, and ingredients to determine crude protein (CP), ether extract (EE), dry matter (DM), ash, acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF), amino acids, and minerals. For the performance assessment of juvenile Nile tilapia, 240 individuals were used over 60 days. The study evaluated the effects of increasing levels of FFA inclusion (0%, 6%, 16%, and 24%) on zootechnical performance parameters, viscerosomatic index (VSI), visceral fat index (VFI), hepatosomatic index (HSI), and centesimal composition, along with hematological and blood biochemical analyses. The challenge with *A. hydrophila* was conducted simultaneously in separate units, using 6% FFA and 32% FFO, with 60 individuals for each species. Feeding lasted 45 days for pacu and 40 days for tilapia. The same blood analyses performed during the performance trial were applied to pacu, while survival analysis was conducted for tilapia. The acute toxicity tests for the plant-based flours used test organisms commonly applied as biomarkers. These tests were performed using 12-well polyethylene plates for *D. magna* over 48 hours and 24-well plates for zebrafish embryos over 96 hours. The study concluded that the inclusion of FFA and FFO flours in pacu and Nile tilapia diets was promising for digestibility. FFA did not compromise tilapia growth and provided health benefits for the animals. Diets containing 6% FFA and 32% FFO improved the immune response of both species against the *A. hydrophila*

challenge, enhancing survival rates. Although FFA and FFO flours did not yield EC50-48h values for *D. magna*, the LC50 for zebrafish embryos was 562.25 mg/L for FFA and 613.74 mg/L for FFO, indicating low toxicity. However, the polyphenolic compounds in the flours' composition may have adverse effects, particularly on zebrafish embryo development and hatching rates.

Keywords: Aquaculture; Performance; Digestibility; Ecotoxicology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Espécime de juvenil de *Oreochromis niloticus* e esquema indicando algumas estruturas morfológicas e medidas utilizadas neste trabalho, tais como, comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP).....33
- Figura 2** – Espécime juvenil de *P. mesopotamicus* e esquema indicando algumas estruturas morfológicas e medidas utilizadas neste trabalho, tais como, comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP).....36
- Figura 3** – **A)** Espécime de *Morus alba*; **B)** Talos colhidas..... 39
- Figura 4** – **A)** Espécime *Pereskia Aculeata*; **B)** Talos colhidas..... 42
- Figura 5** – Espécime de *Daphnia magna* adulta.....52
- Figura 6** – Espécie adulta de *Danio rerio*53
- Figura 7** – Estrutura física do sistema modular de aquários utilizados nos ensaios: **A)** linhas 1, 2 (atrás da linha 1), e linha 3 aquários da parte de baixo utilizados como “tanques de cultivo”, aquários da parte de cima usados para a recirculação de água do sistema; **B)** Linha 3 e 4; **C)** Sistema de caixas das linhas para filtração e recirculação da água do sistema (biofiltros), da esquerda para a direita correspondem as linhas 1, 2, 3 e 4, as caixas maiores do meio (capacidade de 1.000L), reservatórios do sistema.....94
- Figura 8** – Material usado como substrato para os biofiltros o: **A)** cerâmicas porosas utilizadas nos biofiltros dos sistemas de filtragem da água; **B)** manta de acrílica (Perlon).....95
- Figura 9** – Relação da variação dos parâmetros de qualidade de água medidos durante o ensaio: temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade..... 103
- Figura 10** – Estrutura experimental, composta por quatro linhas de duas caixas de água de polietileno de 1.000 litros, dois tanques-rede e um biofiltro..... 128
- Figura 11** – Embalagem de nylon com aproximadamente 500g de carvão ativado..... 128
- Figura 12** – Exemplar de juvenil de pacu (*P. mesopotamicus*) recebendo a injeção com inoculação da solução (cepa TR3 + salina 0,9%) na região intraperitoneal 131
- Figura 13** – Parâmetros físico-químicos de qualidade de água medidos durante o experimento: temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade.....133

- Figura 14** – Parâmetros físico-químicos de qualidade de água medidos durante o experimento: nitrito, nitrato e amônia 134
- Figura 15** – Espécime de Juvenis de *P. mesopotamicus* coletados após alimentação com as dietas experimentais. **A)** grupo comercial e controle com coloração mais clara, principalmente, na região inferior da coloração amarelo Próximo a nadadeira peitoral e pélvica; **B)** grupos de FFA (farinha de folha e amoreira) e FFO (farinha de folha de ora-pro-nóbis), com coloração mais intensa nas regiões inferiores..... 135
- Figura 16** – Sinais clínicos de aeromonose com alterações macroscópicas de hemorragia cutâneas, **A:** Boca; **B:** Hifema; **C:** Nadadeira peitoral; **E:** Nadadeira pélvica; **F:** Nadadeira Dorsal; **G:** Nadadeira anal e **H:** Nadadeira caudal..... 135
- Figura 17** – Tubos capilar de micro-hemátrocito após centrifugação, separação do plasma, leucócitos e hemácias, diferenças na coloração do plasma entre as dietas, **A:** Comercial; **B:** FFO; **C:** Controle e **D:** FFA..... 136
- Figura 18** – Variação na porcentagem de componentes bioquímicos do sangue de juvenis de pacu submetidos ao desafio com bactérias após alimentação de 45 dias com diferentes tipos de dietas..... 140
- Figura 19** – Distribuição dos resultados em duas dimensões principais demonstrando a dispersão entre os diferentes clusters identificados. Cada ponto no gráfico representa uma observação, e a cor e o formato dos pontos indicam qual cluster (1 – comercial; 2 – 32% FFO; 3 – Controle e 4 – 6% FFA)..... 141
- Figura 20** – Espécime de juvenil de tilápia do Nilo recebendo a injeção com inoculação da solução (cepa TR3 + salina 0,9%) na região intraperitoneal 151
- Figura 21** – Regressão linear ajustada com limites de confiança e 95% para a relação entre a concentração de FFA (A) e FFO (B) e o desenvolvimento dos embriões de zebrafish..... 167

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição percentual das dietas: Ref. (Referência) e FFA (Farinha de folha de amoreira), FFO (Farinha de folha de ora-pro-nóbis).....	71
Tabela 2 – Composição bromatológica dos nutrientes e energia da FFA e FFO	78
Tabela 3 – Composição de minerais das FFA e FFO	79
Tabela 4 – Composição do perfil de aminoácidos da FFA (%)	80
Tabela 5 – Composição do perfil de aminoácidos da FFO (%).....	81
Tabela 6 – Composição bromatológica de nutrientes, energia e minerais analisada das dietas: Ref. e Teste 1 – FFA, Teste 2 – FFO para o pacu.....	82
Tabela 7 – Composição bromatológica do perfil de aminoácidos analisada das dietas: Ref. e Teste 1 – FFA, Teste 2 – FFO para o pacu.....	83
Tabela 8 – Coeficiente de digestibilidade e disponibilidade aparente dos nutrientes e energia e do perfil de aminoácidos da FFA, FFO para o pacu.....	84
Tabela 9 – Valores digestíveis e disponíveis de nutrientes e energia de FFA, FFO para o pacu.....	85
Tabela 10 – Composição química calculada e analisada das dietas experimentais com níveis crescentes da FFA para juvenis de tilápia do Nilo.....	96
Tabela 11 – Parâmetros zootécnicos de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas crescente contendo FFA	104
Tabela 12 – Parâmetros dos índices corporais de juvenis de tilápia do Nilo submetidos a dietas crescente com inclusão de FFA.....	109
Tabela 13 – Composição química centesimal corporal, carcaça e filé dos juvenis de tilápia do Nilo submetidos as dietas crescentes com a FFA.....	111
Tabela 14 – Composição dos minerais na carcaça e filé dos juvenis de tilápia do Nilo submetidos as dietas crescentes com FFA	112
Tabela 15 – Parâmetros hematológicos dos juvenis de tilápia do Nilo submetidos as dietas crescentes com a FFA.....	113
Tabela 16 – Parâmetros bioquímicos do sangue de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo diferentes níveis de FFA	114

Tabela 17 – Composição química calculada e analisada das dietas experimentais controle, 8% FFA e 32% FFO submetidas a juvenis de pacu..... 129

Tabela 18 – Parâmetros hematológicos de juvenis de pacu submetidos ao desafio com *A. hydrophila* com quatro tipos diferentes de dietas..... 137

Tabela 19 – Parâmetros bioquímicos do sangue de juvenis de pacu submetidos ao desafio com *A. hydrophila* após alimentados com diferentes de dietas.....138

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	22
2. HIPÓTESES	25
3. JUSTIFICATIVA	26
4. OBJETIVOS	27
4.1 OBJETIVO GERAL.....	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
REFERÊNCIAS	29
5 CAPITULO I - REVISÃO LITERATURA	32
5.1 ESPÉCIES EM ESTUDO	33
5.1.1 <i>Oreochromis niloticus</i> – Tilápia do Nilo	33
5.1.2 <i>Piaractus mesopotamicus</i> – Pacu	35
5.2 IMPORTÂNCIA DOS ALIMENTOS ALTERNATIVOS	37
5.2.1 Alimentos alternativos proteicos	38
5.2.1.1 <i>Morus alba</i> – Amoreira	39
5.2.1.2 <i>Pereskia aculeata</i> – Ora-pro-nóbis.....	41
5.3 COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE APARENTE (CDA)	44
5.4 DESEMPENHO ZOOTÉCNICO	45
5.5 HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA	45
5.6 PATÓGENOS EMERGENTES NA PISICULTURA	47
5.6.1 Aeromonose - gênero <i>Aeromonas</i>	48
5.7 ECOTOXICOLOGIA	49
5.7.1 Ensaio de toxicidade aguda.....	50
5.7.1.1 <i>Daphnia magna</i> – Microcrustáceo	51
5.7.1.2 <i>Danio rerio</i> – Zebrafish	52
REFERÊNCIAS	54
6 CAPITULO II - DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES E ENERGIA E DISPONIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS DAS FARINHAS DE FOLHAS AMOREIRA E ORA-PRO-NÓBIS PARA PACU	67
6.1 INTRODUÇÃO	68
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	69

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
6.4 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS	87
7 CAPITULO III – EFEITO DA INCLUSÃO DE FARINHA DE FOLHAS DE AMOREIRA NA DIETA DE JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO.....	91
7.1 INTRODUÇÃO.....	92
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	93
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
7.4 CONCLUSÕES.....	115
REFERÊNCIAS	116
8 CAPITULO IV – EFEITO NOS ÍNDICES HEMATOLOGICOS DE JUVENIS DE PACU SUBMETIDOS A DIFERENTES TIPOS DE DIETAS APÓS DESAFIO COM <i>Aeromonas hydrophila</i>	124
8.1 INTRODUÇÃO.....	125
8.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	127
8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	132
8.4 CONCLUSÃO	142
REFERÊNCIAS	143
9 CAPITULO V – EFEITO NA RESPOSTA IMUNOLOGICA E DIFERENTES DIETAS APÓS DESAFIO COM <i>Aeromonas hydrophila</i> PARA TILÁPIA DO NILO.....	148
9.1 INTRODUÇÃO.....	149
9.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	150
9.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	152
9.4 CONCLUSÃO	154
REFERÊNCIAS	155
10 CAPITULO VI – TESTE AGUDO DE TOXICOLOGIA DE FARINHA DE FOLHA DE AMOREIRA E ORA-PRO-NÓBIS PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS.....	160
10.1 INTRODUÇÃO	161
10.2 MATERIAL E MÉTODOS	163
10.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	165
10.4 CONCLUSÃO.....	169

REFERÊNCIAS	170
11 CONSIDERAÇÕES FINAIS	174
ANEXOS	175

1 INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura é uma das vertentes do setor agropecuário, que envolve a criação de organismos aquáticos em ambientes controlados (FAO, 2020). A piscicultura apresentou um crescimento de 3,1% sobre a produção de 2022, considerando os 10 anos (2014 a 2023) de produção de peixes de cultivos. A média de crescimento anual é de 5,3% (PEIXE BR, 2024).

O panorama atual exige melhorias nas bases tecnológicas da atividade, afim de, assegurar o aumento do desempenho produtivo para atender as crescentes demandas de pescado observadas nas últimas décadas. Dentre elas, destacam-se as boas práticas de manejo relacionadas à nutrição, sanidade, sistemas produtivos e melhoramento genético (BRAZ, 2022).

O crescimento da aquicultura impulsionou a busca por novos ingredientes de alta qualidade e elevados teores nutricionais os quais, remetem a necessidade do desenvolvimento de novos estudos sobre as dietas que apresentem alto desempenho (TURCHINI *et al.*, 2018; CYRINO *et al.*, 2010). O uso de aditivos, que apresentam efeitos benéficos em relação à melhoria da imunidade e ao aumento da produtividade, devido a melhoria da conversão alimentar, redução da taxa de mortalidade e dos impactos ambientais dos efluentes tem se destacado nessa temática (SILVA & GALÍCIO, 2012).

Em relação a importância comercial de espécies para o cultivo, a tilápia é a de maior interesse. A tilápia é uma espécie exótica que ocupa a terceira posição no ranking das mais cultivadas mundialmente (BRAZ, 2022).

A produção brasileira de tilápia em 2023 foi de 579.080 toneladas, representando 65,3% do total dos peixes cultivados, demonstrando sua viabilidade econômica e potencial para expansão em função das excelentes condições para cultivo dessa espécie de peixe no Brasil (PEIXE BR, 2024).

As características geneticamente melhoradas da tilápia, como por exemplo, rápido crescimento e rusticidade, associadas a disponibilidade no mercado de rações comerciais para atendimento das exigências nutricionais para cada fase de crescimento, garantem um pacote tecnológico bem definido. Essas vantagens comparativas com outras espécies de peixes contribuem para o aumento no rendimento do filé e na qualidade da carne, elevando a demanda

do setor de pescado pelos consumidores (MEURER *et al.*, 2002; KUBITZA, 2011; BRAZ, 2022).

O grupo dos peixes redondos (nativos) ocupam o segundo lugar entre as espécies mais cultivadas no país (263.479 toneladas), apesar de terem apresentado um desempenho 1,3% inferior ao ano anterior. Este fato, pode ser explicado por questões ambientais adversas, pela falta de programas de incentivo e apoio ao cultivo dessas espécies, e também pelas diversas dificuldades observadas nos mercados externo e interno (PEIXEBR, 2024).

Dentre as espécies de peixes nativos que se destacam com um grande potencial de cultivo (FRANCO *et al.*, 2013) está o *Piaractus mesopotamicus*, conhecido como pacu. Essa espécie é endêmica da região da bacia dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, e tem ampla distribuição nas planícies alagadas do pantanal (URBINATI *et al.*, 2010).

O pacu é uma espécie que apresenta hábito alimentar onívoro e menor exigência nutricional relacionada ao percentual de proteína e aminoácidos em comparação com outras espécies nativas, além disso, aceita maiores teores de carboidratos não estruturais, como por exemplo, o amido na dieta (PIRES *et al.*, 2021; BOSCOLO *et al.*, 2011; URBINATI *et al.*, 2010).

Nesse sentido, o uso de coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) é essencial para mensurar o aproveitamento dos ingredientes nas dietas, de modo possibilitar a formulação de dietas mais eficientes e completas do ponto de vista nutricional. (SILVA *et al.*, 2019; BUZZOLO *et al.*, 2018). Consequentemente, essas dietas irão contribuir para reduzir os poluentes no ambiente de criação, melhorar as condições dos animais, assegurar seu bem-estar e aumentar a produtividade (BUZZOLO *et al.*, 2018).

Uma das possibilidades para o uso de fontes proteicas para dietas de organismos aquáticos são os ingredientes derivados de animais e plantas terrestres (LUTHADA-RASWISWI *et al.*, 2021). De acordo com Harry (2010), a farinha de peixe está caminhando para deixar de ser a principal fonte de proteína para a fabricação de rações. Diante disso, uma alternativa promissora para a elaboração de dietas adequadas para cada fase do crescimento de várias espécies de peixes é a utilização de ingredientes alternativos ricos em proteína (REIG *et al.*, 2013). É importante considerar que a quantidade de

proteína bruta na dieta varia conforme a espécie e a fase de crescimento, entre outros aspectos (FRACALLOSSI & CYRINO, 2013).

Na busca por alimentos alternativos com potenciais nutricionais, a amoreira (*Morus alba*) se destaca pela boa palatabilidade, rica em nutrientes com alto teor de proteína bruta e grande variedade de ácidos graxos, minerais, vitaminas, fitonutrientes e substâncias bioativas (TANG *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2019; CHAN *et al.*, 2016).

A amoreira desempenha um grande papel na produção do bicho-da-seda (CHAN *et al.*, 2016), por ser uma árvore de pequeno porte com folhas de crescimento rápido. Essa espécie de planta é nativa da Ásia porém, é amplamente cultivada nas regiões temperadas e tropicais, incluindo a América do Norte (TANG *et al.*, 2022; HE *et al.*, 2018).

De acordo com Gomes *et al.*, (2016) existem poucas informações disponíveis sobre a utilização da folha da amoreira como alimento para peixes. Estudos realizados por Dias *et al.*, (2022a) com a farinha de folha de amoreira (FFA) para tilápia do Nilo, apresentaram valores adequados para proteína digestível (22%), energia digestível (1.569 Kcal/Kg) e extrato etéreo (1,25%). Esses resultados potencializam o uso para inclusão de folhas de amoreira em dietas para peixes.

A ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata Miller*) é uma planta alimentícia não-convencional (PANC), de origem do continente americano, podendo ser encontrada no Brasil, Bolívia, Venezuela, Panamá Cuba e México (MADEIRA *et al.*, 2016). Suas folhas apresentam um bom teor proteico, e se destaca pela presença de aminoácidos essenciais, como por exemplo, a metionina, cistina (OLIVEIRA *et al.*, 2013), o que faz dessa planta uma boa alternativa para complementação de dietas devido a presença de micronutrientes (BOTREL *et al.*, 2019).

Com o crescimento da cadeia produtiva da piscicultura, surge a necessidade da busca de estratégias nutricionais, como os ingredientes alternativos. Esses ingredientes devem apresentar um perfil de alta qualidade nutricional de modo que possam atender as exigências nutricionais das diferentes espécies de peixes de cultivo para garantir um aumento significativo da viabilidade econômica, do desempenho produtivo e da mitigação dos efluentes (CYRINO *et al.*, 2010).

A intensificação da produção da piscicultura, acabou levando a uma maior ocorrência de enfermidades infecciosas oportunistas, causadas por patógenos bacterianos, como por exemplo, a *Aeromonas hydrophila*, resultando em grandes perdas econômicas para o setor. Além disso, há uma carência de informações relacionadas ao sistema imune e as respostas adaptativas da tilápia do Nilo (*O. niloticus*), impossibilitando a implementação de medidas de biossegurança na produção (FARIAS *et al.*, 2016).

A busca por ingredientes alternativos para a formulação de dietas, tem gerado uma dúvida diante da possibilidade desses ingredientes conterem substâncias tóxicas em suas composições, as quais, que poderiam impactar a comunidade aquática e, a longo prazo, ocasionar bioacumulação.

Esses fatos, remetem sobre a necessidade da realização de estudos de toxicidade para avaliar o potencial do uso de alguns certos ingredientes para a fabricação e incorporação nas rações para a criação de peixes. Embora, esses ingredientes possam não afetar diretamente um determinado grupo específico de consumidores na cadeia alimentar aquática, por exemplo, fito e zooplâncton, eles poderiam, no entanto, prejudicar grupos mais sensíveis.

2 HIPÓTESES

1º A farinha de folha de amoreira (FFA) e a farinha de ora-pro-nóbis (FFO) apresentarão uma digestibilidade adequada (superior a 50%) para juvenis da espécie pacu, tornando-as fontes promissoras para compor as formulações de dietas;

2º A inclusão FFA nas dietas de tilápia do Nilo resultará em um desempenho zootécnico superior, quando comparado às dietas que utilizam outros ingredientes vegetais alternativos;

3º Juvenis de tilápias do Nilo e pacu, alimentados com FFA e FFO, podem apresentar uma resposta imunológica melhor do que os animais alimentados com dietas comerciais, quando desafiados com *Aeromonas Hydrophila*, proporcionando, um aumento na resistência às infecções bacterianas;

4º A utilização da FFA e FFO na formulação de rações não afetará a composição da qualidade da água com relação a presença de substâncias tóxicas para o grupo de organismos mais sensíveis da cadeia trófica aquática.

3 JUSTIFICATIVA

A utilização das folhas de amoreira e ora-pro-nóbis, como ingredientes, é boa alternativa para a produção de rações para peixes, considerando, a disponibilidade dessas plantas e seu potencial para a redução dos custos de fabricação, assim como, os benefícios socioeconômicos e nutricionais associados a esses vegetais.

As folhas de amoreira, tradicionalmente empregadas na produção de casulos para o bicho-da-seda, desempenham um papel significativo na atividade socioeconômica nas regiões do centro-oeste do estado de São Paulo e do norte do Paraná. Além disso, constituem uma alternativa proteica para bovinos e caprinos em áreas de restrição de vegetação rasteira. A relevância dessas plantas na produção local ressalta sua importância como recursos alimentares e econômicos.

Apesar das folhas de amoreira e ora-pro-nóbis não atingirem volumes de produção massiva comparáveis às commodities como soja e milho, suas características de serem facilmente encontradas ou produzidas no meio rural, as tornam acessíveis para pequenos produtores. Essa acessibilidade é crucial, e poderia possibilitar a incorporação desses ingredientes em rações fabricadas de maneira artesanal para atender às necessidades da criação de peixes para subsistência dos pequenos produtores.

A inclusão dessas plantas na formulação de rações artesanais poderia resultar em uma significativa diminuição dos custos com alimentação, contribuindo, portanto, para aumentar viabilidade econômica da piscicultura em pequena escala. Além disso, resultariam na possibilidade de beneficiar as rações com propriedades imunológicas e fisiológicas, conferidas pelos compostos presentes nas folhas de amoreira e ora-pro-nóbis, o que poderia sugerir uma melhora na resposta imunológica dos peixes aos patógenos.

Nesse sentido, a justificativa para a incorporação desses ingredientes na fabricação de rações para peixes vai além da simples redução de custos, abrangendo, sobretudo, aspectos relacionados ao aumento da sustentabilidade, segurança alimentar e dos ganhos potenciais em saúde animal. Adicionalmente, a busca por alternativas para uso de novos ingredientes para a fabricação de rações para peixes, como as folhas de amoreira e ora-pro-nóbis, ressalta a importância de explorar recursos locais e promover práticas mais acessíveis e integradas na piscicultura, alinhando-as aos objetivos de desenvolvimento econômico e social nas comunidades rurais.

A pesquisa proposta visa avaliar o potencial imunostimulantes da FFA e FFO nas rações de tilápias do Nilo e pacus com relação ao aumento da resistência imunológica dos juvenis aos patógenos oportunistas, utilizando desafios bacterianos, especialmente com a *A. hydrophila*, e também avaliar o impacto desses ingredientes na aquicultura sustentável e na biodiversidade aquática, por meio da determinação da concentração de toxicidade para os grupos de organismos aquáticos mais sensíveis que compõem a cadeia trófica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é avaliar os impactos da inclusão de FFA e FFO nas rações *P. mesopotamicus* e *O. niloticus* sobre a digestibilidade, o desempenho zootécnico, a saúde e toxicidade ambiental das farinhas.

4.2 Objetivos específicos

- Disponibilizar dados de coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da FFO para o pacu, e fornece informações sobre nutrientes, energia, minerais e aminoácidos essenciais e não essenciais;
- Avaliar os efeitos da inclusão da FFA na melhoria de alguns parâmetros zootécnicos para juvenis de tilápia do Nilo, incluindo: peso final

(PF), biomassa (BM), ganho de peso (GP), ganho de peso diário (GPD), ganho de peso relativo (GPR), ganho de biomassa (GB), conversão alimentar aparente (CAA), consumo diário de ração (CDR), consumo proteína bruta (CPB), taxa de crescimento específico (TCE), taxa de eficiência proteica (TEP), eficiência proteica (EA), rendimento de carcaça (RC), rendimento de filé (RF), índice viscerossomático (IVS), índice hepatossomático (IHS) e índice de gordura visceral (IGV);

➤ Avaliar os efeitos hematológicos e bioquímicos das dietas de FFA de juvenis de tilápia do Nilo, incluindo: hemoglobina, hematócritos, eritrócitos, leucócitos totais, glicose, cortisol, triglicerídeos e colesterol;

➤ Avaliar os efeitos hematológicos e bioquímicos frente ao desafio com *A. hydrophila* para Tilapia do Nilo e Pacu submetidos a diferentes tratamentos (ração comercial, controle, FFA e FFO);

➤ Avaliar a toxicologia da FFA e FFO em ensaios agudos usando organismos testes: *D. magna* e embriões de *D. rerio*.

REFERÊNCIAS

- BOSCOLO, W. R.; SIGNOR, A.; FREITAS, J.M.A.; BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A. Nutrição de peixes nativos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p.145-154, 2011.
- BOTREL, N.; GODOY, R.L.O.; MADEIRA, G.B.; AMARO, G.B.; MELO, R.A.C. Estudo comparativo da composição proteica e do perfil de aminoácidos em cinco clones de ora-pro-nóbis. Brasília, DF: **Embrapa Hortaliças**, 20 p. 2019.
- BRAZ, J. M. **Prebióticos, probióticos e simbióticos em dietas de juvenis de tilápias-do Nilo**. 2022. 64f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Pós-graduação em Zootecnia - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2022.
- BUZZOLO, H.; NASCIMENTO, T.M.T.; SANDRE, L.C.G. et al. Apparent digestibility coefficients of feedstuff used in tambaqui diets. **Bolem Instituto Pesca**, v.44, p.316-322, 2018.
- CHAN, E.W.; LYE, P.Y.; WONG, S.K. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. **Chinese Journal Natural Medicines**, 14: 17-30, 2016.
- CHEN, C.; MOHAMAD, R. U.; SAIKIM, F. H.; MAHYUDIN, A.; MOHD, N. N. *Morus alba* L. plant: bioactive compounds and potential as a functional food ingrediente. **Foods**, 10 (3), 2021.
- CYRINO, J.E.P.; BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y. 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.
- DIAS, P.S.; BALEN, R.E.; NOVOWORSKI, J.; COLPINI, L.M.S.; MEURER, F. Mulberry leaf meal (*Morus alba*) on the performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in growth. **Concilium**, v. 22, n. 3, p. 507–519, 7 maio 2022b. DOI: <https://doi.org/10.53660/CLM-266-269>
- DIAS, P. S.; SANTOS, H. K.; BALEN, R. E. ZADINELO, I. V.; MEURER, F. Energy and nutrient digestibility from mulberry (*Morus alba*) leaf meal for Nile tilapia. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 44, p. 1–6, 8 mar. 2022a.
- FARIAS, T.H.V.; LEVY-PEREIRA, N.; DE OLIVEIRA ALVES, L.; DE CARLA DIAS, D.; TACHIBANA, L.; PILARSKI, F.; ... RANZANI-PAIVA, M. J. T. Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection. **Animal Feed Science and Technology**. v. 211, p. 137-144, 2016.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATIONS OF THE UNITED NATIONS (FAO) – **Fisheries and Aquaculture Department, 2024**. Disponível em: <https://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>. Acesso em 06 de junho de 2024.

FRACALOSSO, D.M. & CYRINO, J.E.P. **Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 375p. 2013.

FRANCO, M.L.R.S.; ABREU, B. B.; SACCOMANI, A. P. O.; VESCO, A. P. D.; VIEIRA, V.I.; MIKCHA, J. M. G.; GASPARINO, E.; DELBEM, A.C.B. Elaboración de cookies y galletas con inclusión de harina de pescado. **Infopesca Internacional**, v. 53, n. 1, p. 30-33, 2013.

GOMES, E.F.; SANTOS, A.M.; FERREIRA, J.F.; & SILVA, R.M. Utilização da folha de amoreira (*Morus alba*) na alimentação de peixes: uma revisão. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 45(7), 377-383, 2016.

HARDY, R. W. Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 5, p. 770-776, 2010.

HE, X.; FANG, J.; RUAN, Y.; WANG, X.; SUN, Y.; WU, N.; ZHAO, Z.; CHANG, Y.; NING, N.; GUO, H.; HUANG, L. Structures, bioactivities and future prospective of polysaccharides from *Morus alba* (white mulberry): A review. **Food Chemistry**, 245: 899–910, 2018.

KUBITZA, F. Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: **DEGSPARI**, 2ª. Edição Revisada e Ampliada, 316p. 2011.

LIU, Y.; LI, Y.; PENG, Y.; HE, J.; XIAO, D.; CHEN, C.; LI, F.; HUANG, R.; YIN, Y. Dietary mulberry leaf powder affects growth performance, carcass traits and meat quality in finishing pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 103: 1934-1945, 2019.

LUTHADA-RASWISWI, R., MUKARATIRWA, S., & O'BRIEN, G. Animal Protein Sources as a Substitute for Fishmeal in Aquaculture Diets: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Applied Sciences*, 11(9), 3854, 2021. <https://doi.org/10.3390/app11093854>

MADEIRA, N. R.; AMARO, G. B.; MELO, R.A. de C.; BOTREL, N., ROCHINSKI, E. Cultivo de ora-pro-nóbis (*Pereskia*) em plantio adensado sob manejo de colheitas sucessivas. Brasília, DF: **Embrapa Hortaliças**, 2016. (Circular técnica, 156).

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

OLIVEIRA, D.D.C.D.S.; WOBETO, C.; ZANUZO, M.R. & SEVERGNINI, C. Composição mineral e teor de ácido ascórbico nas folhas de quatro espécies

olerícolas não- convencionais. **Horticultura Brasileira**, v.31, n.3, p. 472-475, 2013.

PEIXEBR. **Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixes BR 2024**. Associação Brasileira de Piscicultura, 2024.

PIRES, B. S.; PRETTO, A.; STEFANELLO, C. M.; CARVALHO, P. T.; PEDRON, F. A. Influência de diferentes fontes e níveis de fibra na dieta de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) sobre o desempenho zootécnico, parâmetros somáticos e composição centesimal. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 20, n. 4, p. 294-301, 2021.

REIG, M.; ARISTOY, M. C.; TOLDRÁ, F. Variability in the contents of pork meat nutrients and how it may affect food composition databases. **Food Chemistry**, v. 140, n. 3, p. 478-482, Oct. 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.201

SILVA, L. & GALÍCIO, G.S. **Alimentação de peixes em piscicultura intensiva**. Enciclopédia Biosfera, v.8, n.15, p.49-62, 2012.

SILVA, R. S.; SANTO, R. V. E.; BARBOSA, A, V. C.; SANTOS, M. A. S.; CORRÊA, R. O.; MARTINS JÚNIOR, H.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B. Digestibilidade aparente do farelo de palmito em tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 5, p. 1595-1600, 2019.

TANG, X.; FU, J.; GAO, Q.; LIU, G.; YE, J.; GUAN, Q.; SHI, Y.; XU, M. Effects of mulberry (*Morus Alba L.*) leaf extracts on growth, immune response, and antioxidante functions in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Annals of Animal Science**, v. 22, n. 1, p. 349-369, 2022.

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. **North American Journal of Aquaculture**, v.81, p.13–39, 2018.

URBINATI, E. C. et al. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B. & GOMES, L. C. (2º ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, Santa Maria: UFSM, p. 205-244, 2010.

5 CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

5.1 ESPÉCIES EM ESTUDO

5.1.1 *Oreochromis niloticus* – Tilápia do Nilo

Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758), pertence a ordem Cichliformes, da família Cichlidae, com uma distribuição de origem no norte e leste da África (AZEVEDO et al., 2012; CASTAGNOLLI, 1992). Possui características visuais distintas, incluindo coloração acinzentada e corpo comprido lateralmente, com linhas laterais divididas em dois segmentos, além disso, apresenta espinhos na nadadeira dorsal (figura 1), que são marcantes (MORO *et al.*, 2013), com hábito alimentar planctófago, e aceitabilidade de ração comercial (YANCEY & MENEZES, 1983).

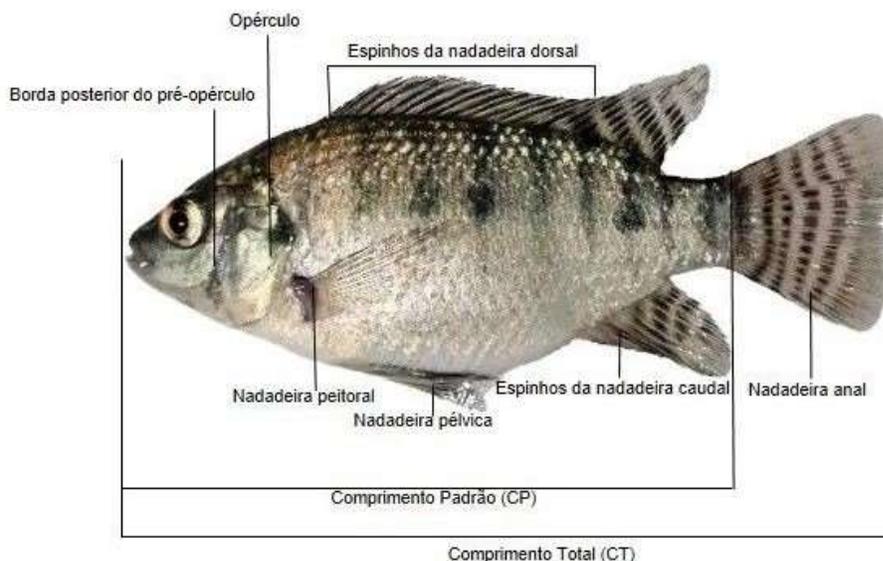


Figura 1. Espécime de juvenil de *Oreochromis niloticus* e esquema indicando algumas estruturas morfológicas e medidas utilizada neste trabalho como comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP), (Kullander (1986). **Fonte:** Autoria própria: Dias, (2024).

A introdução da tilápia no Brasil teve início a partir dos anos de 1950 no Nordeste. O objetivo foi o povoamento dos reservatórios, quando a piscicultura foi integrada à globalização da agricultura nos ambientes aquáticos (FIUZA, 2023). A sua introdução ocorreu em função do reconhecimento do seu potencial na produção de alimentos, emergindo como uma nova fronteira

mundial (FIUZA, 2023). Porém, houve baixo desempenho, não havendo continuidade no projeto (MOREIRA *et al.*, 2007).

Em 2005, a Universidade Estadual de Maringá (UEM-CODOPAR), recebeu as primeiras tilápias geneticamente melhoradas da linhagem GIFT do inglês (*Genetic Improvement of Farmed Tilápias*) oriundas da Malásia (SIEMER, 2021; LI *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2005). O Brasil foi o primeiro país da América a receber os espécimes e marcar o início do Programa de Melhoramento Genético em colaboração com o *World Fish Center* e com apoio da SEAP – Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca. Esses foram os primeiros passos na seleção genética dessa espécie, agora na sua 13ª geração com o nome de Tilamax (LUPCHINSKI JUNIOR *et al.*, 2008).

Devido ao seu potencial, a produção de tilápia no Brasil impactou significativamente vários aspectos da piscicultura e dos ecossistemas aquáticos (CALDEIRA *et al.*, 2022), principalmente, pelas suas características de rusticidade, adaptabilidade a diversas condições ambientais, tolerância e crescimento rápido (SANTOS *et al.*, 2015; WATANABE *et al.*, 2002). Além da resistência a doenças e estresse, capacidade de reprodução em cativeiro, aceitabilidade de alimento artificial, tolerância a alta concentração de amônia, assim como, baixo custo de produção, com destaque na utilização de apenas machos no sistema de produção, visto que apresentam crescimento de 40% mais rápido do que um lote misto (OFORI *et al.*, 2009; ABD EL-HACK, 2022). Adicionalmente a essas características positivas, possui filés ausentes de espinhas de “Y” (SOUZA *et al.*, 2004), e carne de alta qualidade (HAYASHI *et al.*, 2002).

Segundo Furuya (2007), as rações para tilápias demandam altos níveis de proteínas e aminoácidos, elevando os custos de fabricação devido as fontes proteicas. As exigências nutricionais variam de acordo com o tamanho do animal, hábitos alimentares e qualidade da proteína (Fernandes *et al.*, 2010). Em geral, as tilápias necessitam entre 30% a 45% de proteína bruta (PB), enquanto rações para frangos e suínos contêm menos PB. Entretanto, peixes utilizam proteínas como fonte de energia, excretando produtos da digestão passivamente nas brânquias, o que reduz o custo energético (CYRINO *et al.*, 2005).

Estudos destacam o estabelecimento bem-sucedido da tilápia nas águas brasileiras, levando à introdução de parasitas como helmintos Monogenea e protozoários *I. Multifiliis*, junto as demais espécies de peixes (CALDEIRA *et al.*, 2022; RIBEIRO *et al.*, 2022).

5.1.2 *Piaractus mesopotamicus* – Pacu

O *Piaractus mesopotamicus* (Holmber, 1887), conhecido popularmente como pacu, e também como pacu-caranha e pacu-guaçu, pertencente a ordem Characiformes e a família Sereasalmidae. É uma espécie nativa que se distribui desde a Bacia dos Rios Paraná-Paraguai até a do Rio Prata, e tem maior foco de estudos nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (URBINATI *et al.*, 2013).

O pacu é um peixe com o corpo coberto por escamas e coloração cinza com tons amarelados na parte inferior da barriga (URBINATI *et al.*, 2013). Possui um corpo robusto com formato arredondado e dorso alto na região das costelas o que possibilita bons cortes para a indústria (figura 2). A boca contém dentes molariformes e mandíbula forte capazes de triturar alimentos mais sólidos (MORO *et al.*, 2013). O pacu pertence ao grupo dos peixes redondos devido as características do seu corpo achatado e comprimido nas laterais (MORO *et al.*, 2013).

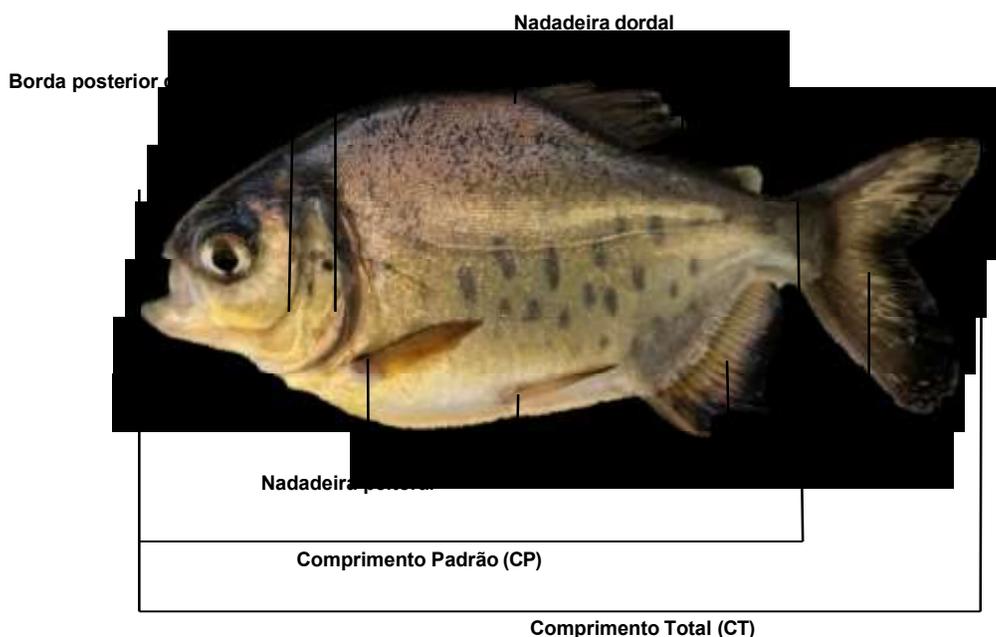


Figura 2. Espécime de juvenil de *Piaractus mesopotaminius* e esquema indicando algumas estruturas morfológicas e medidas utilizadas neste trabalho, tais como, comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP), (Kullander (1986). **Fonte:** Autoria própria: Dias, (2024).

Com relação à reprodução, o pacu, necessita de águas lânticas e depende de correntes fluviais para completar o ciclo de desenvolvimento de seus órgãos sexuais e a maturação dos gametas (MORO *et al.*, 2013). Em condições de cativeiro, necessita de técnicas de desova artificial, como a hipofisação, para a liberação dos gametas (MORO *et al.*, 2013).

A espécie tem a capacidade de alterar seus hábitos alimentares conforme a disponibilidade sazonal de alimentos. O pacu é predominantemente herbívoro, e prefere frutas, folhas e resíduos vegetais, e consegue tolerar altos níveis de fibra na sua dieta (URBINATI *et al.*, 2013). Além disso, adapta-se facilmente ao cativeiro, crescendo rapidamente e ganhando peso de forma significativa. Sua carne branca é de excelente qualidade (BARTLEY, 1998).

Essa espécie é uma opção atraente para a piscicultura, oferecendo uma alternativa promissora para suprir a demanda de peixes e cultivo, e se destaca como uma das espécies de peixes redondos mais utilizadas para a produção comercial (PEDROZA FILHO *et al.*, 2016).

5.2 ALIMENTOS ALTERNATIVOS

O maior desafio na produção animal é obter um produto final de alta qualidade e competitivo no mercado. Na aquicultura, os altos custos com alimentação podem inviabilizar os negócios, especialmente, para pequenos produtores devido à dependência das *commodities* agrícolas (grãos).

Uma solução para reduzir os custos na piscicultura é utilizar alimentos alternativos para a formulação das rações a fim de minimizar os impactos ambientais e, sobretudo, quando o manejo produtivo adotar boas práticas de cultivo (Pascoal *et al.*, 2006a).

A incorporação de alimentos alternativos e regionais na alimentação de peixes enfrenta vários desafios. A Dentre eles, destacam-se a variação sazonal na produção, a distribuição desigual das espécies florestais, a falta de sistemas produtivos estabelecidos para muitas dessas espécies e os preços elevados de certos produtos durante a safra.

Além disso, há uma escassez de informações sobre a eficiência nutricional e a capacidade de aproveitamento desses produtos pelos peixes. Essa situação dificulta o uso desses itens alimentares na formulação de dietas balanceadas e de excelente qualidade para a colocação mercado (MORO & RODRIGUES, 2015; FURUYA, 2010). Uma dieta desbalanceada afetará o crescimento dos peixes e causará prejuízos ao produtor devido aos seus efeitos negativos sobre os processos bioquímicos e fisiológicos do animal (BOSCOLO *et al.*, 2011).

Uma ração de boa qualidade para peixes de cultivo é determinada por diversos fatores, como por exemplo, a sua composição nutricional, digestibilidade, palatabilidade, qualidade física, uniformidade do tamanho dos grânulos e processo de moagem (RODRIGUES *et al.*, 2013). Esses aspectos são essenciais para garantir que a ração atenda às necessidades nutricionais específicas das diferentes espécies de peixes cultivadas e maximize seu desempenho produtivo (FURUYA, 2010).

A seleção de ingredientes para a fabricação de rações de boa qualidade para peixes deve considerar a composição nutricional,

digestibilidade, disponibilidade sazonal e os custos de produção (RODRIGUES *et al.*, 2013).

Os ingredientes utilizados para a fabricação de rações são classificados em fibrosos (com mais de 18% de fibra bruta na matéria seca), energéticos (com menos de 20% de proteína e menos de 18% de fibra bruta na matéria seca, geralmente de origem vegetal), proteicos (com mais de 20% de proteína na matéria seca, de fontes vegetais ou animais). Além disso, são utilizados suplementos vitamínicos e minerais, aditivos como medicamentos, imunostimulantes e palatabilizantes, os quais, são adicionadas as rações sem função nutricional direta (RODRIGUES *et al.*, 2013).

Para aumentar a produtividade na piscicultura é crucial utilizar dietas balanceadas e adequadas às exigências nutricionais das diferentes espécies de peixes. Nesse sentido, é importante considerar que o alimento natural disponível no ambiente poderá não ser capaz de suprir todas as necessidades nutricionais da espécie cultivada, sobretudo, porque cada espécie de peixe, em particular, possui uma exigência nutricional específica para as suas respectivas fases de desenvolvimento (CYRINO & FRACALLOSSI, 2012). Além disso, nos em sistemas intensivos de produção de peixes essas diferenças podem levar a uma redução na produtividade e, conseqüentemente, menor retorno econômico (FURUYA *et al.*, 2001).

Diante disso, o uso de alimentos alternativos na alimentação de peixes pode resultar em custos de produção mais baixos sem comprometer a produtividade, e também poderá contribuir para um melhor aproveitamento de certos subprodutos agroindustriais, como afirmado por Pezzato *et al.*, (2000).

5.2.1 Alimentos alternativos proteicos

As farinhas derivadas de folhas são consideradas como uma das opções mais acessíveis de proteína vegetal, e podem ser uma boa solução para amenizar os custos de produção se forem adequadamente integradas às dietas de peixes (MATOS *et al.*, 2023; BABALOLA & FAKUNMOJU, 2020).

Desde os trabalhos pioneiros realizados por WEE & WANG (1987) e NG & WEE (1989) o interesse nesse tópico cresceu muito. e Uma quantidade

significativa de pesquisas foi realizada com o objetivo de explorar o potencial de diversas plantas incluindo a *M. alba* (Dias *et al.*, 2022 a, b) e *P. aculeata*.

5.2.1.1 *Morus alba* – Amoreira

Morus alba Linn (1753), conhecida popularmente como amoreira, é uma planta rústica e perene que faz parte da ordem Urticales e da família Moraceae (KURNIATI *et al.*, 2014; MIRANDA *et al.*, 2002),

A amoreira é uma planta rústica de fácil cultivo e excelente desenvolvimento, mesmo em condições de seca prolongada, e é encontrada em diversos gêneros (MIRANDA *et al.*, 2002). Apresenta ramos com coloração geralmente marrom-acinzentada, com folhas arredondadas e simples com a parte espiral semelhante a pequenas pontas (figura 3) (JOLY, 1975; CRONQUIST, 1981). É comum em regiões de clima subtropical e temperado na Europa, Ásia, África e América (KURUATI *et al.*, 2014). Apesar de ter origem na Ásia, está distribuída globalmente (NODA & MARTÍN, 2014).



Figura 3. A) Espécime de *Morus alba*; **B)** Talos colhidas. **Fonte:** Autoria própria: Dias, (2024).

As amoreiras são amplamente cultivadas na China, Coreia e Japão, principalmente, para a nutrição das lagartas do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.), que se alimentam exclusivamente de suas folhas (OKAMOTO & RODELLA,

2006; OKAMOTO & RODELLA, 2007). No Brasil, também é utilizada na sericultura, cuja produção está entre os dez maiores do mundo. A maior concentração da sua produção é no estado do Paraná com 89,9% da produção nacional em 2021, seguida de São Paulo e Mato Grosso do Sul (CIRIO *et al.*, 2022). Além da sericultura, onde suas folhas são convertidas em finos fios de seda pelos casulos das lagartas, a amoreira branca é utilizada como alimento volumoso para ruminantes devido à sua composição bromatológica (MIRANDA *et al.*, 2002).

Seu ciclo de colheita dura em média 3 meses podendo variar conforme a composição do solo e o clima da região, apresentando, portanto, variações na quantidade de biomassa foliar e valores nutricionais. Em regiões com irrigação por gotejamento subterrâneo e fertilização de solo pode apresentar um rendimento foliar de até 10.057,08 Kg/ha/safra (SUDHAKAR *et al.*, 2018). Em um estudo na Colômbia, em uma área sem irrigação e falta de fertilizantes, a produção final foi de 2,5 toneladas/ha de rendimento foliar com 195 pés de amoreira (FOSECA-LÓPEZ *et al.*, 2019).

A folha de amoreira apresenta potencial promissor como componente benéfico em dietas para tilápia do Nilo. Estudos recentes indicaram que a farinha de folha de amoreira (FFA) apresentou bons coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) de proteína, extrato etéreo (EE) e energia, o que comprova seu potencial como fonte adequada de proteína e energia digestíveis para tilápia do Nilo (DIAS *et al.*, 2022a). Outros, estudos realizados com a inclusão de até 18% de FFA para alevinos de tilápia do Nilo em dietas, isentas de ingredientes de origem vegetal, não apresentaram efeitos prejudiciais em ganho de peso e conversão alimentar (DIAS, 2019).

Em estudos realizados na Colômbia com tilápias em fases de crescimento e engorda (terminação) foram utilizadas suplementações com folhas frescas de amoreira em 4% nas dietas sem alterações nos parâmetros zootécnicos (HAHN-VON-HESSBERG *et al.*, 2018). Entretanto, nos estudos com folhas secas incluídas nas dietas até 15% foram observados efeitos positivos sobre o rendimento da tilápia do Nilo (CONTRERAS CASTRO, 2012). Na Indonésia, outros estudos, avaliaram a substituição de 30% da farinha de peixe por folhas de amoreiras, e observou-se que com relação ao balanço

energético de juvenis de tilápias, ocorreu uma diminuição no gasto energético e um aumento significativo no tamanho corporal, comprovando que as dietas possuíam uma boa palatabilidade e boa qualidade para a espécie estudada (ASTUTI *et al.*, 2012).

Ademais, ZHOU *et al.*, (2023) demonstraram que a utilização da folha de amoreira na incorporação de dietas para outras espécies de peixes, empregando 9g/Kg de FFA na suplementação para robalo-pintado (*Lateolabrax maculatus*), pode aprimorar o desempenho do crescimento, a capacidade das atividades antioxidantes entéricas, a morfologia intestinal e a composição microbiana. Os resultados obtidos indicaram o uso das folhas de amoreira promoveram uma melhora na saúde intestinal dos animais e a redução de doenças intestinais

Os resultados obtidos por ADEWUNI & OLA-OLAIMEJI, (2016) demonstraram que houve um bom crescimento dos animais em função da utilização de 20% de FFA fermentada na substituição da farinha de peixe para juvenis de bagre-africano (*Clarias gariepinus*). Em outros estudos correlacionados a esse tema realizados com juvenis de dourada de Wuchang (*Megalobrama amblycephala*) foi utilizado 2,22% da FFA fermentada nas dietas, resultando na melhoria do desempenho e das repostas antiinflamatórias. Com 4,44% de FFA fermentada ocorreu uma redução do conteúdo lipídico plasmático e melhoria da capacidade antioxidante hepática (JIANG *et al.*, 2022). Para juvenis de dourado pompano (*Trachinotus ovatus*) NING *et al.*, (2021) utilizaram 6,0% de folha de amoreira com 1,3% de pré-mistura multienzimática e obtiveram melhor desempenho do crescimento acompanhado do aumento da atividade das enzimas digestivas. Com 4% de folha de amoreira e a mesma quantidade de pré-mistura multienzimática foram observadas melhorias na resistência a doenças bacterianas, principalmente, com *Vibrio harveyi*

5.2.1.2 *Pereskia aculeata* - Ora-pro-nóbis

Pereskia aculeata Miller, conhecida popularmente por ora-pro-nóbis (OPN), e em outras regiões como “carne dos pobres”. Pertence à família

Cactaceae, e apesar de não possuir caule fotossintético possui capacidade de armazenamento de água e nutrientes em suas folhas (SILVA *et al.*, 2023). Essa espécie é originária de regiões temperadas e tropicais das Américas, especialmente, em climas quentes e secos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2014; CRONQUIST, 1981; JOLY, 1998). Se destaca pelas suas características de adaptabilidade agrônômica e por ser uma planta robusta, perene, suculenta e espinhosa com hábitos variados (figura 4) (TELLES *et al.*, 2016; MADEIRA *et al.*, 2016; BARROSO, 1978).



Figura 4. A) Espécime *Pereskia Aculeata*; B) Talos colhidas. **Fonte:** Autoria própria: Dias, (2024).

A ora-pro-nóbis é uma planta tolerante as condições áridas, seu crescimento vegetativo ocorre durante o ano todo, não depende em grande medida da fertilidade no solo e adapta-se com facilidade a diversos tipos de solo e condições edafoclimáticas (TELLES *et al.*, 2016; MADEIRA *et al.*, 2016). Pode produzir 5.759 Kg de proteínas (folhas) por hectare ao longo de 24 meses, quando cultivada em alta densidade (cerca de 10 plantas por m²)., e apresenta boa produtividade quando comparada com as médias de produção dos principais grãos comerciais como soja (*Glycine max*) e milho (*Zea mays*), respectivamente, de 1.154 Kg e 514,7 kg por hectare por ano (SOUZA *et al.*,

2020). Essa espécie é considerada como uma hortaliça não convencional (PANC) devido ao seu alto teor de proteína e minerais (TAKEITI *et al.*, 2009).

A folha de *P. Aculeata* é considerada uma grande fonte alternativa de proteínas, minerais e vitaminas (TAKEITI *et al.*, 2009). e é muito utilizada como alimento na culinária brasileira, principalmente, por sua boa aceitação e seus valores nutricionais (PORTO *et al.*, 2021; MARIUTTI *et al.*, 2021; DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). Também é muito valorizada como ingrediente para a indústria alimentícia para enriquecer o valor nutricional de diversos produtos em virtude da viabilidade de utilização das suas folhas de diversas formas, tais como, farinha, “*In natura*” ou extrato. (SILVA *et al.*, 2023).

LIMA JUNIOR *et al.*, (2013), encontraram teores de proteína que variaram entre 20 a 30%, e teores de minerais, como por exemplo, ferro e cálcio superiores a outros vegetais como brócolis (*Brassica oleracea var. itálica*) e espinafre (*Spinacea oleracea*), além da presença de compostos fitoquímicos (MACIEL *et al.*, 2021). De acordo com (SOUZA *et al.*, 2016; AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2012) a ora-pro-nóbis contém compostos com propriedades anti-inflamatórias, antifúngicas e antioxidantes.

Estudos realizados por MACEDO *et al.*, (2023). Com extrato de folha de ora-pro-nóbis (OPN) comprovaram a sua atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas, principalmente, a *Staphylococcus aureus*. Foram utilizados 1,56 mg/ML⁻¹, e identificados 53 compostos no extrato, incluindo, ácidos orgânicos, ácidos graxos, fenólicos e outras substâncias com atividades antimicrobianas. Os resultados obtidos indicam que OPN possui valores nutricionais adequados para alimentação animal, sobretudo, para algumas espécies como frangos, suínos e ratos que apresentaram bons resultados para desempenho (SILVA *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2015; AVELAR *et al.*, 2013).

O uso de farinha de folhas de ora-pro-nóbis (FFO) na alimentação de peixes promoveu melhorias nos parâmetros de desempenho zootécnico de tilápias (*O. niloticus*), quando foi utilizada entre 4 a 6% assim como, contribuiu para o aumento da quantidade de proteína corporal e da atividade enzimática no metabolismo de aminoácidos (ORO, 2019). Em outro estudo, conduzido por KOVALSKI *et al.*, (2022) foram adicionadas 15% de FFO resultando na melhoria das respostas antioxidantes da tilápia do Nilo no aumento da

resistência ao estresse durante o transporte. RETCHESKI, (2022), observaram que a inclusão da FOPN em dietas para alevinos de tilápia do Nilo, nas concentrações entre 10 a 15%, promoveu um aumento das atividades enzimáticas digestivas para carboidratos, lipídeos e proteína, não alterando as análises do perfil bioquímico

5.3 COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE APARENTE (CDA)

A avaliação da digestibilidade de ingredientes para elaboração de formulações de dietas para peixes é essencial para melhorar a eficiência alimentar desses animais e, conseqüentemente, seu desempenho (TEIXEIRA *et al.*, 2009). A avaliação da digestibilidade irá identificar quais são os ingredientes que são absorvidos e utilizados adequadamente fornecidos na dieta, além de ajudar a identificar e evitar a presença de fatores antinutricionais que possam interferir na absorção. Essa avaliação irá assegurar que a substituição ou inclusão de ingredientes não comprometa o crescimento e desempenho dos peixes (SOUZA *et al.*, 2013; BOSCOLO *et al.*, 2012; ABIMORAD *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2001).

A digestibilidade é um coeficiente que indica a diferença entre a quantidade de nutrientes, ou energia contida no alimento, e a quantidade excretada nas fezes (NRC, 2011). A variação na digestibilidade está relacionada com os componentes antinutricionais. Os alimentos com teores nutricionais semelhantes podem ter diferentes capacidades de aproveitamento digestível, devido as diferenças nas suas respectivas composições químicas e solubilidades, assim como, variam entre as diferentes espécies (FRACALOSSO & CYRINO, 2013; NRC, 2011; FURUYA *et al.*, 2010; PEZZATO *et al.*, 2004).

Para a determinação da digestibilidade de nutrientes e energia em dietas para peixes há dois métodos principais: o direto e o indireto (NOSE, 1966). O método direto é a coleta total das fezes e o controle rigoroso do consumo de alimentos (YOUNG *et al.*, 1991; KABIR *et al.*, 1998). Embora, esse método seja mais preciso, é o menos utilizado na prática devido as dificuldades para a coleta de fezes no ambiente aquático (TEIXEIRA *et al.*, 2009; BONFIM & LANNA, 2004). O método indireto utiliza marcadores inertes, como o óxido

crômico (Cr_2O_3), para estimar a digestibilidade sem a necessidade de coleta total de fezes, bastando apenas a coleta parcial (YOUNG *et al.*, 1991; KABIR *et al.*, 1998). É o método mais utilizado e prático para estimar os CDAs em estudos de longo prazo, e para a avaliação de vários ingredientes (TEIXEIRA *et al.*, 2009; BONFIM & LANNA, 2004). A utilização de marcadores deve ser feita com ingredientes indigestíveis no método indireto, visto que, não são absorvidos pelo organismo dos animais. O uso de marcadores indigestíveis não interferirá no metabolismo digestivo e também irá evitar que alguns fatores como a espécie, a composição da dieta e as condições ambientais não influenciem os resultados da digestibilidade (RODRIGUES & FERNANDES, 2006; BONFIM & LANNA, 2004).

5.4 DESEMPENHO ZOOTÉNICO

Para monitorar o crescimento dos animais é essencial saber o número total de peixes em cada viveiro ou tanque-rede, além do peso médio (PM) e comprimento total (CT), o qual é determinado por meio do procedimento de biometria. Para isso, deve-se coletar uma amostra representativa, geralmente, cerca de 10% da população total dos peixes no ambiente de cultivo. Em seguida, é feita a contagem, medição e pesagem dos peixes para determinar o peso médio e o CT. A biometria deve ser feita, preferencialmente, após 24h de jejum, no período da manhã e fazer o possível para realizar um manejo rápido e cuidadoso para evitar estresse e mortalidades (OLIVEIRA *et al.*, 2007; PEREIRA, 2012). Para realizar o acompanhamento de desempenho zootécnico, é recomendável fazer a biometria a cada 15 ou 30 dias de cultivo. Esse procedimento irá não só avaliar o ganho de peso dos peixes, como também, servirá para realizar ajustes adequados no fornecimento diário da quantidade de ração (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

5.5 HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

A hematologia se refere ao estudo detalhado do sangue e ao conjunto de informações relacionadas a ele, incluindo, a análise dos parâmetros

hematológicos em situações basais e alteradas (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). Os parâmetros hematológicos são utilizados para controle de patologias associadas ao estresse, além de, averiguar o estado fisiológico dos peixes (TAVARES-DIAS *et al.*, 2008).

Por meio da coleta de sangue é possível realizar vários exames, tais como, hematológicos e bioquímicos os quais, servirão para fazer o correto diagnóstico do estado de saúde do animal (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). A hematologia é uma ferramenta essencial para a análise da saúde dos peixes, e indica com precisão as mudanças nos padrões hematológicos, e também os distúrbios morfológicos das células sanguíneas. O uso dessa ferramenta é fundamental para fornecer informações para servir de base para a elaboração de diagnósticos e prognósticos sobre a saúde dos peixes. Além disso, alguns parâmetros hematológicos são utilizados como indicadores biológicos para monitoramento de bem-estar dos peixes (SILVA *et al.*, 2012).

O hemograma consiste em uma série de análises utilizadas para identificar a quantidade e o tipo de células presentes no sangue, o volume ocupado pelos eritrócitos e a presença das populações de leucócitos e trombócitos, os quais, podem ser divididos em três partes principais: eritrograma, leucograma e trombo grama (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). O eritrograma inclui a contagem de eritrócitos, a determinação do hematócrito e da concentração de hemoglobina, além dos cálculos de índices como VCM (volume corpuscular médio) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). O leucograma abrange a contagem absoluta e relativa dos leucócitos totais e diferenciais, enquanto, a última parte o trombo grama se concentra na contagem de trombócitos totais (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013).

A análise da composição bioquímica do sangue reflete o equilíbrio na absorção, excreção e metabolismo dos nutrientes nos tecidos dos peixes (LEITE, 2018). Um desequilíbrio pode resultar na redução do desempenho zootécnico dos animais (GONZÁLEZ, 2000). A avaliação dos constituintes dos parâmetros bioquímicos no plasma e/ou soro é essencial para detectar e diagnosticar alterações no equilíbrio metabólico durante o cultivo dos peixes (PAVLIDIS *et al.*, 2007). Para a avaliação da fisiologia relacionada ao estado

nutricional dos peixes tem sido utilizado alguns parâmetros bioquímicos, tais como, glicose, triglicerídeos, colesterol, proteína total e ureia (KAVITHA *et al.*, 2012).

5.6 PATÓGENOS EMERGENTES NA PISCICULTURA

Os patógenos que afetam a saúde dos peixes representam um desafio significativo para a aquicultura em todo o mundo. As infecções bacterianas e fúngicas, estão muitas vezes relacionadas à baixa qualidade da água e a fatores ambientais, os quais, favorecem a contaminação desses animais e, conseqüentemente, podem levar a mortalidades massivas dos peixes (GOWHAR *et al.*, 2020). Os surtos de doenças nas pisciculturas são grandes causadores de perdas econômicas (GENG *et al.*, 2014; TAVARES-DIAS & MARTINS, 2017), as quais, representam um obstáculo para o desenvolvimento desta atividade (ASSANE, 2018).

Entre os principais patógenos emergentes nas pisciculturas comerciais, as bactérias têm se destacado nas últimas duas décadas, não apenas pelos prejuízos econômicos, mas também pelo fato de algumas espécies apresentarem potencial zoonótico (NAWAZ *et al.*, 2008; NOGA, 2010). Diante disso, a proliferação das doenças bacterianas nas pisciculturas tem crescido consideravelmente devido ao aumento da produção de pescado nacional (ASSANE, 2018). Uma das formas para reduzir e controlar esse problema tem sido a utilização de antibióticos e quimioterápicos. No entanto, o uso inadequado desses produtos pode ser prejudicial ao meio ambiente, além de favorecer a resistência das bactérias a esses medicamentos, principalmente, porque muitas vezes não se tem certeza qual patógeno está contaminando os animais e, ainda, porque muitas vezes estão associados a mais de um tipo de microrganismo (FARIA *et al.*, 2018; ANDRADE-PORTO *et al.*, 2017; JULINTA *et al.*, 2017).

5.6.1 Aeromonose – gênero *Aeromonas*

A aeromonose, também conhecida como septicemia hemorrágica, é uma infecção bacteriana provocada por bactérias do gênero *Aeromonas* (STANIER, 1943). Essas bactérias são amplamente distribuídas em ambientes aquáticos e se adaptam a temperaturas com uma variação de 5°C a 37°C (KOZINSKA, 2007). Sua forma pode ser bacilos ou cocobacilos com um tamanho respectivo de 0,3-1,0 µm largura X 1,5-3,5 µm comprimento (BRENNER *et al.*, 2005), e também pode ser encontrada na forma de bastonetes (KOZINSKA, 2007). São Gram-negativas, anaeróbicas facultativas (BULLER, 2014; KOZINSKA, 2007) e, geralmente, estão presentes na superfície do corpo e nas brânquias dos peixes (KOZINSKA 2007).

O gênero *Aeromonas* passou por diversas alterações taxonômicas nas últimas décadas, de modo que a sua caracterização é feita através de testes bioquímicos e moleculares (AUSTIN & AUSTIN, 2016; JANDA & ABBOTT, 2010; SAADREVA *et al.*, 2006). As principais espécies patogênicas para peixes incluem: *Aeromonas hydrophila*; *Aeromona caviae*; *Aeromonas veronii*; *Aeromonas bestiarum* e *Aeromonas Sobria*, as quais, juntas são conhecidas como “septicemia por aeromonas móveis”, devido à sua motilidade proporcionada por flagelos polares e laterais (FIGUEIREDO & LEAL, 2008).

Os sinais clínicos de infecção variam desde lesões superficiais ou profundas na pele até quadros típicos de septicemia. Essas lesões podem se apresentar como hemorragia e necrose da pele e das nadadeiras, evoluindo para úlceras, as quais, geralmente acometem o tecido muscular (FIGUEIREDO & LEAL, 2008; PAVANELLI *et al.*, 2002). Em infecções sistêmicas, são observados exoftalmia, abdômen distendido com líquido serosanguinolento e petéquias hemorrágicas nas vísceras (AUSTIN & AUSTIN, 2016; NOGA, 2010; FIGUEIREDO & LEAL, 2008; PAVANELLI *et al.*, 2002). Seu tratamento envolve a administração de antibióticos, sendo a oxitetraciclina a mais utilizada nas pisciculturas brasileiras, ou produtos homeopáticos na ração (SINDAN, 2018).

5.7 ECOTOXICOLOGIA E TESTES DE TOXICIDADE EM ORGANISMOS AQUÁTICOS

A poluição aquática é um problema global preocupante, especialmente, para os ecossistemas de água doce (RIBEIRO *et al.*, 2022). Uma grande variedade de compostos químicos, provenientes de diferentes fontes, podem exercer efeitos tóxicos sobre os organismos aquáticos (BRUDLER *et al.*, 2019).

O termo ecotoxicologia foi proposto pela primeira vez em 1969 em Estocolmo durante a reunião do Comitê do Conselho Internacional de Uniões Científicas (ICSU), (TRUHAUT, 1977). Toxicologia foi definida como a ciência que investiga os impactos das substâncias naturais ou sintéticas nos organismos vivos, nas populações e comunidades, sejam elas de animais ou plantas, tanto em ambientes terrestres quanto aquáticos, e a interação dessas substâncias com o meio onde esses organismos habitam (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006).

Os testes ecotoxicológicos, ou bioensaios, são utilizados para avaliar e monitorar a qualidade da água. Os termos metodológicos para a padronização dos testes foram estabelecidos em 1975, para toxicidade aguda de peixes, pelo Comitê Técnico de Qualidade das Águas da *International Organization for Standardization* – ISO. A partir deste momento, foram desenvolvidos vários métodos de testes para toxicidade aguda e crônica, com período de duração curta (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006). Na Europa os protocolos de testes de toxicidade de organismos aquáticos são estabelecidos pela *Organization for Economic Cooperation and Development* – OECD, para cada organismo teste há um protocolo específico (OECD, 2017).

No Brasil, os testes de toxicidade foram estabelecidos pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), com base na ISO. Para utilizar diferentes organismos, como por exemplo, a *Daphnia sp.* (ABNT 12713, 2004a), peixes (ABNT 15088, 2004b), e a partir destas normas foram propostos diferentes métodos para facilitar a execução dos testes e suas respectivas análises (QUEIROZ & SILVA, 2021). Por um período longo de tempo, os ensaios para toxicologia ambiental utilizavam microcosmos para compreender os impactos tóxicos agudos (QUEIROZ & SILVA, 2021). Para isso, eram

utilizados os ensaios agudos e as relações dose-resposta para determinar as concentrações efetivas e letais (BOONE & JAMES, 2005). Essa abordagem não levava em conta os possíveis impactos crônicos, resultantes de uma exposição ao longo prazo em baixas concentrações das substâncias analisadas. Entretanto, atualmente, são utilizados diversos métodos de avaliação para averiguar corretamente os efeitos agudos em um período curto de tempo de exposição, avaliando imobilidade ou mortalidade entre outros fatores fisiológicos, assim como, os possíveis efeitos crônicos a longo prazo, relacionados ao crescimento, desenvolvimento e comportamento (QUEIROZ & SILVA, 2021).

Com relação a legislação brasileira referente aos ensaios ecotoxicológicos Resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), se refere aos padrões de lançamento de efluentes, os quais, não devem prejudicar os organismos aquáticos que habitam nos rios que receberão estes efluentes. Porém, a formulação de leis mais rigorosas é estabelecida de acordo com as normas e entendimentos de cada estado brasileiro, ou seja, os estados ficam livres para estabelecer seus próprios limites de toxicidade (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

5.7.1 Ensaio de toxicidade aguda

É um teste que avalia a resposta rápida e severa em organismos aquáticos em um intervalo de tempo de 0 a 96 horas, para se manifestar sobre o estímulo (substância) analisada (RAND & PETROCELLI, 1985). O objetivo é determinar a Concentração Letal Média (CL_{50}) ou também chamada de Concentração Efetiva Média (CE_{50}), ou seja, a concentração da substância tóxica que proporcionou a mortalidade ou imobilidade, correspondente a 50% do total de organismos testados, em um determinado intervalo de tempo de exposição (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

A escolha do organismo-teste geralmente utiliza alguns critérios de seleção como abundância e disponibilidade, sua biologia, fisiologia, hábitos alimentares, sensibilidade, facilidade de cultivo em laboratório, entre outros fatores (RAND & PEROCCELLI, 1995). Porém uma única espécie de organismo

não pode representar integralmente os impactos causados em determinados ecossistemas, visto que, não existe apenas uma, e sim diversas espécies de organismos, portanto, existe a necessidade de realizar com mais de um organismo-teste o ensaio de toxicidade (BAUN *et al.*, 1999).

A literatura recomenda no mínimo três espécies de diferentes níveis na cadeia trófica, a fim de representar uma comunidade de organismos em um ecossistema, por conseguinte, os resultados obtidos serão mais precisos e eficazes, sobre o efeito tóxico da substância testada. Essa estratégia assegura uma probabilidade maior de detecção de uma resposta tóxica em diferentes organismos, devido as suas sensibilidades não serem semelhantes (BAUN *et al.*, 1999). Os testes com peixes e dafnideos são os principais métodos de teste de controle ambiental (SANDBACKA *et al.*, 2000). A *D. magna* e *D. Rerio* podem ser empregados em conjunto como um sistema de alerta em situações de contaminação aguda, como por exemplo, derramamentos acidentais, despejos de efluentes de pisciculturas e indústrias de pescado (MAGALHÃES & FERRÃO FILHO, 2008).

5.7.1.1 *Daphnia magna* – Microcrustáceo

A *D. Magna* (Straus, 1820), é uma espécie de microcrustáceo zooplanctônico de água doce, pertence à ordem *Cladocera* e é conhecida popularmente como pulga d'água (figura 5) (ANTUNES & CASTRO, 2017; COSTA *et al.*, 2008). Essa denominação é atribuída à Daphniadevido ao movimento das suas antenas, que dão a aparência de estarem se movendo em pequenos saltos (BARROSO, 2009), (ANTUNES & CASTRO, 2017; COSTA *et al.*, 2008).



Figura 5. Espécime de *Daphnia magna* adulta. **Fonte:** Autoria própria: Dias, (2024).

A *Daphnia* é comumente utilizada em ensaios de toxicidade de ambientes poluídos (MATSUMOTO *et al.*, 2009). Possuem uma posição intermediária na cadeia trófica como consumidores primários, o que faz com que o seu papel seja de grande relevância no ecossistema aquático (SANTOS *et al.*, 2017).

Os microcrustáceos são amplamente encontrados nos corpos d'água, onde se alimentam de algas, bactérias e matéria orgânica particulada em suspensão através do processo de filtração (BRENTANO, 2006). Também, servem como fonte de alimento para os consumidores secundários da cadeia trófica, como os peixes e outros animais (SARMA & NANDINI, 2006). Além disso, eles exigem pouca manutenção em laboratório, são fáceis de cultivar, por apresentar uma rápida taxa de crescimento e são sensíveis a várias classes de substâncias (SARMA & NANDINI, 2006; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006).

5.7.1.2 *Danio rerio* – Zebrafish

O *D. Rerio* (Hamilton, 1822), é comumente conhecido como zebrafish, peixe-zebra (SPENCE *et al.*, 1943) ou paulistinha (BERTOLETTI, 2009), devido ao seu padrão de cores escuras e claras alternadas em listras horizontais (figura 6), (SPENCE *et al.*, 1943). Pertence à família dos peixes de água doce Cyprinidae (NELSON, 1994), originário do sul da Ásia com ampla distribuição em parte da Índia, Nepal, Paquistão (BHAT, 2003).



Figura 6. Espécie adulta de *Danio rerio*. **Fonte:** A autoria própria: Dias, (2024).

É um modelo de organismo versátil amplamente utilizado em vários campos de pesquisa toxicológicas, devido as suas características morfológicas (KACHANOV *et al.*, 2023; ÇELEBI *et al.*, 2023), as quais, oferecem informações sobre a suscetibilidade a poluentes ambientais e aos riscos de substâncias tóxicas existentes no ambiente aquático (ÇELEBI *et al.*, 2023).

REFÊRENCIAS

ABIMORAD, E.G.; STRADA, W.L.; SCHALCH, S.H.C.; GARCIA, F.; CASTELLANI, D.; MANZATTO, M.R. Silagem de peixe em ração artesanal para tilápia-do-Nilo. **Pesquisa agropecuária Brasileira**. Brasília. v. 44, n.5, p. 519-525, 2009.

ADEWUMI, A.A.& OLA-OLADIMEJI, F.A. Performance características and feed utilization of african cat fish (*Clarias gariepinus*) fed varying inclusion levels of fermented mulberry leaf. **Direct Research Journal of Agriculture and Food Science**, v.4, n.5, p. 87-93, 2016.

AGOSTINI-COSTA, T.D.S.; WONDRACECK, D.C.; ROCHA, W.D.S.; SILVA, D.B.D. Carotenoids Profile and Total Polyphenols in Fruits of *Pereskia aculeata* Miller. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.34, p.234–238, 2012.

ALTA, J. C. O.; ROQUE, R.; ONO, E. A.; TAVARES-DIAS, M. Antiparasitic efficacy and blood effects of formalin on *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae). **Aquaculture**, v. 479, p. 38-44, 2017.

ANDRADE-PORTO, S. M.; AFFONSO, E. G.; KOCHHANN, D.; ANTUNES, S.C.; CASTRO, B.B. Pulgas-de-água (*Daphnia spp.*). **Revista de Ciência Elementar**, v.5, n.04, p. 050, 2017.

ASSANE, I.M. **Atividade antimicrobiana do tianfenicol sobre bactérias patogênicas de peixes**. Dissertação de Pós-Graduação em Aquicultura. Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista – CAUNESP/UNESP, Jaboticabal, 2018.

ASTUTI, D.A.; BECKER, K.; RICHTER, N. Energy and protein balance of Nile tilapia fed with moringa and mulberry leaves. **Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia**, v.15, n. 1, p. 71-79, 2012.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish**. Sixth Edit ed. [s.l.] Springer International Publishing Switzerland, 2016.

AVELAR G.S.; MEDEIROS, S.L.S.; COSTA, L.M.S.; VIEIRA, W.C.; COSTA, A.S. **Utilização das folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* mill) na dieta de leitões na fase de creche**. VI semana de Ciência e Tecnologia IFMG, 2013.

AZEVEDO, J. D. J., CASTRO, A. C. L., SOARES, L. S., SILVA, M. H. L., FERREIRA, H. R., & MAGALHÃES, L. A. Comprimento médio de primeira maturação para a Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758 (Perciformes: Cichlidae) capturado na Bacia do Bacanga, São Luís, MA. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, v.25, n.1, p.49-54, 2012.

BABALOLA, O. A.; FAKUNMOJU, F. A. Effect of partial replacement of fishmeal with *Leucaena leucocephala* leaf meal on the growth performance of *Tilapia zilli* fingerlings. **Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research**, v. 9, n. 2, p. 9–14, 18 set. 2020.

BAROSSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, v.1, p.108-113, 1978.

BAUN, A.; KLOEFT, L.; BJERG, P.L.; NYHOLM, N. Toxicity testing of organic chemicals in groundwater polluted with lan fill leached. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.18, n.9, p. 2046-2053, 1999.

BERTOLETTI, E. Determination of Chronic Ecotoxicity to *Danio rerio*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.4, n.1-3, p.1-7, 2009.

BHAT, A. Diversity and composition of freshwater fishes in streams of Central Western Ghats, India. **Environmental Biology of Fishes**, v.68, p.25–38, 2003.

BOMFIM, M., A., D.; LANNA, E., A., T. Fatores que afetam os coeficientes de digestibilidade nos alimentos para peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.1, nº1, p.20-30, 2004.

BOONE, M., JAMES, S. Aquatic and terrestrial mesocosms in amphibian ecotoxicology. **Applied Herpetology**, 2, 231–257, 2005.

BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A.; NEU, D.H.; DIETERICH, F. Sistema orgânico de produção de pescado de água doce. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 13, n. 2, 2012.

BOSCOLO, W.R.; SIGNOR, A.; FREITAS, J.M.A.;BITTENCOURT,F.;FEIDEN,A.Nutrição de peixes nativos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.145-154.2011.

BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T.; GARRITY, G. M.; BRENNER, D. J.; VOS, P. De; GARRITY, G. M.; GOODFELLOW, M.; NOEL, R. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria, The Gammaproteobacteria**. Second Edi ed. [s.l.] Springer, 2005.

BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BRUDLER, S.; RYGAARD, M.; ARNBJERG-NIELSEN, K.; HAUSCHILD, M.Z.; AMMITOSE, C.; VEZZARO, L. Pollution levels of stormwater discharges and resulting environmental impacts. **Science of the Total Environment**, 2019.

BULLER, N. B. **Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: A practical identification manual**. Second Edition. [s.l.] CABI, 2014.

CALDEIRA, A.C.C.; SOUZA, C.J.F.; COSTA, M.V.A.; SOARES, R.P.P.; GONÇALVES, G.S. Anestesia em tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Journal of Health Review**, 2022. DOI: 10.34119/bjhrv5n6-021

CASTAGNOLLI, N. Piscicultura de água doce. **Jaboticabal: Funep**, 189p, 1992.

ÇELEBI, H.; BAHADIR, T.; SIMSEK, İ.; TULUN, S. Danio rerio: A sustainable model for monitoring pollutants in aquatic environments. **Environmental Sciences Proceeding**, v.25, p.69, 2023.

CIRIO, G.; PEREIRA, J.R.; PAULA, L.C. Prognóstico Agropecuário Sericultura – Relatório Anual 2022. Departamento de Economia Rural – DERAL. **SEAB – Secretaria da Agricultura e do Abastecimento/Paraná**, v.14, n.48, 2022.

CONCEIÇÃO, M. C., JUNQUEIRA, L. A., SILVA, K. C. G., PRADO, M. E. T., & RESENDE, J. V. Thermal and microstructural stability of a powdered gum derived from *Pereskia aculeata* Miller leaves. **Food Hydrocolloids**, 40, 104-114, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.015>

CONTRERAS CASTRO, Jorge Humberto. Efecto sobre el rendimiento técnico de la Tilapia Nilotica Chitralada resultante de la sustitucion de la dieta con Falso Girasol y Morera en la etapa de ceba. **Revista CITECSA – Ciencia Tecnología Sociedad y Ambiente**, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2012.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University, p.257-261, 1981.

CYRINO, J. E. P. *et al.* A nutrição de peixes e o ambiente. In: I Simpósio de nutrição e saúde de peixes, 2005, Botucatu. Anais. **Botucatu: AQUANUTRI**, 2005.

CYRINO, J.E.P.; FRACALOSSO, D.M. A pesquisa em nutrição de peixes e o desenvolvimento da aquicultura no Brasil: uma perspectiva histórica. In: FRACALOSSO, D.M.; CYRINO, J.E.P. **Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, cap.1, p.1-8, 2012.

DE OLIVEIRA, H.A.B.; ANUNCIAÇÃO, P.C.; DA SILVA, B.P.; DE SOUZA, Â.M.N.; PINHEIRO, S.S.; DELLA LUCIA, C.M.; DE MORAIS CARDOSO, L.; CASTRO, L.C.V.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Nutritional Value of Non-Conventional Vegetables Prepared by Family Farmers in Rural Communities. **Ciência Rural**. 49, 8, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180918>

DIAS, P.S. **Digestibilidade e inclusão da farinha da folha de amoreira (*Morus alba*) em rações para alevinos de tilapia do Nilo.** Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável) -Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2019.

DIAS, P.S.; BALEN, R.E.; NOVOWORSKI, J.; COLPINI, L.M.S.; MEURER, F. Mulberry leaf meal (*Morus alba*) on the performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in growth. **Concilium**, v. 22, n. 3, p. 507–519, 7 maio 2022b. DOI: <https://doi.org/10.53660/CLM-266-269>

DIAS, P.S.; SANTOS, H. K.; BALEN, R. E. ZADINELO, I. V.; MEURER, F. Energy and nutrient digestibility from mulberry (*Morus alba*) leaf meal for Nile tilapia. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 44, p. 1–6, 8 mar. 2022a.

FARIA, A.E.N.O; Dias, J.A.R.; SOUSA, N.C.; COUTO, M.V.S.; ABE, H.A.; SANTOS NETO, E.; SANTOS, R.T.V.S.; MENESES, J.O.; CUNHA, F.S.; MARIA, A.N.; CARNEIRO, P.C.F.; SOUSA, R.C.; FUJIMOTO, R.Y. Resistência de tambaquis suplementados com probiótico ao desafio com *Aeromonas hydrophila*. **VIII Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação da Embrapa Tabuleiros Costeiros**, p. 38, 2018.

FERNANDES, T. R. C. *et al.* Características de carcaça e parâmetros de desempenho do tambaqui (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818) em diferentes tempos de cultivo e alimentados com rações comerciais. **Boletim Instituto de Pesca**, v. 36, n. 1, p. 45-52, 2010.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira e Zootecnia**, v.37, suplemento especial p. 08-14, 2008.

FIUZA, D.H. Um “Rebanho” Africano em Águas Brasileiras: história ambiental global da dispersão da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e Rendalli (*Coptodon rendalli*) no Brasil. **Revista De História Da UEG**, v.12, n.2, e222310, 2023. DOI: <https://doi.org/10.31668/revistaueg.v12i2.13899>

FONSECA-LÓPEZ, D.; SALAMANCA-LÓPEZ, A.E.; NIÑO-MONROY, L.E.; RORÍGUEZ-MOLANO, C.E.; HOYOS-CONCHA, J.L.; OTERO-RAMÍREZ, I.; LAGOS, N.R.T. Caracterización nutricional y de producción de biomassa de *Sambucus peruviana*, *Sambucus nigra* y *Morus alba* en un banco forrajero. **Ciência en Desarrollo**, v.12. n.2, p. 23-32, 2019.

FRACALOSSO, D.M; CYRINO, J.E.P. 2013. **Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira.** 1ª edição. Florianópolis – SC: Aquabio, 2013. 232p.

FURUYA, W. M. Redução do impacto ambiental por meio da ração. In: III Seminário de aquicultura, maricultura e pesca, 2007, Belo Horizonte. Anais. **Belo Horizonte: FAZU**, p.121-139, 2007.

FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; BOSCOLO, W. R.; CYRINO, J. E. P.; FURUYA, V. R. B.; FEIDEN, A. 2010. **Tabelas brasileiras para nutrição de tilápias**. Toledo: GFM, 2010.

FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; FURUYA, V.R.B.; BARROS, M.M. Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alguns ingredientes pela tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.) (linhagem tailandesa). **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 23, p. 465-469, 2001.

GENG, Y.; LIU, D.; HAN, S.; ZHOU, Y.; WANG, K. Y.; HUANG, X. L.; CHEN, D. F.; PENG, X.; LAI, W. M. Outbreaks of vibriosis associated with *Vibrio mimicus* in freshwater catfish in China. **Aquaculture**, v. 433, p. 82–84, 2014.

GONZÁLEZ, F.H.D. Uso de perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.O.; OSPINA, H.; RIBEIRO, L.A.O. (Eds). **Perfil Metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

GOWHAR, H.D.; ROUF, A.B.; AZRA, N.K.; MOHAMMAD, Z.C.; HUMAIRA, Q.; RUBIYA, D.; MOHAMMAD, A.M. Correlation between pollution trends of freshwater boies and bacterial disease of fish fauna. In book: **Fresh water Pollution Dynamics and Remediation**, p.51-67, 2020. DOI: 10.1007/978-981-13-8277-2_4

GUPTA, M. V; ACOSTA, B. O. From drawing board to dining table: The success story of the GIFT project. **NAGA, WorldFish Center Quarterly**, v. 27, n. 3, p. 4–14, 2005.

HAHN-VON-HESSBERG, C.M.; GRAJALES-QUINTERO, A.; GRAJALES-HAHN, S. Experiencias del cultivo de la morera *Morus alba* L, 1753 (Rosales: Moraceae) y su utilización em la alimentación de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus*, Trew, 1984 (Perciformes: Cichlidae) para programas de seguridade alimentaria en el trópico. **Boletín Científico Centro de Museos Historia Natural**, v. 22, n. 2, p. 42-48, 2018.

HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R.; SOARES, C.M.; MEURER, F. Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2 SUPPL, p. 823–828, 2002.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35–73, 2010.

JIANG, W.; LIN, Y.; QIAN, L.; MIAO, L.; LIU, B.; GE, X.; SHEN, H. Mulberry leaf meal: A potential feed supplement for juvenile *Megalobrama amblycephala*

“Huahai No. 1”. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 128, p.279-287, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.07.022>

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 12 ed. São Paulo: Nacional, p.280-281, 1998.

JOLY, A.B. **Introdução à taxonomia vegetal**. Câmara Brasileira do Livro, 1975.

JULINTA, R. B.; ABRAHAM, T. J.; ROY, A.; SINGHA, J.; DASH, G. Histopathology and Wound Healing in Oxytetracycline Treated *Oreochromis niloticus* (L.) Against *Aeromonas hydrophila* Intramuscular Challenge. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 8, n. 488, p. 1-6, 2016.

KABIR, N.M.J, WEE, K.L., MAGUIRE, G. Estimation of apparent digestibility coefficients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using different markers. 1. Validation of microtracer F-Ni as a marker. **Aquaculture**, v.167 p. 259-272, 1998.

KACHANOV, D.; ELISTRATOV, L.; GUSEINOV, H.; BALAEVA, K.; POPOVA, N. A comparative review of the use of *Danio rerio* (zebrafish) as a model object in preclinical studies. **Georgian Med News**, v.337, p.21-24, 2023.

KAVITHA, C.; RAMESH, M.; KUMARAN, S.S.; LAKSHMI, S. A. Toxicity of Moringa oleifera seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Hannover, v.64, n.7-8, p.681- 687, nov, 2012.

KOVALSKI, E.C.J.; ORO, A.L.S.; RETCHESKI, M.C.; ROMÃO, S.; CAZAROLLI, L.H. **Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*) – avaliação do potencial de uso como aditivo na dieta de tilápias do Nilo**. XII Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica – UFFS...ANAIS, v.1, n.12, 2022.

KOZINSKA, A. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. **Journal of Fish Diseases**, v.30, p. 293-301, 2007.

KURNIATI, N.F.; SURYANI, G.P.; SIGIT, J.I. Vasodilator effect of ethanolic extract mulberry leaves (*Morus alba* L.) in rat and rabbit. **Procedia Chemistry**, v.13, p.142-146, 2014. DOI: 10.1016/j.proche.2014.12.018

LEITE, A.C.V. **Avaliação do desempenho zootécnico, hematologia e atividade enzimática de juvenis de matrinxã alimentados com níveis crescentes de proteína**. Dissertação Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal da Amazonas, Manaus, 2018.

LI, S-F.; ELE, X-J.; HU, G-C.; CAI, W-Q.; DENG, X.W.; ZHOU, P-Y. Improving growth performance and caudal fin stripe pattern in selected F6-F8 generations of GIFT Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) using mass selection.

Aquaculture Research, v. 37, n. 12, p. 1165–1171, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01543.x>

LIMA JUNIOR, F. A., CONCEIÇÃO, M. C., RESENDE, J. V., JUNQUEIRA, L. A., PEREIRA, C. G., & PRADO, M. E. T. Response surface methodology for optimization of the mucilage extraction process from *Pereskia aculeata* Miller. **Food Hydrocolloids**, v.33, n.1, p. 38-47, 2013.

LUPCHINSKI JÚNIOR, E.; VARGAS, L.; POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; MANGOLIM, C. A.; LOPERA-BARRERO, N. M. Avaliação da variabilidade das gerações G0 e F1 da linhagem GIFT de tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por RAPD. **Acta Scientiarum. Animal Science**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 233-240, 2008.

MACEDO, M.C.C.; SILVA, V.D.M.; SERAFIM, M.S.M.; DA VEIGA CORREIA, V.T.; PEREIRA, D.T.V.; AMANTE, P.R.; DA SILVA, A.S.J.; DE OLIVEIRA PRATA MENDONÇA, H.; AUGUSTI, R.; DE PAULA, A.C.C.F.F.; MELO, J.O.F.; PIRES, C.V.; FANTE, C.A. Elaboration and Characterization of *Pereskia aculeata* Miller Extracts Obtained from Multiple Ultrasound-Assisted Extraction Conditions. **Metabolites**, v.13, p.691, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo13060691>

MACIEL, V. B. V., BEZERRA, R. Q., CHAGAS, E. G. L., YOSHIDA, C. M. P., & CARVALHO, R. A. Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller): a potential alternative for iron supplementation and phytochemical compounds. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, e2020180, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.18020>

MADEIRA, N.R.; AMARO, G.B.; MELO, R.A.D.C.E.; BOTREL, N.; ROCHINSKI, E. **Cultivo de Ora-pro-Nóbis (*Pereskia*) em Plantio Adensado Sob Manejo de Colheitas Sucessivas**. Circular Técnica 156; Embrapa Hortaliças: Brasília, Brazil, 2016. Disponível: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1066888/cultivo-de-ora-pro-nobis-pereskia-em-plantioadensado-sob-manejo-de-colheitas-sucessivas> (Acesso em Julho 2024).

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**; v.12, n.3, p.355-381, 2008.

MARIUTTI, L.R.B.; REBELO, K.S.; BISCONSIN-JUNIOR, A.; DE MORAIS, J.S.; MAGNANI, M.; MALDONADE, I.R.; MADEIRA, N.R.; TIENGO, A.; MARÓSTICA, M.R.; CAZARIN, C.B.B. The Use of Alternative Food Sources to Improve Health and Guarantee Access and Food Intake. **Food Research International**. 149, 110709, 2021.

MATOS, E. J.A.; URBINATI, E.C.; MEURER, F. **Farinha de folhas na nutrição de peixes**. Editora: Atena, Ponta Grossa – PR, 2023.

MATSUMOTO, K.; HOSOKAWA, M.; KURODA, K.; ENDO, G. Toxicity of agricultural chemicals in *Daphnia magna*. **Osaka City Medical Journal**, v.55, p.89-97, 2009.

MIRANDA, J. E., BONACIN, G. A., & TAKAHASHI, R. Produção e qualidade de folhas de amoreira em função da época do ano e de colheita. **Scientia Agricola**, v. 59, p. 499–504, 2002.

MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A.W.S.; SILVA, J.V.; SOUZA, V.R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 521–526, 2007.

MORO, G. V. & RODRIGUES, A. P. O. **Rações para organismos aquáticos: tipos e formas de processamento**. Palmas, TO:EMBRAPA PESCA E AQUICULTURA, 2015.

MORO, G.V.; REZENDE, F.P.; ALVES, A.L.; HASHIMOTO, D.T.; VARELA, E.S.; TORATI, L.S. Espécies de peixe para piscicultura. In: LIMA, A.F.; RODRIGUES, A.P.O.; ALVES, A.L.; LUIZ, D.B.; HASHIMOTO, D.T.; VARELA, E.S.; REZENDE, F.P.; MATOS, F.T.; et al. Piscicultura de água doce multiplicando conhecimentos. **Brasília, DF: Embrapa**, 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington: **National Academy of Science**, 2011.

NAWAZ, M.; KHAN, A. A.; KHAN, S.; SUNG, K.; STEELE, R. Isolation and characterization of tetracycline-resistant *Citrobacter* spp. from catfish. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 85–91, 2008.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3rdedn. Wiley, New York, 1994.

NG, W. K.; WEE, K. L. The nutritive value of cassava leaf meal in pelleted feed for Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 83, n. 1–2, p. 45–58, dez. 1989.

NING, L.; GAO, L.; ZHOU, W.; LIU, S.; CHEN, X.; PAN, Q. Beneficial effects of dietary mulberry leaf along with multi-enzyme premix on the growth, immune response and disease resistance of golden pompano *Trachinotus ovatus*. **Aquaculture**, v. 535, p.736396, 2021.

NODA, Y.; MARTÍN, G.J. Influencia de la densidade de plantación y la fertilización nitrogenada em el rendimiento de *Morus alba* var. tigreada. **Pastos y Forrajes**, v.37, n.3, p.291-297, 2014.

NOGA, E. J. **Fish Disease: Diagnosis and Treatment**. Second Edi ed. [s.l.] Wiley Blackwell, 2010.

NOSE T. Recent advances in the study of fish digestion in Japan. In: **Symposium on Feeding Trout and Salmon Culture**, Belgrade, 1966.

OECD. Series on Testing and Assessment, No. 203 - Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation, OECD Publishing, Paris, 2017. DOI.org/10.1787/9789264274693-en

OFORI, J.K.; DANKWA, H.R.; BRUMMETT, R.; ABBAN, E.K. Producing tilapia in small cage in West Africa. **World fish center technical manual no the WFC**, Penang, Malaysia. 16p. 2009.

OKAMOTO, F., & RODELLA, R. A. Características morfo-anatômicas e bromatológicas de folhas de amoreira em relação às preferências do bicho-da-seda. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 195-203, 2006.

OKAMOTO, F.; CUNHA, E. A.; BUENO, M. S.; PORTO, A. J.; SANTOS, L. E. Manejo da Cultura da Amoreira (*Morus alba* L.) Sub Pastejo com Ovinos. **Boletim Industria Animal**, v. 65, p. 271-276, 2007.

OLIVEIRA, E.G.; SANTOS, F.J.S.; PEREIRA, A.M.L.; LIMA, C.B. **Produção de Tilápia: Mercado, Espécie, Biologia e Recria**. Circular Técnica 45. Embrapa Meio –Norte, 2007.

ORO, A. L. S. **Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*) – avaliação do potencial de uso como aditivo na dieta de tilápias do Nilo**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação de Engenharia de Aquicultura) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2019.

PAVANELLI, G. C., EIRAS, J. C., TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá: Ed. UEM, 2ª Ed., 305p., 2002. PAVLIDIS, M.; FUTTER, W. C.; KATHARIOS, P.; DIVANACH, P. Blood cell profile of six Mediterranean mariculture fish species. **Journal of Applied Ichthyology**, Neu Wulmstorf, v. 23, n.1, p. 70-73, feb, 2007.

PEREIRA, A. C. **Produção de Tilápia**. Programa de Desenvolvimento Rural Sustentável em Microbacias, p. 52, 2012.

PEZZATO, L. E., DE MIRANDA, E. C., BARROS, M. M., PINTO, L. G. Q., PEZZATO, A. C., & FURUYA, W. M. Valor nutritivo do farelo de coco para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, 22, 695-699, 2000.

PEZZATO, L., E.; MIRANDA, E., C., BARROS, M., M. Digestibilidade aparente da matéria seca e da proteína e a energia digestível de alguns alimentos alternativos pela Tilápia do Nilo (*O. niloticus*). **Acta Scientiarum**. v. 26, n3, p.329-337, 2004.

PORTO, F.G.S.; CAMPOS, Â.D.; CARREÑO, N.L.V.; GARCIA, I.T.S. *Pereskia aculeata* Leaves: Properties and Potentialities for the Development of New Products. **Natural Product Research**. 36, 4821–4832, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.2010070>

QUEIROZ, L.G.; SILVA, D. **Mesocosmos como modelo experimental na avaliação da ecotoxicidade aquática**. In: Recurso Água – Tecnologias e pesquisas para o uso e a conservação de ecossistemas aquáticos, p.35-59, 2021.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington. 665p. 1985.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Ed. EDUEM: Maringá, 2013.

RETCHESKI, M.C. **Efeito da ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*) na dieta de tilápias (*Oreochromis niloticus*) sobre a atividade de enzimas digestivas e perfil bioquímico**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação de Engenharia de Aquicultura) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeira do Sul, 2022.

RIBEIRO, M.T.; CALDAS, B.M.S.; ROCHA, G.C.; SANTANA, A.P.; NAVARRO, R.D. Seasonal occurrence and variation of ectoparasites in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the Federal District, Brazil. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, 2022. DOI: 10.4025/actascibiolsci.v44i1.56963

RIBEIRO, O.; PINTO, M.Q.; FÉLIX, L.; MONTEIRO, S.M.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; CARROLA, J.S. O peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo emergente na ecotoxicologia. **Revista de Ciência Elementar**, v.10 (02):021, 2022.

RODRIGUES, A.P.O.; BERGAMIN, G.T.; SANTOS, V.R.V. Nutrição e alimentação de peixes. In: LIMA, A.F.; RODRIGUES, A.P.O.; ALVES, A.L.; LUIZ, D.B.; HASHIMOTO, D.T.; VARELA, E.S.; REZENDE, F.P.; MATOS, F.T.; *et al.* Piscicultura de água doce multiplicando conhecimentos. **Brasília, DF: Embrapa**, 2013.

RODRIGUES, L.A.; FERNANDES, J.B.K. Influência do processamento da dieta no desempenho produtivo do acará bandeira (*Pterophyllum scalare*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.28, n.1, p.113-118, 2006.

SAAVEDRA, M. J., FIGUERAS, M. J., MARTÍNEZ-MURCIA, A. J. Updated phylogeny of the genus *Aeromonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56, 2481-7, 2006.

SANDBACKA, M.; CHRISTIANSON, I.; ISOMAA, B. The acute toxicity of surfactantes on fish cells, *D. Magna* an fish – a comparative study. **Toxicology in Vitro**, 14: 61-68, 2000.

SANTOS, E.L.; BEZERRA, K.S.; SOARES, E.C.S.; SILVA, T.J.; FERREIRA, C.H.L.H.; SANTOS, C.C.S.; SILVA, C.F. Desempenho de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com folha de mandioca desidratada na dieta. **Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.5, p.1421-1428, 2015.

SANTOS, V. S. S.; CAIXETA, E. S.; CAMPOS JÚNIOR, E. O.; PEREIRA, B. B. Ecotoxicological effects of larvicide used in the control of *Aedes aegypti* on non target organisms: redefining the use of pyriproxyfen. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues**, v. 80, n. 3, p. 155-160, 2017.

SARMA, S.S.; NANDINI, S. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. **Journal of environmental science and health Part B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, v.41, n.8, p.1417-1430, 2006.

SIEMER, S. **Expressão de genes associados ao crescimento muscular em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) melhoradas**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Pós-graduação em Zootecnia, Área de concentração Produção Animal - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2021.

SILVA, A.S.E.; LIMA, J.T.A.X.; BLANCO, B.S. Hematologia em peixes (revisão bibliográfica). **Revista Centauro**, v.3, n.1, p.24-32, 2012.

SILVA, N.F.N.; SILVA, S.H.; BARON, D.; NEVES, I.C.O.; CASANOVA, F. *Pereskia aculeata* Miller as a novel food source: A review. **Foods**. 12, 2092, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12112092>

SILVA, V. B. M.; BRAINER, M.M.A.; SOUZA, J.; OLIVEIRA, H.B.; SOUZA, V.B.L.; CÂNDIDO, G.P. **Rendimento de carcaça e cortes nobres de frangos alimentadas com farinha da folha de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*)**. In: 7º Congresso Estadual de Iniciação Científica e Tecnológica do IF Goiano. Anais...2018, p. 1-3, 2018.

SINDAN. **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal**. Compêndio de Produtos Veterinários, 2018.

SOARES, C.M.; HAYASHI, C.; FARIA, A.; FURUYA, W.M. Substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do farelo de canola em dietas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.30, n. 4, p. 1172-1177, 2001.

SOUZA, L.F.; CAPUTO, L.; DE BARROS, I.B.I.; FRATIANNI, F.; NAZZARO, F.; DE FEO, V. *Pereskia aculeata* Muller (*Cactaceae*) Leaves: Chemical Composition and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**. 17, 1478, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17091478>

SOUZA, M. L. R.; BACCARIN, A.E.; VIEGAS, E.M.M.; KRONKA, S.N. Defumação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) inteira eviscerada e filé: aspectos referentes às características organolépticas, composição centesimal e perdas ocorridas no processamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 27–36, 2004.

SOUZA, M.R.D.M.; PEREIRA, P.R.G.; PEREIRA, R.G.F.; BARBOSA, I.D.P.; BARACAT-PEREIRA, M.C. Protein Yield and Mineral Contents in *Pereskia aculeata* under High-Density Planting System. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. 50, 1–8, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-40632020v5062365>

SOUZA, M.S.S.; BARBALHO, S.M.; GUIGUER, E.L.; ARAÚJO, A.C.; BUENO, P.C.S.; FARINAZZI-MACHADO, F.M.V.; LIMA, L.M.L.; SILVA, B.C.; MENDES, C.G. Effects of *Pereskia aculeata* miller on the biochemical profiles and body composition of wistar rats. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 3, p. 82-89, 2015.

SOUZA, R. C.; MELO, J. F. B.; NOGUEIRA FILHO, R. M.; CAMPECHE, D. F. B.; & FIGUEIREDO, R. A. C. R. Influência da farinha de manga no crescimento e composição corporal da tilápia do Nilo. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, n. 238, p. 217-225, 2013.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, 83, p.13-34, 2008.
STANIER, R. Y. A Note on the Taxonomy of *Proteus Hydrophilus*. **Journal of bacteriology**, v. 46, n. 2, p. 213–4, 1943.

SUDHAKAR, P., HANUMANTHARAYAPPA, S. K., SWAMY, G. M. R., JALAJA, S. K., & SIVAPRASAD, V. Impact of micro irrigation methods on mulberry (*Morus alba* L.) leaf quality and production. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, 6, 332-339, 2018.

TAKEITI, C. Y., ANTONIO, G. C., MOTTA, E. M., COLLARES-QUEIROZ, F. P., & PARK, K. J. Nutritive evaluation of non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. 1, (Suppl.1), p. 148-160, 2009.

TAVARES-DIAS, M.; AFFONSO, E. G.; OLIVEIRA, S. R.; MARCON, J. L.; EGAMI, M. I. Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. **Acta Amazonica**, v.38, n.4, Manaus, dezembro, 2008.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 4, p. 913–918, 2017.

TEIXEIRA, E.A.; SALIBA, E.O.S.; EULER, A.C.C.; FARIA, P.M.C.; CREPALDI, D.V.; RIBEIRO, L.P. Coeficientes de digestibilidade aparente de alimentos

energéticos para juvenis de surubim. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.9, p.1180-1185, 2009.

TEIXERA, E., A.; SALIBA, E., O., S.; EULER, A., Z., C., C.; FARIA, P., M., C.; CREPALDI, D., V.; RIBEIRO, L., P.; 2010. Coeficientes de digestibilidade aparente de alimentos energéticos para juvenis de surubim. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.39, n.6, p.1180-1185, 2010.

TELLES, C.C.; MATOS, J.M.D.M.; MADEIRA, N.R.; DE MENDONCA, J.L.; BOTREL, N.; JUNQUEIRA, A.M.R.; DA SILVA, D.B. *Pereskia aculeata*: Ora-pro-Nobis. In: VIEIRA, R.F., CAMILLO, J., CORADIN, L. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro: Região Centro-Oeste**. Eds.; MMA: Brasília, Brazil, p. 280–289, 2016.

TRUHAUT, T. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 1: 151-173, 1977.

URBINATI, E.C., GONÇALVES, F.D., TAKAHASHI, I.s., 2013. Pacu (*piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B., DE CARVALHO GOMES, I. **Espécies nativas para piscicultura no brasil. 2ª edição revisada e ampliada**. Editora UFSM, Santa Maria, p. 205–244, 2013.

WATANABE, W.O.; LOSORDO, T.M.; FITZSIMMONS, K.M.; HANLEY, F. Tilapia Production systems in the Americas: technological advances, trends, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, 10: 3-4. pp. 465- 498, 2002.

WEE, K. L.; WANG, S.-S. Nutritive value of Leucaena leaf meal in pelleted feed for Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 62, n. 2, p. 97–108, 1 maio 1987.

YANCEY, D. R.; MENEZES, J. R. R. **Manual de criação de peixes**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 117p., 1983.

YOUNG, L.G.; LOW, A.G.; CLOSE, W.H. Digestion and metabolism techniques in pigs. In: Miller ER, Ullrey DE, Lewis AJ. **Syine nutrition**. Stoneham: Butterworth-Heineman, p. 623-630, 1991.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. In: **Ecotoxicologia**. São Carlos: Editora Rima, p. 413-427, 2006.

ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - Princípios e aplicações**, 2a ed. Rima, São Carlos, 2008.

ZHOU, S.; HUANG, Z.; LIN, H.; KONG, L.; M.A. J.; LONG, Z.; QUIN, H.; LIU, L.; LIN, Y.; LI, Z. Effects of mulberry leaf extratc on the intestinal health of spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). **Fronteiers in Marine Science**, vol. 10, 2023.

6 CAPÍTULO II

**DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIGESTIBILIDADE DOS
NUTRIENTES E ENERGIA E DISPONIBILIDADE DE AMINOÁCIDOS DAS
FARINHAS DE FOLHAS DE AMOREIRA E ORA-PRO-NÓBIS PARA PACU**

6.1 INTRODUÇÃO

Em 2023, a produção nacional de peixes nativos, incluindo o pacu, correspondeu a 29,7% da produção total de peixes de cultivo (PEIXEBR, 2024).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*), é encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, e tem grande importância econômica nas planícies alagadas do Pantanal. Possui boa capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais, e se destaca das demais espécies de peixes cultivadas pela sua demanda nutricional única, especialmente, por carboidratos não estruturais, (URBINATI *et al.*, 2010).

A utilização de ingredientes alternativos esta despertando um grande interesse na formulação de dietas para peixes. Nesse sentido, é essencial realizar testes de digestibilidade e disponibilidade para avaliar sua verdadeira eficácia nutricional absorção pelo sistema digestivo dos peixes, e também para verificadr se não interferem negativamente nasaúde e no crescimento dos animais (SILVA *et al.*, 2019; BUZZOLO *et al.*, 2018).

A FFA (farinha de folha de amoreira) são uma opção promissora como ingrediente na composição das dietas para peixes. A FFA é rica em nutrientes, incluindo proteínas, ácidos graxos, minerais, vitaminas e fitonutrientes, e contribui para aumentar as taxas de crescimento. (TANG *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2019; CHAN *et al.*, 2016).

A FFO (farinha de folha de ora-pro-nóbis) também é uma excelente fonte alternativa de proteínas, minerais e vitaminas (TAKEITI *et al.*, 2009). Suas folhas contem teores de proteína de 20 a 30% dependendo da composição do solo e da região (LIMA JUNIOR *et al.*, 2013). Também, contêm compostos fotoquímicos com propriedades anti-flamatórias (MACIEL *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2016; AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2012).

No contexto da aquicultura moderna, onde a eficiência e a sustentabilidade são prioridades, determinar a digestibilidade e disponibilidade desses ingredientes é fundamental. A determinação desses coeficientes não apenas promove o crescimento saudável e a qualidade da carne, assim como,

reduz o desperdício de alimentos e os impactos ambientais associados à produção intensiva de peixes (MITHUNKUMAR *et al.*, 2023).

Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi determinar o CDA (Coeficiente de digestibilidade aparente) dos nutrientes de FFA e FFO, energia e disponibilidade de aminoácidos essenciais e não essenciais, para definir a quantidade digestível para pacus, e contribuir com informações técnico científicas para futuros estudos de substituição ou inclusão de ingredientes tradicionais.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Tecnologia em Aquicultura (LATAq) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Campus Avançado de Jandaia do Sul/PR. O experimento teve duração de 104 dias, e foram utilizados um total de 150 juvenis de pacu, com peso médio de $30 \pm 3,5\text{g}$.

Os peixes foram adquiridos de uma piscicultura comercial parceira do Laboratório. Todos os procedimentos adotados neste estudo seguiram os Princípios Éticos de Experimentação Animal e foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da UFPR do Setor Palotina/PR, conforme protocolo nº 15/2022 (anexos I).

A estrutura experimental foi composta por três tanques circulares de polietileno com capacidade de 1.000L cada, conectados a um biofiltro circular de fibra de vidro com capacidade de 2.000L. Os tanques foram subdivididos em três gaiolas, cada uma, capaz de conter 50 animais, integrando um sistema fechado de recirculação de água. No biofiltro, foram colocadas macrófitas (*Eichhornia crassipes*), em aproximadamente 35% da área do biofiltro, com o objetivo de remover material orgânico, especialmente, nitrogênio e fósforo (LÓPEZ-DOVAL *et al.*, 2016),

Os parâmetros de qualidade da água, como temperatura e oxigênio dissolvido, foram monitorados diariamente, tanto pela manhã (7h:00min) quanto à tarde (16h:00min). Para essas medições foram utilizados um termômetro de coluna de mercúrio e um oxímetro digital (marca Alfakit®). Os valores médios obtidos foram de $22,9 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ e $23,7 \pm 1,1^{\circ}\text{C}$ para temperatura,

e de $7,02 \pm 0,89$ mg/L⁻¹ e $6,67 \pm 1,04$ mg/L⁻¹ para oxigênio dissolvido. Além disso, demais parâmetros como pH e amônia (NH₃) foram medidos uma vez por semana, com o auxílio de um kit colorimétrico (marca Alfakit®). As seguintes medias foram obtidas $7,34 \pm 0,27$ para pH e $0,002 \pm 0,003$ mg/L⁻¹ para NH₃. Todos os parâmetros monitorados durante o período experimental estavam dentro da zona de conforto para o cultivo de pacu (URBINATI *et al.*, 2010).

A determinação dos CDA dos nutrientes e energia das farinhas de folhas de amoreira e ora-pro-nóbis, foi realizada pelo método indireto de coleta parcial de excretas. O óxido crômico (Cr₂O₃) na concentração de 0,1% foi utilizado como o marcador inerte (HONORATO *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2009), O oxido crômico é um dos marcadores mais empregados em estudos de nutrição de peixes com uma ração prática como referência e uma ração teste (DIAS *et al.*, 2022).

As rações-teste foram compostas por 70% da ração-referência e 30% do alimento a ser testado constituído por folhas de ora-pro-nóbis (*P. Aculeata*) e folhas de amoreira (*M. Alba*). Foram corrigidas apenas a quantidade de suplementos minerais, vitamínicos e sal. Para a fabricação da ração-referência e das rações-teste (Tabela 1), os componentes e os alimentos testados foram secos em estufa de ventilação forçada por 72h à 60°C. Em seguida, foram moídos em um triturador tipo martelo em peneira de 0,5 mm e, posteriormente, misturados de acordo com a sua formulação e finalmente peletizadas. Essa prática de processamento dos ingredientes das rações experimentais, bem como, a sua fabricação foram feitas seguindo a metodologia utilizada por Meurer *et al.*, (2003).

A peletização foi realizada em uma peletizadora experimental pelo umedecimento prévio da mistura com água à temperatura de cerca de 60°C. Após a peletização, as rações foram quebradas utilizando um saco plástico, onde foram colocadas e chacoalhadas até apresentar diâmetros adequados ao tamanho da boca dos animais. Posteriormente, foram secas em uma estufa de ventilação forçada por 24h à 55 °C, e após a secagem foram armazenadas em sacos plásticos escuros (para não haver oxidação por conta de luz) e mantidas em refrigeração até o momento da sua utilização.

Tabela 1. Composição percentual das dietas: Ref. (Referência), FFA Farinha de folha de amoreira) e FFO (Farinha de folha de ora-pro-nóbis).

Alimento	Ref.	FFA	FFO
Farelo de Soja	58,51	40,96	40,96
Milho	34,52	24,16	24,16
Fosfato Bicálcico	2,80	2,30	2,30
Óleo de Soja	2,40	1,68	1,68
Premix ¹	1,00	1,00	1,00
CR ₂ O ₃	0,10	0,10	0,10
Sal comum	0,10	0,10	0,10
Calcário	0,10	0,10	0,10
B.H.T.	0,01	0,01	0,01
FFA	0,00	29,52	0,00
FFO	0,00	0,00	29,52
Total	100,00	100,00	100,00

¹Premix: Suplemento vitamínico e mineral para peixes composto por Ácido fólico - 1200,00 mg/Kg; Ácido pantotêmico - 10,00g/Kg; B.H.T. - 8.000,00mg/Kg; Biotina - 200,00mg/Kg; Cobalto 80,00mg/Kg; Cobre - 3.500,00mg/Kg; Ferro - 20,00g/Kg; Inositol - 25,00g/Kg; Iodo - 160,00mg/Kg; Manganês - 10,00g/Kg; Niacina - 20,00g/Kg; Selênio - 100,00mg/Kg; Vitamina A - 2.400.000,00UL/Kg; Vitamina B1 - 4.000,00mg/Kg; Vitamina B12 - 8,000mcg/Kg; Vitamina B2 - 4.000,00mg/Kg; Vitamina B6 - 3.500,00mg/Kg; Vitamina D3 - 600.000,00UI/Kg; Vitamina E - 30.000,00 UI/Kg; Vitamina K3 - 3.000,00mg/Kg; Zinco - 24,00g/Kg. **Fonte:** PX PEIXES COCARI S/COL (Lote: 2023).

O ensaio de alimentação e coleta de fezes teve uma duração total de 56 dias, com um período de jejum de 48 horas, durante a troca de rações. O manejo adotado para a coleta das fezes foi realizado por meio da distribuição dos peixes em gaiolas instaladas dentro do tanque de alimentação. Os peixes permaneceram nesse tanque durante todo o período de adaptação e alimentação. As cubas de coleta de fezes foram utilizadas apenas durante o período de coleta, a qual, foi feita somente durante a tarde e à noite (7h), segundo a metodologia utilizada por Dias *et al.*, (2021).

O período de adaptação para cada ração foi de cinco dias (DEGANI *et al.*, 1997). Durante esse período os peixes permaneceram sempre na caixa de alimentação e arraçoados à vontade, três vezes ao dia, duas vezes pela manhã e uma à tarde. O tanque de alimentação foi sifonado uma vez ao dia para

retirada de fezes e restos de ração. Esse processo foi feito após a retirada das gaiolas para as cubas de coleta de fezes, utilizando a mesma água do tanque de alimentação para encher as cubas de coleta de fezes, totalizando uma renovação de 80% de água. Após o período de adaptação, iniciou-se o período de coleta de fezes.

No período de coleta de fezes os peixes foram mantidos durante o dia nas gaiolas dentro do tanque de alimentação, onde foram alimentados às 8h30min, 11h30min e 15h00min. Após 20 minutos da última refeição, as gaiolas foram transferidas para suas respectivas, cubas de coleta. Após a retirada das gaiolas, as válvulas das cubas coletoras foram fechadas para desconectar os copos coletores de fezes e acondicionamento das fezes em recipientes plásticos. Para esse procedimento sempre foi tomado o cuidado de retirar as escamas antes das amostras serem guardadas sob refrigeração até as análises químicas. A água das cubas não foi renovada. As cubas totalmente esvaziadas e lavadas entre as coletas.

A coleta de fezes foi feita pelo período necessário até a obtenção da quantidade de fezes adequada para as análises. Antes de reiniciar o processo com outra ração, os peixes passaram um dia em jejum, e novamente foram mantidos por cinco dias para adaptação com a nova ração, e início das novas coletas de fezes (DEGANI *et al.*, 1997). A utilização de gaiolas para o acondicionamento dos peixes foi feita com o objetivo de evitar a possibilidade de eles ingerirem excretas ou ração lixiviada do fundo dos tanques e das cubas de coletas de fezes.

Para a realização das análises os ingredientes e as rações foram moídos. As fezes foram descongeladas, secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 24h, em seguida, peneiradas para retirada de escamas, moídas, e armazenadas em embalagens plásticas para análise posterior, conforme metodologia utilizada por Dias *et al.*, (2021). As análises químico-bromatológicas das fezes, rações e ingredientes para avaliação dos valores de energia bruta foram determinados por meio de uma bomba calorimétrica no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental da empresa EMBRAPA Meio Ambiente em Jaguariúna/SP.

As análises do perfil de aminoácidos foram realizadas utilizando a metodologia de White et al., (1986), para triptofano Lucas & Sotelo (1980) no Laboratório CBO – Análises Laboratoriais em Valinhos/SP. A determinação de proteína bruta (PB) foi feita pelo método de Kjeldahl; extrato etéreo (EE) pelo método de Goldfish; matéria seca (MS) pelo método de peso constante, cinzas, FDA (Fibra de Detergente Ácido) e FDN (Fibra de Detergente Neutro) pelo método de lavagens, no LATAq do Campus de Jandaia do Sul/UFPR, utilizando a metodologia de acordo com AOAC (2019).

A abertura das amostras para a quantificação de óxido de cromo (Cr_2O_3) foi realizada por meio de uma solução ácida, conforme descrito por Bremer Neto *et al.*, (2003). As quantificações do óxido crômico (Cr_2O_3) foram feitas através da metodologia descrita por Bremer Neto *et al.*, (2003), por leitura em espectrofotômetro de absorção atômica (KIMURA & MILLER, 1957), no Laboratório de Solos da Universidade Estadual de Maringá - UEM/PR.

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes, energia bruta e aminoácidos foram calculados de acordo com as diretrizes do NRC (2011), com as seguintes equações:

$$DTd = 1 - 1 \left(\frac{\% Id}{\% If} \right)$$

$$Dand = 1 - 1 \left(\frac{\% Id}{\% If} \times \frac{\% Nf}{\% Nif} \right)$$

$$Dams = \frac{1}{\% \text{ ing}} \left(Dtdtes - \frac{\% dref}{1} \times Dtedref \right)$$

$$Daning = \frac{1}{\% \text{ ing}} \left(Dandtes - \frac{\% dref}{1} \times Danddref \right)$$

Em que *Dtd*, a digestibilidade total da dieta referência e da dieta teste (%); *Dand*, a digestibilidade aparente dos nutrientes nas dietas referências e

testes (%); *Id*, o indicador na dieta; *If*, o indicador nas fezes; *Nf*, o nutriente nas fezes; *Nd*, o nutriente na dieta; *Dams*, a digestibilidade aparente da matéria seca do ingrediente; *Dtdtes*, a digestibilidade total da dieta teste; *dref*, a dieta referência; *Dtdref*, a digestibilidade total da dieta referência; *Daning*, a digestibilidade aparente do nutriente do ingrediente; *Dandtes*, a digestibilidade do nutriente da dieta teste, *Dandref*, a digestibilidade do nutriente da dieta referência.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a composição bromatológica dos nutrientes e energia da FFA e FFO (Tabela 2) revelaram algumas variações em relação aos dados encontrados na literatura até o momento. Para a FFA, os teores de PB, EE e MS encontrados foram similares aos valores reportados por Vu *et al.*, (2011) e Dias *et al.*, (2022), porém, inferiores aos resultados de Al-Kirshi *et al.*, (2013) e Wang *et al.*, (2017).

Em contrapartida, os valores de cinzas e fibras não foram disponibilizados na literatura consultada. Para a FFO, observou-se que os teores de PB e EE se aproximaram dos valores relatados por Daniel (2022), enquanto, os teores de MS e cinzas não foram mencionados nos estudos anteriores. Além disso, a FFO apresentou uma quantidade significativamente maior de fibra bruta (FB), comparada com os estudos de Takeiti *et al.*, (2009) e Sommer *et al.*, (2022), indicando uma possível variação na composição bromatológica dessa matéria-prima de acordo com o local de cultivo e método de processamento.

Os resultados obtidos para a composição mineral e de aminoácidos das Farinhas de Folha de Amoreira (FFA) e Folha de Ora-pro-Nóbis (FFO) também revelaram algumas variações em relação aos dados disponíveis na literatura até o momento. No caso da FFA, os teores minerais, como Fe, Zn, Mg, Mn, Ca, K e P (tabela 3), mostraram variações em relação aos estudos anteriores.

Enquanto alguns estudos, como Okamoto & Rodella (2006) e Vu *et al.*, (2011), relataram teores dentro de uma faixa específica, outros estudos

realizados por Dias *et al.*, (2022), apresentaram resultados discrepantes. Isso pode ser atribuído a diferentes fatores, como variações sazonais, métodos de cultivo e processamento das folhas.

Quanto ao perfil de aminoácidos da FFA, os resultados obtidos também variaram em relação à literatura, com algumas semelhanças em aminoácidos como histidina, arginina e leucina, conforme observado em estudos anteriores (AL-KIRSHI *et al.*, 2009; ASTUTI *et al.*, 2012).

No caso da FFO, os teores minerais e de aminoácidos também apresentaram variações em relação aos estudos prévios. Enquanto alguns estudos, realizados por Rocha *et al.*, (2008), reportaram teores dentro de uma faixa específica para minerais como Fe, Zn e Mg, outros, como Sommer *et al.*, (2022), apresentaram resultados diferentes. Essas variações podem ser atribuídas a diferentes condições de cultivo e métodos de processamento das folhas.

Quanto ao perfil de aminoácidos da FFO (Tabela 5), os resultados obtidos também divergem em relação aos estudos anteriores, com algumas semelhanças em aminoácidos como histidina, arginina e leucina, conforme observado em estudos realizados por Takeiti *et al.*, (2009) e Silveira *et al.*, (2020). Essas variações destacam a importância da realização de mais pesquisas para obtenção de uma compreensão mais abrangente da composição nutricional desses ingredientes.

Os resultados apresentados nas Tabelas 8 e 9 fornecem uma visão abrangente da composição bromatológica e do perfil de aminoácidos das dietas de referência (Ref.) e das dietas de teste, incluindo FFA (Teste 1), FFO (Teste 2) para o pacu. Em relação à composição bromatológica, os resultados da Tabela 8 revelam variações nos teores de nutrientes, energia e minerais entre as diferentes dietas. Notavelmente, as dietas de teste apresentam variações na PB, EE, FDN, FDA e minerais em comparação com a dieta de referência. Por exemplo, as dietas de teste 1 e 3 mostram redução na PB em relação à referência, enquanto, a dieta de teste 4 apresenta um aumento significativo no teor de EE. Além disso, os teores de minerais como Fe, Zn, Mg, Mn, Ca, K e P variaram entre as diferentes dietas, refletindo a diversidade de ingredientes utilizados na formulação das dietas de teste.

Por outro lado, os resultados apresentados na Tabela 9 destacam o perfil de aminoácidos essenciais e não essenciais nas diferentes dietas. Observa-se que os teores de aminoácidos variaram entre as dietas de teste e a dieta de referência. Por exemplo, as dietas de teste 1 e 3 mostraram redução em alguns aminoácidos essenciais, como histidina, arginina e treonina, em comparação com a referência. Além disso, os teores de aminoácidos não essenciais também variaram entre as dietas, refletindo a composição específica dos ingredientes utilizados em cada dieta experimental.

Esses resultados ressaltam a importância de uma formulação precisa das dietas para atender às necessidades nutricionais dos peixes utilizados na piscicultura. Como afirmado por CASTRO et al., (2021) "A formulação precisa das dietas é crucial para garantir um desempenho nutricional adequado dos peixes em cultivo", o que reforça a importância de compreender e ajustar a composição das dietas de acordo com as características nutricionais dos ingredientes utilizados.

Os resultados dos coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) estão representados na tabela 10, e também dos nutrientes, energia e aminoácidos essenciais e não essenciais dos ingredientes testados, os quais, revelaram diferenças entre a FFA, FFO. A FFO apresentou o maior CDA de PB (64,91%) seguida pela FFA (50,52%). Isso sugere que a FFO é uma fonte de proteína mais facilmente digerível para o pacu em comparação com a FFA. A FFA apresentou o maior coeficiente de digestibilidade de extrato etéreo (76,72%), seguido FFO (32,78%). Isso indica que a FFA é uma fonte de lipídios mais facilmente digerível em comparação com a FFO. Além disso, estudos anteriores mostraram que a PB na folha de moringa foi bem digerida por robalo e pacu (81% e 75%), sugerindo uma alta digestibilidade para esses nutrientes em outras espécies de peixes (CHO & KAUSHIK, 1990).

Os valores de MS e cinzas apresentaram variações mínimas entre os ingredientes, com valores relativamente altos de digestibilidade para todas as fontes. Os valores de EB encontrados são consistentemente altos para todos os ingredientes, com pouca variação entre eles. Isso é condizente com os resultados anteriores que demonstraram alta digestibilidade de energia para diferentes fontes de alimentos para peixes (UCHOI *et al.*, 2018).

Quanto aos aminoácidos, a FFO apresentou valores mais altos para a maioria dos aminoácidos essenciais em comparação com a FFA, com exceção de metionina. Os aminoácidos não essenciais tendem a variar mais entre os ingredientes. Os dados sugerem que a FFO pode ser uma fonte mais eficiente de proteína bruta para o pacu em comparação com a FFA. Para extrato etéreo, a FFA mostrou uma digestibilidade relativamente alta, enquanto a FFO apresentou valores mais baixos.

Os resultados obtidos ressaltam a importância de considerar não apenas os CDA dos nutrientes e energia, mas também, o perfil de aminoácidos disponíveis ao formular dietas para peixes, visando otimizar o crescimento e a saúde dos animais.

Tabela 2. Composição bromatológica dos nutrientes e energia da FFA e FFO.

Farinha de Folhas de Amoreira								
Literatura	PB (%)	EE (%)	MS (%)	Cinzas (%)	Fibra (%)	FDN (%)	FDA (%)	EB (Kcal/Kg)
Okamoto & Rodella (2006)	21,62	-	-	8,06	-	-	-	-
Vu <i>et al.</i> , (2011)	22,30	3,5	-	13,6	-	-	-	-
Al-Kirshi <i>et al.</i> , (2013)	29,80	5,57	9,25	11,81	-	-	-	4,203
Wang <i>et al.</i> , (2017)	18,81	1,67	-	-	-	-	-	4,940
Dias <i>et al.</i> , (2022)	24,25	2,15	94,81	11,31	-	-	-	3,985
Autoria própria: Dias, (2024)	20,84	2,44	92,85	7,66	-	35,8	14,22	4,050
Farinha de Folhas de Ora-pro-Nóbis								
Rocha <i>et al.</i> , (2008)	22,93	3,64	3,47	19,33	13,52	-	-	-
Takeiti <i>et al.</i> , (2009)	28,40	4,10	-	16,10	39,10	-	-	-
Fidélix <i>et al.</i> , (2010)	20,36*	5,38*	-	15,27*	61,67*	-	-	-
Botrel <i>et al.</i> , (2020)	18,50*	4,49*	-	20,52*	34,18*	-	-	22,62*
Daniel (2022)	23,25	4,40	-	20,26	11,36	-	-	22,96*
Sommer <i>et al.</i> , (2022)	16,14	5,53	95,28	14,59	57,16	-	-	121,70*
Autoria própria: Dias, (2024)	21,22	2,71	5,55	7,75	-	44,0	11,72	3360,00

*Amostra *In natura* da folha de ora-pro-nóbis analisada em g 100g⁻¹.

Tabela 3. Composição de minerais das FFA e FFO

Literatura	Farinha de Folhas de Amoreira- FFA						
	Fe ¹ (mg/Kg)	Zn ² (mg/Kg)	Mg ³ (mg/Kg)	Mn ⁴ (mg/Kg)	Ca ⁵ (mg/Kg)	K ⁶ (mg/Kg)	P ⁷ (mg/Kg)
Autoria própria: Dias, (2024)	0,98	0,17	15,1	0,43	83,13	4,83	0,90
Farinha de Folhas de ora-pro-Nóbis – FFO							
	Fe ¹ (mg/Kg)	Zn ² (mg/Kg)	Mg ³ (mg/Kg)	Mn ⁴ (mg/Kg)	Ca ⁵ (mg/Kg)	K ⁶ (mg/Kg)	P ⁷ (mg/Kg)
TAKEITI <i>et al.</i> , (2009)	0,01	0,03	1,9	0,05	3,42	1,63	0,16
Oliveira <i>et al.</i> , (2013)	0,01	0,1	0,68	0,003	2,16	3,74	0,45
Almeida <i>et al.</i> , (2014)	0,02	0,01	0,59	0,04	1,35	3,92	0,32
Souza <i>et al.</i> , (2016)	0,02	0,004	0,71	-	4,65	3,64	0,47
Oliveira <i>et al.</i> , (2019)	0,02	0,006	1,27	0,02	6,49	3,28	0,34
Botrel <i>et al.</i> , (2020)	0,01	0,003	0,09	0,01	0,27	0,32	0,02
Silveira <i>et al.</i> , (2020)	0,02	0,01	0,94	-	4,10	4,43	0,18
Autoria própria: Dias, (2024)	0,55	0,12	17,79	0,56	36,66	4,09	0,35

¹Fe: Ferro; ²Zn: Zinco; ³Mg: Magnésio; ⁴Mn: Manganês; ⁵Ca: Cálcio; ⁶K: Potássio; ⁷P: Fósforo.

Tabela 4. Composição do perfil de aminoácidos da FFA (%).

Aminoácidos	Al-Kirshi <i>et al.</i> , (2009)	Astuti <i>et al.</i> , (2012)	Wang <i>et al.</i> , (2017)	Autoria própria: Dias, (2024)
Histidina	0,69	0,92	0,35	0,31
Arginina	1,80	1,86	0,89	0,81
Treonina	1,31	1,39	0,79	0,59
Valina	1,76	1,47	0,62	0,75
Metionina	0,52	-	0,36	0,17
Isoleucina	1,43	1,22	0,74	0,59
Leucina	2,58	2,46	1,45	1,14
Fenilalanina	1,94	-	0,92	0,77
Lisina	1,88	1,84	1,11	0,87
Triptofano	0,27	0,54	0,26	0,47
Ácido Aspartico	3,06	-	1,77	0,88
Ácido Glutâmico	3,33	-	1,92	1,44
Serina	1,22	-	0,80	0,64
Glicina	1,57	-	0,99	0,73
Alanina	1,54	-	1,09	0,85
Prolina	1,30	-	0,88	0,66
Tirosina	0,82	-	0,62	0,53
Cistina	0,30	-	0,30	0,12

Tabela 5. Composição do perfil de aminoácidos da FFO.

Aminoácidos	Takeiti <i>et al.</i> , (2009)	Botrel <i>et al.</i> , (2019)	Silveira <i>et al.</i> , (2020)	Autoria própria: Dias, (2024)
Histidina	0,59 g	2,41 g	2,4 g	0,40 %
Arginina	1,44 g	5,48 g	-	0,89 %
Treonina	1,00 g	3,75 g	3 g	0,63 %
Valina	-	4,09 g	4,69 g	0,88 %
Metionina	0,23 g	0,42 g	-	0,12 %
Isoleucina	1,07 g	3,21 g	3,69 g	0,70 %
Leucina	2,00 g	6,19 g	6,9 g	1,17 %
Fenilalanina	1,27 g	4,63 g	-	0,82 %
Lisina	1,43 g	4,26 g	4,69 g	0,80 %
Triptofano	5,52 g	1,44 g	2,1 g	0,39 %
Ácido Aspartico	1,71 g	6,42 g	-	1,24 %
Ácido Glutâmico	2,67 g	9,39 g	-	2,3 %
Serina	1,00 g	3,94 g	-	0,59 %
Glicina	1,31 g	5,39 g	-	0,90 %
Alanina	1,36 g	-	-	0,84 %
Prolina	1,19 g	4,78 g	-	0,76 %
Tirosina	1,21 g	3,19 g	-	0,67 %
Cistina	0,35 g	-	-	0,17 %

Tabela 6. Composição bromatológica de nutrientes, energia e minerais analisada das dietas: Ref. e Teste 1 – FFA, Teste 2 – FFO para o pacu.

Nutrientes							
	PB %	EE %	FDN %	FDA %	MS %	Cinza%	EB Kcal/Kg
Ref.	33	3,21	14,93	5,42	92,49	8,83	4320,00
Teste 1	27	4,61	33,62	8,10	92,10	8,30	4210,00
Teste 2	29	3,42	31,79	7,52	93,20	8,21	4120,00
Minerais Mg/Kg							
	Fe	Zn	Mg	Mn	Ca	K	P
Ref.	2,12	0,75	7,36	1,01	37,3	4,50	139,37
Teste 1	1,03	0,63	7,92	1,14	45,64	34,73	91,13
Teste 2	1,79	0,79	15,12	1,67	49,88	47,73	116,39

Tabela 7. Composição bromatológica do perfil de aminoácidos analisada das dietas: Ref. e Teste 1 – FFA, Teste 2 – FFO para o pacu.

Aminoácidos Essenciais										
	Histidina	Arginina	Treonina	Valina	Metionina	Isoleucina	Leucina	Fenilalanina	Lisina	Triptofano
Ref.	0,88	2,05	1,11	1,32	0,37	1,22	2,36	1,51	1,68	0,45
Teste 1	0,66	1,73	0,91	1,14	0,25	1,02	1,90	1,28	1,33	0,36
Teste 2	0,76	1,92	1,07	1,35	0,28	1,25	2,08	1,35	1,49	0,44
Aminoácidos Não-essenciais										
	Ácido Aspartico	Ácido Glutâmico	Serina	Licina	Alanina	Prolina	Tirosina	Cistina		
Ref.	2,95	5,37	1,51	1,26	1,47	1,58	1,09	0,42		
Teste 1	2,09	3,98	1,19	1,09	1,24	1,30	0,85	0,29		
Teste 2	2,71	4,59	1,26	1,20	1,32	1,39	0,99	0,34		

Tabela 8. Coeficiente de digestibilidade e disponibilidade aparente dos nutrientes e energia e do perfil de aminoácidos da FFA, FFO para o pacu.

Nutrientes e Energia										
Ingredientes	PB %	EE %	MS %	Cinza%	EB Kcal/Kg					
FA	50,52	76,72	65,70	74,62	63,56					
FO	64,91	32,78	62,71	74,68	65,89					
Aminoácidos Essenciais										
	Histidina	Arginina	Treonina	Valina	Metionina	Isoleucina	Leucina	Fenilalanina	Lisina	Triptofano
FA	31,01	64,38	51,27	48,15	4,90	42,40	50,19	51,97	40,45	57,43
FO	67,47	79,25	68,56	71,00	24,44	68,73	68,17	69,81	72,30	67,15
Aminoácidos Não-essenciais										
	Ácido Aspartico	Ácido Glutâmico	Serina	Glicina	Alanina	Prolina	Tirosina	Cistina		
FA	50,89	46,49	45,46	26,70	49,75	44,90	38,81	40,00		
FO	68,80	69,21	70,08	64,93	74,83	73,45	62,22	47,65		

Tabela 9. Valores digestíveis e disponíveis de nutrientes e energia de FFA, FFO para o pacu.

Ingredientes	Nutrientes e Energia									
	PB %	EE %	MS %	Cinza %	Energia Kcal/Kg					
FA	10,53	1,87	61,01	5,72	2574,00					
FO	13,77	0,89	59,92	5,79	2392,00					
Aminoácidos Essenciais										
	Histidina	Arginina	Treonina	Valina	Metionina	Isoleucina	Leucina	Fenilalanina	Lisina	Triptofano
FA	0,10	0,52	0,30	0,36	0,01	0,25	0,57	0,40	0,35	0,27
FO	0,27	0,71	0,43	0,62	0,03	0,48	0,80	0,57	0,58	0,26
Aminoácidos Não-essenciais										
	Ácido Aspartico	Ácido Glutâmico	Serina	Glicina	Alanina	Prolina	Tirosina	Cistina		
FA	0,45	0,67	0,29	0,19	0,42	0,30	0,21	0,05		
FO	0,85	1,59	0,41	0,58	0,63	0,56	0,42	0,08		

6.4 CONCLUSÃO

Conclui-se que a FFA e FFO apresentam um CDA para nutrientes e energia, e um coeficiente de disponibilidade de aminoácidos essenciais e não essenciais, adequados como fontes de proteína para utilização em trabalhos futuros para melhoria do desempenho de Pacus.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T.D.S.; WONDRACECK, D.C.; ROCHA, W.D.S.; SILVA, D.B.D. Carotenoids Profile and Total Polyphenols in Fruits of *Pereskia aculeata* Miller. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 34, 234–238, 2012.
- AL-KIRSHI, R. A., ALIMON, A., ZULKIFLI, I., ATEFEH, S., ZAHARI, M., W., & IVAN, M. Nutrient digestibility of mulberry leaves (*Morus alba*). **Italian Journal of Animal Science**, v. 12, p. 219-221, 2013.
- AL-KIRSHI, R. A., ALIMON, A., ZULKIFLI, I., ZAHARI, M., W., & SAZILI, A. Q. The chemical composition and nutritive value of mulberry leaf as a protein source in poultry diets. **The 1st International Seminar on Animal Industry Bogor**, v.1, p. 81-85, 2009.
- AOAC: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. 21th ed., AOAC International, Arlington, 2019.
- ASTUTI, D., BECKER, K., & RICHTER, N. Energy and protein balance of Nile tilapia fed with moringa and mulberry leaves. **Masyarakat Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia**, 15, 71-79, 2012.
- ASTUTI, D.A.; BECKER, K.; RICHTER, N. Energy and protein balance of nile tilapia fed with moringa and mulberry leaves. **Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia**, v.15, n. 1, p. 71-79, 2012.
- BREMER NETO, H.; GRANER, C.A.F.; PEZZATO, L.E.; PADOVANI, C.R.; CANTELMO, O.A. Diminuição do teor de óxido de cromo (III) usado como marcador externo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.249-255, 2003. DOI: 10.1590/S1516-35982003000200001.
- BUZZOLO, H.; NASCIMENTO, T.M.T.; SANDRE, L.C.G. et al. Apparent digestibility coefficients of feedstuff used in tambaqui diets. **Bolem Instituto Pesca**, v.44, p.316-322, 2018.
- CASTRO, V.S.; XAVIER, D.T.O.; SILVA, A.F.C.; FONSECA, J.R.S.; BOSCOLO, W.R.; FREIDEN, A.; SIGNOR, A.; SIGNOR, A.A. Probióticos do gênero *Bacillus* em dietas para pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e51810717032, 2021.
- CHAN, E.W.; LYE, P.Y.; WONG, S.K. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. **Chinese Journal Natural Medicines**, v. 14, p. 17-30, 2016.
- CHEN, C.; MOHAMAD, R. U.; SAIKIM, F. H.; MAHYUDIN, A.; MOHD, N. N. *Morus alba* L. plant: bioactive compounds and potential as a functional food ingrediente. **Foods**, v. 10, n. 3, 2021.

DANIEL, A.V. **Caracterização da PANC ora-pro-nóbis: composição bromatológica, atividade antioxidante e digestibilidade *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2022.

DEGANI, G.; VIOLA, S.; YEHUDA, Y. Apparent digestibility of protein and carbohydrate in feed ingredients for adult tilapia (*Oreochromis aureus* X *O. niloticus*). **Bamidgeh**, v.49, n.3, p.115-123, 1997.

DIAS, P.S.; SANTOS, H. K.; BALEN, R. E. ZADINELO, I. V.; MEURER, F. Energy and nutrient digestibility from mulberry (*Morus alba*) leaf meal for Nile tilapia. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 44, p. 1–6, 8 mar. 2022.

HONORATO, C. A.; DA SILVA NUNES, C.; DE ALMEIDA, L. C.; VASCONCELOS MARTINS CARRILHO, E. N.; MORAES, G. DIGESTIBILIDADE DE DIETAS PELETIZADAS E EXTRUSADAS PARA O PACU: QUANTIFICAÇÃO DO ÓXIDO DE CROMO. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 269–275, 2012. DOI: 10.7213/academica.7712

KIMURA, F. T., & MILLER, V. L. Improved determination of chromic oxide in calf feed and feces. **Journal Agriculture Foodstuffs Chemistry**, 5, 216, 1957.

LIMA JUNIOR, F. A., CONCEIÇÃO, M. C., RESENDE, J. V., JUNQUEIRA, L. A., PEREIRA, C. G., & PRADO, M. E. T. Response surface methodology for optimization of the mucilage extraction process from *Pereskia aculeata* Miller. **Food Hydrocolloids**, 33(1), 38-47, 2013.

LIU, Y.; LI, Y.; PENG, Y.; HE, J.; XIAO, D.; CHEN, C.; LI, F.; HUANG, R.; YIN, Y. Dietary mulberry leaf powder affects growth performance, carcass traits and meat quality in finishing pigs. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutri.** (Berlin), v. 103, p. 1934-1945, 2019.

LÓPEZ-DOVAL, J. C.; MEIRELLES, S. T.; CARDOSO-SILVA, S.; MOSCHINICARLOS, V.; POMPÊO, M. Ecological and toxicological responses in a multistressor scenario: Are monitoring programs showing the stressors or just showing stress? A case study in Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 540, p. 466–476, 2016.

LUCAS, B.; SOTELO, A. Effect of different alkalies, temperature, and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. **Analytical Biochemistry**, New York, n.109, p.192-197, 1980.

MACIEL, V. B. V., BEZERRA, R. Q., CHAGAS, E. G. L., YOSHIDA, C. M. P., & CARVALHO, R. A. Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller): a potential alternative for iron supplementation and phytochemical compounds. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, e2020180, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.18020>

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R. Apparent digestibility of some protein sources for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 32, n. 06, p. 1801-1809, 2003.

MITHUNKUMAR, S., ATHITHAN, S., PADMAVATHY, P., LINGAPRABU, D., & VIJAYAMIRTHARAJ, K. S. Effect of deoiled silkworm pupae meal (*Bombyx mori*) as a replacement of fish meal in the diet of juveniles of Silver pompano, *Trachinotus blochii*. **Research Square**, 2023.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of Fish and Shrimp**. Washington, D.C., 376p., 2011.

OKAMOTO, F., & RODELLA, R. A. Características morfo-anatômicas e bromatológicas de folhas de amoreira em relação às preferências do bicho-da-seda. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 195-203, 2006.

PEIXEBR. **Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixes BR 2024**. Associação Brasileira de Piscicultura, 2024.

ROCHA, D. R. da C.; PEREIRA JÚNIOR, G. A.; VIEIRA, G.; PANTOJA, L.; SANTOS, A. S.; PINTO, N. A. V. D. Macarrão adicionado de Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 4, p. 459-65, out./dez., 2008.

SILVA, R. S.; SANTO, R. V. E.; BARBOSA, A. V. C.; SANTOS, M. A. S.; CORRÊA, R. O.; MARTINS JÚNIOR, H.; LOURENÇO JÚNIOR, J. B. Digestibilidade aparente do farelo de palmito em tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 5, p. 1595-1600, 2019.

SILVEIRA, M.G.; PICININ, C.T.R.; CIRILLO, M.A.; FREIRE, J.M.; BARCELOS, M.F.P Nutritional assay *Pereskia* spp.:unconventional vegetable. Agrarian Sciences. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.92, suppl.1, 2020. DOI: 10.1590/0001-3765202020180757

SOMMER, M. C., RIBEIRO, P. F. A. & KAMINSKI, T. A. Obtenção e caracterização físico-química da farinha de ora-pro-nóbis. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 2, p. 6878-6892, 2022.

SOUZA, L.F.; CAPUTO, L.; DE BARROS, I.B.I.; FRATIANNI, F.; NAZZARO, F.; DE FEO, V. *Pereskia aculeata* Muller (*Cactaceae*) Leaves: Chemical Composition and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**. 17, 1478, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17091478>

TAKEITI, C. Y., ANTONIO, G. C., MOTTA, E. M., COLLARES-QUEIROZ, F. P., & PARK, K. J. Nutritive evaluation of non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. 1, (Suppl.1), p. 148-160, 2009.

TANG, X.; FU, J.; GAO, Q.; LIU, G.; YE, J.; GUAN, Q.; SHI, Y.; XU, M. Effects of mulberry (*Morus Alba L.*) leaf extracts on growth, immune response, and antioxidante functions in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Annals of Animal Science**, v. 22, n. 1, p. 349-369, 2022.

TEIXEIRA, E.A.; SALIBA, E.O.S.; EULER, A.C.C.; FARIA, P.M.C.; CREPALDI, D.V.; RIBEIRO, L.P. Coeficientes de digestibilidade aparente de alimentos energéticos para juvenis de surubim. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.9, p.1180-1185, 2009.

URBINATI, E. C. et al. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B. & GOMES, L. C. (2º ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, Santa Maria: UFSM, p. 205-244, 2010.

VU, C. C., VERSTEGEN, M. W. A., HENDRIKS, W. H., & PHAM, K. C. The nutritive value of mulberry leaves (*Morus alba*) and partial replacement of cotten seed in rations on the performance of growing vietnamese cattle. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, 24, 1233-1242, 2011. doi: 10.5713/ajas.2011.90328.

WANG, C., YANG, F., WANG, Q., ZHOU, X., XIE, M., KANG, P., WANG, Y., & PENG, X. Nutritive value of mulberry leaf meal and its effect on the performance of 35- 70-day-old geese. **Japan Poultry Science Association**, 54, 41-46, 2017. doi:10.2141/jpsa.0160070.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; KRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino acid analysis of food materials. **Journal Automatic Chemistry**, v.8, p.170-177, 1986.

7 CAPÍTULO III

**EFEITO DA INCLUSÃO DE FARINHA DE FOLHAS DE AMOREIRA NAS DIETAS
DE JUVENIS DE TILÁPIA DO NILO**

7.1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento acelerado da aquicultura brasileira e da disponibilidade de vários tipos de matérias-primas para formulações de dietas, somadas as crescentes oportunidades de mercado muitas tecnologias inovadoras vem sendo desenvolvido para a cadeia produtiva da piscicultura (LIMA *et al.*, 2015). Os avanços nos conhecimentos sobre nutrição e manejo alimentar tem contribuído para intensificar a expansão dos sistemas intensivos de produção e promovendo o crescimento do setor ao longo das últimas décadas (PEDROZA FILHO *et al.*, 2020; PINTO *et al.*, 2017).

Nesse panorama, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) se destaca entre as diversas espécies para o cultivo com uma representatividade na produção nacional de 579.080 toneladas em 2023, ou seja, 65,3% da produção total (PEIXEBR, 2024).

A tilápia do Nilo se destaca entre as espécies de cultivo devido as suas características zootécnicas como resistência elevada, crescimento acelerado, rusticidade, ótima adaptação a dietas artificiais, além da grande aceitação da sua carne pelos consumidores de peixes (ABD-EL-HACK, 2022; SANTOS *et al.*, 2015; OFORI *et al.*, 2009; HAYASHI *et al.*, 2002; WATANABE *et al.*, 2002).

O farelo de soja é uma das principais fontes de proteína vegetal nas dietas para peixes, especialmente, para espécies onívoras. A soja é uma *Commodity* e seu preço é altamente influenciado pela demanda global do mercado. Em geral, sua exportação é mais vantajosa em alguns períodos do que a comercialização interna o que interfere diretamente nos custos de fabricação das rações (AZEVEDO *et al.*, 2017).

O custo das rações representa um dos principais desafios para a produção de peixes. Algumas *commodities*, como por exemplo, soja, milho e farinha de peixe tendem a encarecer o custo de fabricação das rações. Consequentemente, essa situação tem influenciando na busca por ingredientes alternativos e mais econômicos que possam ser usados na fabricação de rações para peixes (LIMA *et al.*, 2022).

Diante disso, é preciso considerar que o uso de ingredientes alternativos deve contribuir para proporcionar um resultado igual ou melhor do desempenho dos

animais em comparação com as rações comerciais. Assim, o fornecimento de rações balanceadas fabricadas com ingredientes alternativos (LIMA *et al.*, 2022), pode contribuir diretamente para a redução do custo final das dietas (LIMA *et al.*, 2023), e também para minimizar os impactos ambientais (MITHUNKUMAR *et al.*, 2023).

A farinha de folha de amoreira (FFA) vem sendo estudada como alimento volumoso para ruminantes (MIRANDA *et al.*, 2002), e também como possível ingrediente proteico em função do potencial dos seus componentes nutricionais (TANG *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2019; CHAN *et al.*, 2016). Esses fatos, vem sendo comprovados por meio de trabalhos executados para com algumas espécies de peixes, principalmente, as tilápias (DIAS *et al.*, 2022a; DIAS, 2019). Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da inclusão da FFA sobre os parâmetros de desempenho zootécnico e das alterações hematológicas em juvenis de tilápia do Nilo.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura e Ecotoxicologia Aquática da Embrapa Meio Ambiente, situada na cidade de Jaguariúna/SP. A duração do experimento foi de 60 dias e utilizou-se 240 juvenis de tilápia do Nilo, com peso médio de $10,71 \pm 7,92$ g, comprimento total (CT) médio de $7,75 \pm 1,5$ cm e comprimento padrão (CP) médio de $6,20 \pm 1,3$ cm.

As rações foram produzidas no LATAq do Campus Avançado de Jandaia do Sul/PR da UFPR. Todos os procedimentos adotados neste experimento seguiram os Princípios Éticos da Experimentação Animal e foram aprovados pela CEUA da EMBRAPA Meio Ambiente, conforme registro nº 002/2022 (anexos II) e pela CEUA da UFPR do Setor Palotina/PR, conforme protocolo nº 15/2022 (anexos I).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com controle e 3 tratamentos (8, 16 e 24%) e 4 repetições. O sistema experimental utilizado foi constituído por 4 linhas com 4 aquários cada uma delas. Para a distribuição aleatória dos tratamentos nos aquários foi realizado um sorteio para definição das linhas correspondentes aos tratamentos, respectivamente, linha 1: controle, linha 2: 8%, linha 3: 16% e linha 4: 24%, totalizando 16 aquários com capacidade de 300L.

Todos os aquários foram conectados a 4 módulos para filtração e aquecimento da água, formados por duas caixas de polietileno com capacidade de 1.000L(Figura 7). O aquecimento e controle da temperatura da água foi feito, respectivamente, por uma resistência elétrica de 3,000W e um termostato digital. A circulação da água dos 4 linhas de aquários foi feita com 4 bombas elétricas com vazão igual a 10.000 litros/hora.

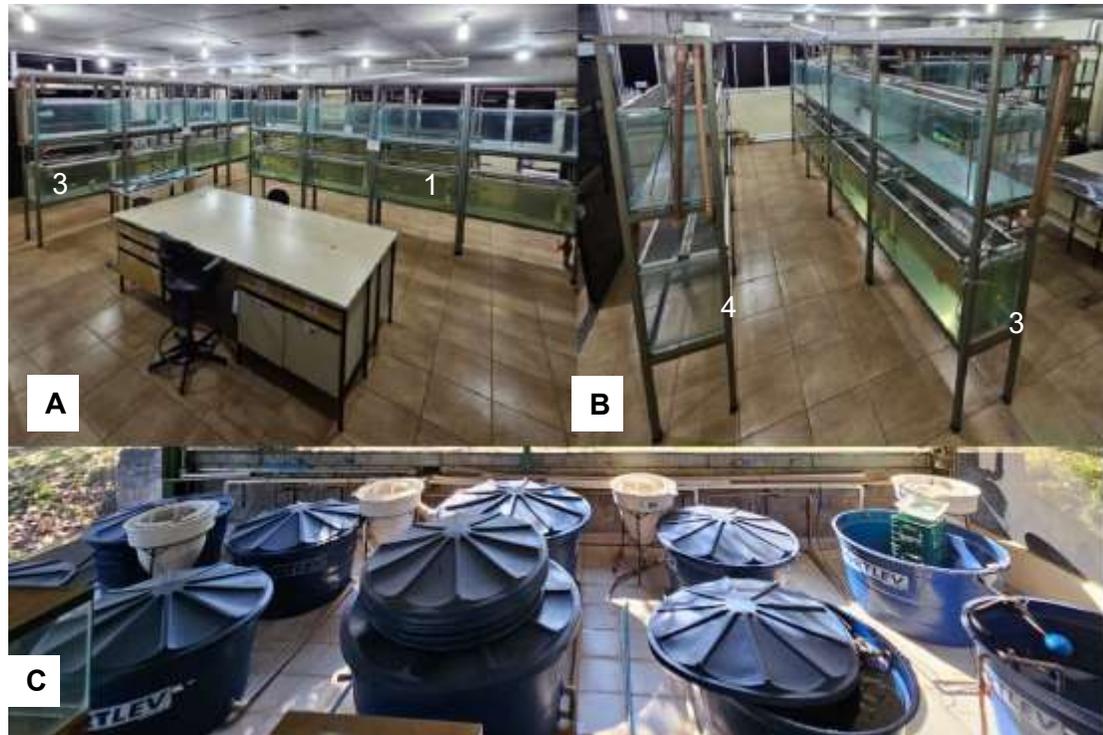


Figura 7. Estrutura física do sistema modular de aquários utilizados nos ensaios: **A)** linhas 1, 2 (atrás da linha 1), e linha 3 aquários da parte de baixo utilizados como “tanques de cultivo”, aquários da parte de cima usados para a recirculação de água do sistema; **B)** Linha 3 e 4; **C)** Sistema de caixas das linhas para filtração e recirculação da água do sistema (biofiltros), da esquerda para a direita correspondem as linhas 1, 2, 3 e 4, as caixas maiores do meio (capacidade de 1.000L), reservatórios do sistema. **Fonte:** Autoria própria: Dias, (2024).

No interior das caixas de polietileno de 1.000 litros foram montados os biofiltros compostos por três caixas de plástico empilhadas uma em cima da outra. Todas as caixas de plástico foram preenchidas com 50% dos seus respectivos volumes totais com 10% de argilas expandidas (figura 8) e 20% de cerâmicas porosas (figura 8). Na parte superior das caixas foi fixada uma bandeja de plástico com o fundo perfurado e recoberto com uma manta acrílica (Perlon) para filtração da água do sistema (Figura 8). A manta acrílica foi sendo substituída por uma nova conforme a necessidade. Essa substituição era sempre feita quando havia um

acúmulo excessivo de restos de ração e fezes, e também quando era observado que a água apresentava dificuldades para passar através da manta acrílica.

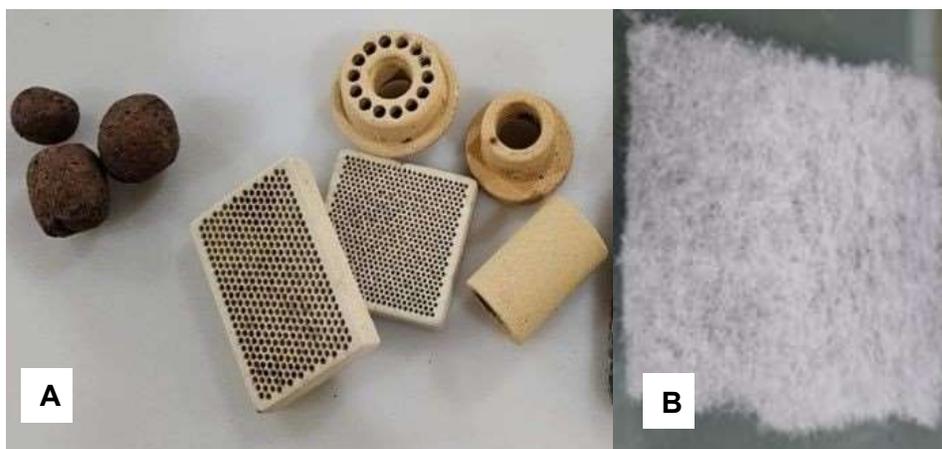


Figura 8. Material filtrante utilizado nas caixas de plástico empilhadas dentro do biofiltro: **A)** Argila expandida e vários tipos de cerâmicas porosas utilizadas nos biofiltros do sistema; **B)** manta acrílica (Perlon). **Fonte:** Autoria própria: Dias, (2024).

As rações foram elaboradas de acordo com as exigências nutricionais da espécie (NRC, 2011). A ração controle (0% de FFA) tendo como fonte de proteína principal o farelo de soja e milho. Para esse experimento foram utilizados um controle e 3 níveis crescentes de inclusão de FFA (8; 16 e 24%), os quais, tem-se conhecimento que até 20% não afetam o desempenho dos animais, segundo Dias *et al.*, (2022). As rações foram formuladas em parceria com o LATAq/UFPR com base nos nutrientes digestíveis, sendo isoprotéicas 30% (Proteína digestível) e isoenergéticas 3.000Kcal (Energia digestível), conforme recomendado pelo NRC (2011). Foram fabricadas com a base de farelo de soja, milho, óleo de soja, fosfato bicálcico (CaHPO_4), calcário calcítico, sal, pré-mistura vitamínica-mineral (PREMIX), conforme descrito na tabela 10.

Tabela 10. Composição química calculada e analisada das dietas experimentais com níveis crescentes da FFA para juvenis de tilápia do Nilo.

Ingredientes	Farinha de Folhas de amoreira – FFA			
	Controle	8%	16%	24%
Farelo de soja	59,72	56,93	54,26	51,60
Milho moído	36,63	29,60	21,93	14,24
FFA	0,00	8,00	16,00	24,00
Óleo de soja	0,00	2,07	4,33	6,60
Premix ¹	0,20	0,20	0,20	0,20
Fosfato bicálcico	2,24	2,40	2,56	2,75
Calcário	1,09	0,67	0,59	0,49
BHT	0,01	0,01	0,01	0,01
Sal comum	0,10	0,10	0,10	0,10
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Nutrientes %	Composição Calculadas			
Ácido linoleico	1,16	2,12	3,17	4,23
Amido	30,35	25,60	20,46	15,31
Cálcio	1,13	1,00	1,00	1,00
Energia Bruta ²	3911,48	4033,36	4152,25	4271,05
Energia Digestível ²	3000,00	3000,00	3000,00	3000,00
Fósforo total	0,82	0,82	0,82	0,82
Gordura	2,47	4,38	6,45	8,53
Proteína Digestível	30,00	30,00	30,00	30,00
Proteína Bruta	32,03	31,71	31,38	31,06
Matéria Seca	93,53	93,52	93,51	93,50
Cinzas	7,35	7,75	8,49	9,24
Lisina Total	1,77	1,75	1,72	1,70
Metionina Total	0,42	0,41	0,39	0,38
Composição analisada				
Matéria seca	96,74	97,16	95,79	96,34
Cinzas	6,58	6,90	7,44	8,11
Proteína Bruta	30	30	30	30
Extrato étereo	1,74	3,57	5,86	8,67

¹Premix: Suplemento vitamínico e mineral para peixes composto por Ácido fólico - 1200,00 mg/Kg; Ácido pantotêmico - 10,00g/Kg; B.H.T. - 8.000,00mg/Kg; Biotina - 200,00mg/Kg; Cobalto 80,00mg/Kg; Cobre - 3.500,00mg/Kg; Ferro - 20,00g/Kg; Inositol - 25,00g/Kg; Iodo - 160,00mg/Kg; Manganês - 10,00g/Kg; Niacina - 20,00g/Kg; Selênio - 100,00mg/Kg; Vitamina A - 2.400.000,00UL/Kg; Vitamina B1 - 4.000,00mg/Kg; Vitamina B12 - 8,000mcg/Kg; Vitamina B2 - 4.000,00mg/Kg; Vitamina B6 - 3.500,00mg/Kg; Vitamina D3 - 600.000,00UI/Kg; Vitamina E - 30.000,00 UI/Kg; Vitamina K3 - 3.000,00mg/Kg; Zinco - 24,00g/Kg. **Fonte:** PX PEIXES COCARI S/COL (Lote: 2023). ²Kcal/Kg.

Para a fabricação das rações os ingredientes foram pesados e misturados, e após a homogeneização adicionou-se cerca de 4.200 ml de água para 8kg a temperatura de 55°C. Posteriormente as rações foram peneiradas 2 vezes para obtenção de uma melhor homogeneização. Após esse procedimento, as misturas foram peletizadas em uma peletizadora de massa e moedor (marca gastromaq Emc20/10 Inox) com a capacidade de 20kg/h. os grânulos da ração foram fracionados em um saco plástico e chacoalhados até apresentarem diâmetros médios e pequenos, até estarem adequados ao tamanho da boca dos animais.

Após o processo de peletização as rações foram secas em estufa de ventilação forçada por 24 h, e em seguida embaladas em sacos plásticos escuros e armazenadas sob refrigeração até a sua utilização, conforme a metodologia proposta por Dias (2019) e Meurer *et al.*, (2003). As rações foram analisadas quanto aos valores de proteína bruta, gordura, matéria seca e cinzas (Tabela 10), de acordo com a metodologia da AOAC, (2019) no laboratório de Nutrição do LATAq/UFPR.

O manejo adotado para distribuição dos peixes nos aquários foi por lote de 5 em 5 animais para evitar estresse e agilizar o trabalho, durante o período da manhã. Após serem distribuídos aleatoriamente, coletou-se 48 peixes, correspondendo a uma porção de 20% do número total de animais utilizados no experimento. Para realização da biometria foram feitas a pesagem e as medições de CT e CP dos peixes, conforme descrito por Pereira (2012) e Oliveira *et al.*, (2007). Vale destacar, algumas metodologias indicam uma porção de 10% do número total de animais.

O arraçoamento foi baseado no peso vivo dos animais na proporção de 10 a 12%, e foi realizado três vezes ao dia, às 9h, 12h e 16h. A cada dois dias foram feitas sifonagem com auxílio de uma mangueira flexível de borracha transparente para retirada de restos de ração e excretas de fezes acumuladas no fundo dos aquários.

Os parâmetros da qualidade da água medidos durante o experimento incluíram a temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade. Esses parâmetros

foram monitorados diariamente com o auxílio de uma sonda multiparâmetros digital (marca Horiba), modelo U-52. Adicionalmente, as concentrações de amônia (NH_3), nitrito (NO_2^-) e dureza total foram avaliadas a cada três dias, utilizando kits colorimétricos Labcon Teste (Amônia Tóxica Água Doce; Nitrito NO_2^- e Dureza Total GH). Para a análise de nitrato (NO_3^-), foi utilizado o kit colorimétrico SERA Für Naturgerechte Aquarien (NO_3^- Test). Essa frequência de análise permitiu um acompanhamento detalhado para manter um monitoramento regular da qualidade da água longo do experimento.

No início do período experimental, 30% dos peixes foram anestesiados com eugenol (extrato de cravo) na proporção de 135 mg/L, pesados em balança digital e medidos com auxílio de um paquímetro manual conforme a metodologia de biometria de Pereira (2012) e Oliveira *et al.*, (2007). Ao final do período experimental os peixes foram mantidos em jejum por 24h e, posteriormente, foram efetuadas as medidas individuais de cada peixe de acordo com os distintos tratamentos distribuídos nas unidades experimentais.

As seguintes variáveis foram determinadas para a avaliação dos parâmetros zootécnicos: Biomassa (BM); Ganho de Peso (GP) e sobrevivência (S), através das fórmulas (BEZERRA & MELO, 2014).

$$\text{BM} = \text{peso inicial} \times \text{n}^\circ \text{ de animais} = \text{g}$$

$$\text{GP} = \text{peso final} - \text{peso inicial} = \text{g}$$

$$S = \frac{(\text{n}^\circ \text{ final de animais} \times 100)}{\text{n}^\circ \text{ inicial de animais}} = \%$$

O Ganho de Peso Diário (GPD); Conversão Alimentar Aparente (CAA); Taxa de Eficiência Proteica (TEP), (SÁ & FRACALLOSSI, 2002).

$$\text{GPD} = \frac{(\text{BM final} - \text{BM inicial})}{\frac{\text{n}^\circ \text{ de animais}}{\text{n}^\circ \text{ dias experimento}}} = \text{g/animal/dia}$$

$$CAA = \frac{\text{Quantidade de ração (g)}}{\text{ganho de peso (g)}}$$

$$TEP = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{proteína consumida (g)}}$$

Para os cálculos de Ganho de Peso Relativo (GPR); a Taxa de Crescimento Específico (TCE); a Eficiência Alimentar (EA); o Consumo Diário de Ração (CDR); e o Consumo de Proteína Bruta (CPB), (Santos *et al.*, 2010).

$$GPR = 100 \times \frac{(\text{peso final} - \text{peso inicial}) (\text{g})}{\text{peso inicial (g)}} = \%$$

$$TCE = 100 \times \frac{(\text{peso final} - \text{peso inicial}) (\text{g})}{\text{dias de experimento}} = \%$$

$$EA = 100 \times \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{Quantidade de ração (g)}} = \%$$

$$CPB = \frac{(\text{peso final} - \text{peso inicial}) (\text{g})}{\text{peso inicial (g)}}$$

Para os cálculos de rendimentos (R) de carcaça (apenas remoção das vísceras) e filé foram executados por meio da fórmula indicada por (SILVA *et al.*, 2015).

$$R = \frac{(\text{peso da } \quad \quad \quad (\text{g}) \times 100)}{\text{peso do animal inteiro (g)}} = \%$$

Para a avaliação da composição centesimal corporal foram utilizados três peixes de cada aquário coletados de maneira aleatória, os quais, foram armazenados inteiros em freezer no laboratório. Os demais peixes foram utilizados para mensuração do índice viscerossomático (IVS), o índice de gordura visceral

(IGV) e o índice hepatossomático (IHS) e, posteriormente, filetados para a avaliação da composição centesimal.

Para calcular os índices foram utilizadas as seguintes fórmulas (MORAES, 2018).

$$IVS = 100 \times \frac{\text{peso das víceras (g)}}{\text{peso final do animal (g)}} = \%$$

$$IGV = 100 \times \frac{\text{peso da gordura visceral (g)}}{\text{peso final do animal (g)}} = \%$$

$$IHS = 100 \times \frac{\text{peso do fígado (g)}}{\text{peso final do animal (g)}} = \%$$

As amostras de peixes inteiros e filés foram moídas em processador até obter uma mistura homogênea e, posteriormente, secas em estufa de recirculação forçada a 55°C em um período de 72h. Em seguida, foram realizadas as análises de composição bromatológica para a determinação de proteína bruta (PB) pelo método de Kjeldahl; extrato etéreo (EE) pelo método de Soxhlet; matéria seca (MS) pelo método de peso constante e cinzas, no laboratório de Nutrição do LATAq/UFPR, seguindo a metodologia indicada por AOAC (2019).

As coletas sanguíneas foram realizadas por punção do vaso caudal, com auxílio de seringas de 3mL e agulhas hipodérmicas 0,80x25 mm contendo EDTA (3%). Para análises hematológicas e bioquímicas aproveitou-se a coleta de 12 indivíduos de cada tratamento experimental, ou seja, foram utilizados três peixes de cada aquário.

A partir das amostras sanguíneas foram determinados os seguintes parâmetros: hematócrito (Htc) utilizando o método do microhematócrito (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013; GOLDENFARB *et al.*, 1971), e o teor de proteínas plasmáticas totais (PPT), utilizando o plasma do mesmo capilar do microhematócrito por meio da quebra do capilar, e inserindo o plasma em refratômetro portátil, conforme proposto na metodologia de Satake *et al.*, (2009).

A dosagem da hemoglobina (Hb) foi realizada utilizando o método de reação de cor com o Kit Hemoglobina (marca Labutes, lote: 202101), expresso em g/dL^{-1} seguido do uso de um padrão para hemoglobina (marca Labutes, lote: 202202). As leituras foram feitas em um espectrofotômetro a 540 nm, de acordo com as instruções do fabricante do kit. A contagem de eritrócitos totais (RBC), foi feita com uma câmara de Neubauer após diluição em solução de formol-citrato expressa em ($\times 10^6/\mu\text{L}^{-1}$); os leucócitos totais (células μL^{-1}) por meio de esfregaço sanguíneos através da contagem total de células; o volume corpuscular médio (VCM); e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), através de cálculos, os quais, foram feitos de acordo com a metodologia descrita por Ranzani-Paiva *et al.*, (2013).

$$\text{VCM} = \frac{\text{Htc} \times 10}{\text{n}^{\circ} \text{ de RBC} (\times 10^6)} = \text{fL}$$

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Conc de Hb} \times 100}{\text{Htc}} = \text{g dL}^{-1}$$

A concentração de glicose (mg/dL^{-1}) foi determinada por aparelho medidor de glicose portátil (marca ACCU-CHEK Perfoma), utilizando-se uma gota de sangue em fitas de glicemia para leitura. Para a determinação da concentração colesterol (mg/dL^{-1}) foi utilizado um kit comercial padrão COLESTEROL LIQUIFORM (marca Labutes, lote: 202105) acompanhado de leitura em espectrofotômetro a 500 nm, conforme descrito nas instruções do kit. Para Triglicerídeos (mg/dL^{-1}) foi utilizado um kit comercial padrão TRIGLICÉRIDES GOD-PAP Liquid Stable (marca Laborlab, lote: 2001355790) seguido de leitura em espectrofotômetro a 505 nm, de acordo com as especificações do kit. Para Cortisol (ng/mL) foi utilizado um kit comercial ELISA (marca ELISA THAT perform/DRG Products, lote: 43K012), e posterior leitura em espectrofotômetro a 450 nm, conforme as instruções do fabricante.

Para a realização das análises estatísticas utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso, sendo que, para cada parâmetro testado, foi avaliada a normalidade e homocedasticidade, utilizando os testes de Shapiro-wilk e Bartlett, respectivamente. Para identificação e remoção de outliers, foi usado o resíduo

estudentizado internalizado com o limite de 2 desvios padrão, sendo que as unidades experimentais foram removidas de forma unitária para aquelas que excediam o limite previsto de ± 2 desvios padrões.

A análise de variância de cada parâmetro foi testada pelo modelo estatístico de Fisher com probabilidade de $p < 0,05$, e para aquelas significativas, foi performedo um teste de comparação de média (Tukey) com a mesma probabilidade de significância. Paralelo ao teste de média, também foram testados os comportamentos dos dados na forma de uma regressão, sendo testado o comportamento linear e quadrático, ambos com graus de significância de 5%.

Para aqueles parâmetros contendo regressão estatisticamente significativa, foram apresentados juntamente ao valor de P real, a equação que representa o modelo obtido e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2). Todas as análises estatísticas descritas acima foram realizadas utilizando o software R Studio 4.3.1.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os seguintes parâmetros físico-químicos de qualidade de água foram avaliados durante o experimento realizado com juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) submetidos a dietas crescentes com inclusão de FFA temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade. O monitoramento e avaliação desses parâmetros demonstrou que houve uma variação pequena dos valores medidos ao longo do período experimental entre o controle e diferentes tratamentos (Figura 9), entretanto, estas variações não apresentaram diferenças significativas entre as linhas do sistema experimental.

A amônia (NH_3), nitrito (NO_2^-), nitrato (N O_3^-) e dureza total (CaCO_3) apresentaram, respectivamente, os seguintes valores médios gerais, $0,04 \pm 0,01 \text{ mg/L}^{-1}$, $1,0 \pm 0,6 \text{ mg/L}^{-1}$, $21 \pm 10,6 \text{ mg/L}^{-1}$ e $50 \text{ mg/L}^{-1} \text{ CaCO}_3$, para o controle e os tratamentos, não apresentando variações e diferenças significativas, corroborando com os achados descritos por Sá (2012) e Kubitzka (2011) para a piscicultura. E, se mantendo dentro dos padrões adequados para cultivo de peixes (ANDRADE *et al.*, 2017; BOYD *et al.*, 1998).

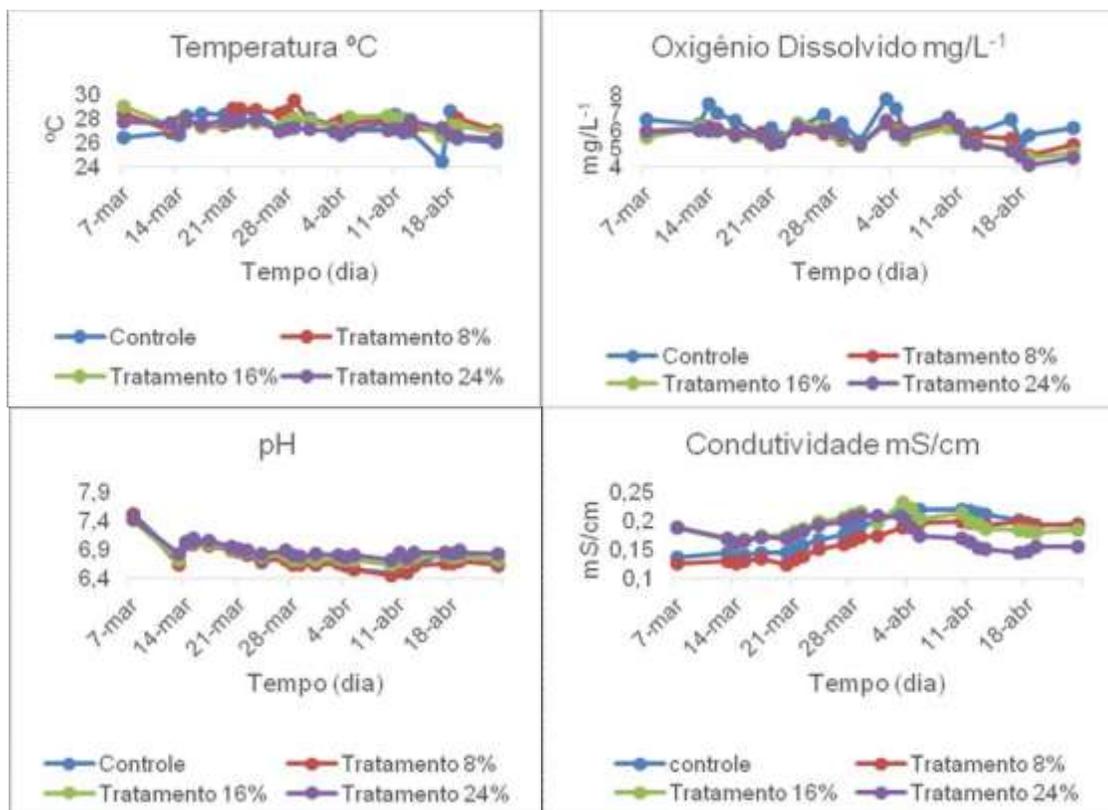


Figura 9. Variação da temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade durante o período experimental.

Os valores medidos para a temperatura da água dos aquários e as concentrações encontradas para os demais parâmetros físico-químicos monitorados durante o período experimental, foram similares aos encontrados na literatura, os quais, garantem um ambiente adequado e uma zona de conforto propícia para o cultivo e bem estar da maioria das espécies de peixes tropicais desenvolvimento (LIMA *et al.*, 2022; SOUSA *et al.*, 2021; KUBITZA 2011). Além disso, os valores encontrados estão apropriados ao serem comparados com os padrões de qualidade de água estabelecidos para sistemas de cultivo de peixes em alta densidade, como nos sistemas semi-intensivos e intensivos (SÁ, 2012).

Os valores médios dos parâmetros zootécnicos, tais como, peso final, biomassa, ganho de peso, ganho de peso diário, ganho de peso relativo, conversão alimentar presente, rendimento de carcaça, rendimento de filé, taxa de crescimento específico, taxa de eficiência proteica, eficiência alimentar, consumo diário de ração, consumo de proteína bruta e sobrevivência dos juvenis de tilápia do Nilo, submetidos

as dietas contendo níveis crescentes de inclusão de FFA, estão apresentados na Tabela 11.

Esses parâmetros não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre o controle e os tratamentos com a inclusão de FFA, como também, não houve mortalidade durante o ensaio, apresentando sobrevivência de 100% dos animais.

Tabela 11. Parâmetros zootécnicos de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas crescentes, contendo FFA.

Parâmetros	Tratamentos com a inclusão da FFA				EPM ¹⁴	Pvalor
	Controle	8%	16%	24%		
Peso inicial	10,71 ± 7,92g	10,71 ± 7,92g	10,71 ± 7,92g	10,71 ± 7,92g		
Peso Final	68,9 ± 4,72g	62,2 ± 4,72g	66,9 ± 4,72g	67,7 ± 4,72g	1,52	0,453
BM ¹	1,10Kg	1,00Kg	1,07Kg	1,09Kg	0,02	0,518
GP ²	1,10g	0,98g	1,05g	1,07g	0,03	0,441
GPD ³	0,02g/peixe/dia	0,02g/peixe/dia	0,02g/peixe/dia	0,02g/peixe/dia	0,002	0,426
GPR ⁴	0,54%	0,51%	0,53%	0,53%	0,01	0,737
CAA ⁵	2,22	2,52	2,37	2,27	0,06	0,334
RC ⁶	82,9%	80,5%	79,4%	79,5%	0,97	0,578
RF ⁷	26,1%	23,0%	25,1%	24,8%	0,11	0,228
TCE ⁸	0,90%	0,75%	0,75%	0,75%	0,02	0,523
TEP ⁹	0,04	0,03	0,04	0,04	0,003	0,556
EA ¹⁰	0,06%	0,06%	0,06%	0,06%	0,002	0,627
CDR ¹¹	2,72	2,99	2,82	2,79	0,06	0,489
CPB ¹²	8,97	8,86	8,97	8,93	0,09	0,981
S ¹³	100%	100%	100%	100%		

¹BM: Biomassa; ²GP: Ganho de Peso; ³GPD: ⁴Ganho de Peso Diário; ⁴GPR: Ganho de Peso Relativo; ⁵CAA Conversão Alimentar Aparente; ⁶RC: Rendimento de carcaça; ⁷RF: Rendimento de Filé; ⁸TCE: Taxa de Crescimento Específico; ⁹TEP: Taxa de Eficiência Proteica; ¹⁰EA: Eficiência Alimentar; ¹¹CDR: Consumo Diário de Ração; ¹²CPB: Consumo de Proteína Bruta e ¹³S: Sobrevivência. ¹⁴EPM: Erro Padrão da Média.

Apesar de não haver nenhuma diferença significativa (Tabela 11) no uso da FFA referente aos parâmetros de desempenho dos animais, também não apresentou diferença, ou seja, podendo ser utilizadas na alimentação sem afetar negativamente o crescimento das tilápias do Nilo. Esses resultados potencializam seu uso como um ingrediente para inclusão nas rações de tilápia, visto que a literatura relata estudos com potencial para substituição da farinha de peixes nas

dietas (TANG *et al.*, 2021; MONDAL *et al.*, 2015; SHEIKHLAR *et al.*, 2014; KAVIRAJ *et al.*, 2013).

A busca por alimentos alternativos visa melhorar a eficiência, além de minimizar os custos gerados na fabricação de dietas balanceadas e adequadas as exigências nutricionais das espécies de peixes utilizadas na piscicultura (SANTOS *et al.*, 2015). Segundo Meurer *et al.*, (2000) a busca por ingredientes alternativos fornece subsídios para a produção de dietas mais baratas, mas que permaneçam com a mesma qualidade nutricional, assegurando um desempenho equivalente as dietas fórmulas com ingredientes convencionais.

A inclusão de dois níveis de FFA e FFA fermentada (2,22% e 4,44%) como suplemento de dietas para juvenis de dourada de Wuchang (*Megalobrama amblycephala*) demonstrou um efeito no desempenho do crescimento dos animais, entretanto, a FFA fermentada com 2,22% aumentou GP e TCE, e também a sobrevivência (JIANG *et al.*, 2022).

Em estudos com peixes carnívoros a FFA tem demonstrando resultados promissores. Em dietas associadas com farinha de peixe com 4%, demonstrou melhora no crescimento de peixes achigã (*Micropterus salmoides*), e a FFA com a mesma porcentagem, associada a rações com 75% de semente de algodão, apresentou melhora no crescimento e na EA. Além de diminuir a inflamação intestinal causada pela semente de algodão, proporcionando uma reversão sobre os efeitos negativos gerados na barreira intestinal, (YANG *et al.*, 2024).

O uso de 50g/kg de FFA em dietas para peixes achigã contribuiu para um potencial aumento na TCE e TEP, entretanto, CAA e a ingestão diária média não apresentaram diferenças significativas. Todavia, quando associada a dietas com alto teor de amido a capacidade de GP e crescimento (XV *et al.*, 2021), foi semelhante a outros relatos com outras espécies de peixes (YANG *et al.*, 2024; XU *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2014; MONDAL *et al.*, 2012).

Em uma análise comparativa entre a inclusão de FFA e do extrato, com o peixe achigã, foi verificado qual a melhor forma para ser incluído em dietas quando comparado ao GP e TCE. O tratamento com a FFA foi melhor que o extrato (WEI *et al.*, 2023). Porém, quando comparado a estudos utilizando 8% de folhas de amoreiras fermentadas, foi relatado efeito inibidor no crescimento em ratos (XU *et al.*, 2017), como também, foi relatado para a tilápia do Nilo (CHEN *et al.*, 2015).

Em investigações com 10% de extrato da folha de amoreira em comparação com 10% FFA em dietas para tilápia do Nilo, demonstrou-se que o extrato foi melhor, pois apresentou melhoria no desempenho de crescimento de tilápias do Nilo com relação aos seguintes parâmetros: Peso Final, GP, TCE, TEP, EA e fator de condição, além da qualidade da carne, como também, houve um aumento significativo nas atividade antioxidantes e de fosfatase, sendo assim, adequados para uso como aditivos na proporção de 10% de extrato para farinha nas dietas para tilápias (TANG *et al.*, 2021).

Em razão de dois componentes bioativos principais, os polissacarídeos e os polifenóis na folha de amoreira, expressam maiores teores no extrato, e no método aquoso maior teor de polissacarídeos, e no etanólico os de polifenóis (TANG *et al.*, 2021). Os polissacarídeos exercem múltiplas atividades biológicas, entre elas, antidiabética, antitumorais, anti-inflamatórias, imunoestimulantes, antioxidantes, entre outras (HE *et al.*, 2018). Os polifenóis demonstram capacidades de imunomodular o sistema imunológico em condições de inflamação crônica, além de, terem ação antioxidante e anti-inflamatória (OLIVEIRO *et al.*, 2018). Esses compostos são usados frequentemente como indicador químico das propriedades antioxidantes de ervas (GANZON *et al.*, 2018).

A utilização do extrato da FFA apresenta benefícios melhores do que a farinha, além disso, menores fatores antinutricionais (CHEN *et al.*, 2023; TANG *et al.*, 2021; HUANG *et al.*, 2020). Foi relatado por CHEN *et al.*, (2023) que pequenas concentrações crescentes de FFA (1,0 a 7,0 g/Kg) em dietas para Kinguio (*Carassius auratus*) apresentaram sobrevivência similar à do presente estudo, como sobrevivência de 100% dos peixes. Estudos com robalo asiático (*Lateolabrax maculatus*) utilizando extrato de 9g/Kg de FFA nas dietas, obtiveram um aumento significativo no GP, TCE, no CDR e uma sobrevivência de 100%, porém, não houve um efeito significativo no fator de condição, todavia foi notada uma tendência crescente neste parâmetro (ZHOU *et al.*, 2023a). Com a carpa-prussiana prateada (*Carassius auratus gibelio*) o extrato de FFA foi avaliado em níveis graduais (15, 30, 60, 90 e 120 g/Kg) na dieta para avaliar parâmetros zootécnicos, tais como, peso final, GP, TCE, EA e ingestão de rações. Esses parâmetros apresentaram um aumento e foi recomendado o uso de 46,9 Kg (LI *et al.*, 2020).

Não há evidências para explicação como a FFA funciona no metabolismo de peixes para aumentar a taxa de crescimento, além do seu efeito depender da quantidade da folha e quanto a espécie alvo (LI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2012). Estudos de XV *et al.*, (2021), demonstraram que o efeito da FFA no crescimento está relacionado à formulação básica das dietas utilizadas.

A farinha de folhas de moringa (*Moringa oleífera*) e leucena (*Leucaena leucocephala*) substituindo 30% de farelo de soja em dietas para tilápia do Nilo, apresentaram um GP (0,54g e 0,52g) inferior ao obtido neste estudo (Tabela 11) para a FFA, entretanto, os valores para CAA foram superiores (1,80 e 1,86), demonstrando resultados melhores do que a FFA (KASIGA *et al.*, 2014). Entretanto, no estudo realizado por Hussein (2017), a farinha de folha de moringa não apresentou diferença significativa no desempenho de crescimento de tilápia do Nilo. Segundo MAHMOUD *et al.*, (2022) utilizando o extrato de 1 e 2g/Kg apresentou valores de GP semelhantes ao encontro para a FFA, porém, o TCE e a CAA foram superiores, e a ingestão de ração exibiu valores semelhantes aos obtidos para TCE com o uso FFA.

Ao comparar os resultados obtidos (tabela 11) com a inclusão de 5% da farinha de folha de mandioca desidratada para tilápia do Nilo em estudos realizados por SANTOS *et al.*, (2015), o GP foi superior e equivalente ao dobro quando comparado a FFA (Tabela 11), entretanto, com o aumento dos níveis de inclusão da farinha de folha de mandioca desidratada obteve uma CAA semelhante a FFA.

ZENG *et al.*, (2021) avaliaram quatro tipos de farinha de folhagens, quais sejam, a moringa (*M. oleífera*); amora branca (*Folium mori*); amoreira-do-papel (*Broussonetia papyrifera*) e cadamba (*Neolamarckia cadamba*) na inclusão de 30% em dietas para tilápia do Nilo. Os quatro tipos de folhas apresentaram efeito significativo benéfico no crescimento, na utilização da dieta e, conseqüentemente, na digestibilidade, coincidindo com resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho (tabela 11). Para CAA, entretanto, ZENG *et al.*, (2021) sugerem que as folhas de moringa, amora branca e amoreira-do-papel podem ser usadas como novos ingredientes alternativos nas dietas de tilápias sem influenciar negativamente o crescimento e microbiota intestinal desta espécie, enquanto, a folha de cadamba influenciou negativamente a composição da microbiota desse peixe e, assim, não pode ser recomendada para uso em sua dieta.

A CAA e EA do presente trabalho (Tabela 11) com a FFA foi maior em relação a farinha de folha de inhame (*Colocasia esculenta*) submetida a inclusão de 20% na dieta para tilápia do Nilo, o que demonstra uma possível necessidade de suplementação de aminoácidos nas dietas, principalmente, teores de histidina, metionina e lisina, o que pode ter influenciado na absorção dos nutrientes (EL-TAWIL *et al.*, 2020).

SAEPHOOM *et al.*, (2021) também sugeriram a inclusão de 0,1% de enzimas digestivas exógenas nas dietas com ingredientes à base de folhas de plantas para realizar a quebra de fibras, conseqüentemente, melhorando a utilização dos nutrientes e o desempenho dos animais (EL-TAWIL *et al.*, 2020). A suplementação com estas enzimas reduz a excreção de nutrientes a base de folhas, influenciando significativamente na melhora da digestibilidade (CASTILLO & GATLIN (2015). Isso porque, a planta contém uma certa quantidade elevadas de resíduos de fibras dietéticas, o que afeta na nutrição dos peixes em decorrência dos vários efeitos antinutricionais (DALSGAARD *et al.*, 2016).

Os valores de rendimento de carcaça com a FFA foram adequados, porque a carcaça representa 62,6% em média do peso dos peixes (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994). Portanto, avaliar o rendimento das carcaças é crucial para aprimorar a eficiência dos sistemas de cultivo, entretanto, a eficácia dessa avaliação é maior quando se consideram outros parâmetros, ao mesmo tempo, para caracterizar e determinar o crescimento e desenvolvimento dos animais (SILVA *et al.*, 2009). Todavia, há uma divergência quanto a esse rendimento com relação à influência no crescimento, visto que o tamanho, sexo e a linhagem podem ser elementos importantes para a variação do rendimento de carcaça (LUSTOSA-NETO *et al.*, 2016). Nesse sentido, manejo a nível de mecanização, ou o método de filetagem e a habilidade do filetador são fundamentais para a obtenção de melhores resultados (RASMUSSEN & OSTENFELD, 2000).

De acordo com MORANDI & CAETANO-FILHO (2015), ao realizar a filetagem manualmente, é possível obter um rendimento de até 38% de filés sem pele, enquanto, ao usar uma filetadora mecânica, o rendimento cai para 29% a 31%. O presente trabalho apresentou rendimentos inferiores aos da média industrial, podendo ser explicado porque o manejo de filetagem e a habilidade do filetador acabaram comprometendo este rendimento.

Os valores médios dos índices corporais dos juvenis de tilápia do Nilo submetidos a níveis crescentes de inclusão de FFA nas dietas estão apresentados na tabela 12, o quais, não apresentaram diferenças significativas entre o controle e os tratamentos com a inclusão de FFA.

Tabela 12. Parâmetros dos índices corporais de juvenis de tilápia do Nilo submetidos a dietas crescentes com inclusão de FFA.

Índices	Tratamentos com a inclusão da FFA				EPM ⁴	Pvalor
	Controle	8%	16%	24%		
IVS ¹	17,0%	19,4%	20,6%	20,5%	0,13	0,578
IHS ²	1,30%	1,27%	1,87%	1,67%	0,11	0,125
IGV ³	1,62%	1,57%	1,82%	1,65%	0,13	0,929

¹IVS: Índice Viscerosomático; ²IHS: Índice Hepatosomático e ³IGV: Índice de Gordura Visceral. ⁴EPM: Erro Padrão da Média.

Para peixes achigã (*M. salmoides*), a suplementação na dieta com 50 g/Kg apresentou IHS maior em comparação com as dietas isentas de FFA, além de melhoras no conteúdo do fígado (XV *et al.*, 2021). Utilizando 2,22% e 4,44% de FFA e FFA fermentada, respectivamente, para (*M. amblycephala*) o IHS foi maior nos peixes que receberam dietas com 2,22% de FFA fermentada quando comparados aos que receberam somente FFA (JIANG *et al.*, 2022).

Em pesquisas realizadas para comparação entre a farinha e o extrato da folha de amoreira com o *M. salmoides*, ambos os ingredientes incorporados nas dietas diminuiu o IHS, com valores semelhantes ao presente trabalho (Tabela 12) obtidos com os juvenis de tilápia do Nilo (WEI *et al.*, 2023). Esses resultados fundamentam a hipótese que a folha de amoreira exerce atividades inibitórias sobre o acúmulo de triglicérides no fígado dos peixes, assim como, suprimem o anabolismo e lipídeos, conseqüentemente, realizam a oxidação de ácidos graxos, resultando na redução da síntese de triglicérides no fígado (LI *et al.*, 2018; TSUDUKI *et al.*, 2013).

Em estudos verificando os efeitos do extrato da FFA para robalo asiático (*L. maculatus*) houve benefícios nas funções hepáticas quando se utilizou 9g/Kg nas dietas, obtendo uma melhora na digestão dos ingredientes da dieta. Conseqüentemente, o metabolismo dos mesmos, além de um aumento nas atividades de enzimas digestivas, metabólicas e antioxidantes do fígado,

proporcionaram melhorias na imunidade do fígado, além de regulação de níveis de expressão de genes do processo metabólico deste órgão (ZHOU *et al.*, 2023b).

A utilização de farinha de folhas de leguminosas como guandu e amendoim apresentaram um IHS semelhante ao presente estudo (Tabela 12) com valores respectivos 1,71% e 1,82%, (CHAKRABARTY & BAG, 2013). No entanto, a farinha da folha de mandioca desidratada ao aumentar seus níveis de inclusão (5%, 10% e 15%), apresentou um aumento no IHS das tilápias o Nilo, devido a presença de compostos antinutricionais em sua composição (SANTOS *et al.*, 2015), ao contrário da FFA que não apresentou compostos antinutricionais.

Segundo ZENG *et al.*, (2021) utilizando quatro tipos de farinha de folhagens lenhosas (*M. oleífera* - moringa; *F. mori* – amora branca; *B. Papyrifera* – amoreira-do-papel e *N. Cadamba* - cadamba) na inclusão de 30% em dietas para tilápia do Nilo, as farinhas de moringa e cadamba apresentaram, valores similares aos encontrados no presente estudo (Tabela 12) para controle, tratamento com 8% e 24% de FFA, reforçando a hipótese de LI *et al.*, 2018; TSUDUKI *et al.*, (2013) sobre a capacidade de inibir o acúmulo de triglicerídeos, corroborando, portanto, a síntese de lipídeos no fígado e promovendo a oxidação de ácidos graxos.

A razão para aumento no IHS é devido à falta de ácido graxo essencial (DU *et al.*, 2005). Com a ingestão insuficiente de gordura os peixes apresentam um crescimento metabólico desordenado, enquanto, a ingestão excessiva de gordura, resulta em menor resistência a doenças (TOCHER *et al.*, 2002). A tilápia do Nilo necessita de 5% de lipídeos em sua dieta (CHOU & SHIAU, 1996), observou-se variação gradual de aumento na composição de lipídeos nas dietas (Tabela 10) desses peixes.

Os valores de IVS e IGV podem ser influenciados por fontes e suplementes de lipídeos na dieta. A digestibilidade quando desequilibrada em termos de ácidos graxos leva à uma deposição de lipídeos (BABALOLA *et al.*, 2011), isso pode causar o acúmulo anormal de triglicerídeos (HUNT *et al.*, 2018), o qual não foi observado nos valores determinados do presente trabalho. A FFA influenciou na diminuição do acúmulo de gordura nos índices viscerossomáticos, hepatossomáticos e viscerais.

Os valores médios de composição centesimal química corporal, carcaça e filé dos juvenis de tilápia do Nilo alimentados com níveis crescentes de inclusão de FFA estão apresentados na tabela 13, a qual, mostra que o MS, PB, EE e cinzas

não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao controle com os tratamentos usando a inclusão de FFA, bem como, para a composição centesimal corporal, carcaça e rendimento do filé.

Tabela 13. Composição química centesimal corporal, carcaça e filé dos juvenis de tilápia do Nilo submetidos as dietas crescentes com a FFA.

Parâmetros	Tratamentos com a inclusão de FFA				EPM ⁴	Pvalor
	Controle	8%	16%	24%		
Peixe inteiro						
MS ¹	26,3%	26,6%	25,6%	25,1%	0,51	0,781
Cinzas	8,38%	8,40%	8,40%	7,83%	0,16	0,580
PB ²	4,82%	5,33%	5,36%	5,49%	0,23	0,789
EE ³	15,7%	16,0%	13,9%	16,2%	0,50	0,391
Carcaça						
MS ¹	13,9%	13,7%	13,2%	13,6%	0,14	0,291
Cinzas	1,65%	1,66%	1,68%	1,67%	0,01	0,699
PB ²	5,69%	6,45%	5,98%	6,43%	0,22	0,583
EE ³	6,37%	6,42%	5,96%	6,05%	0,18	0,790
Filé						
MS ¹	21,9%	21,5%	23,9%	22,4%	0,50	0,379
Cinzas	8,29%	8,11%	8,26%	8,28%	0,05	0,988
PB ²	8,57%	11,2%	10,3%	10,9%	0,87	0,746
EE ³	6,70%	7,16%	7,11%	6,71%	0,25	0,885

¹MS: Matéria Seca; ²PB: Proteína Bruta; ³EE: Extrato Etéreo. ⁴EPM: Erro Padrão da Média.

Estudos com *C. auratus gibelio* alimentados com níveis crescentes de extrato da FFA (15,30,60, 90 e 120 g/Kg não apresentaram diferenças significativas na composição centesimal de carcaça para MS, PB, EE e cinzas entre o controle e os níveis e tais níveis de FFA. Entretanto, comparando com os valores de EE e cinzas do presente estudo (tabela 13) com tilápia do Nilo esses foram superiores, e menores para PB e MS na carcaça (LI *et al.*, 2020).

Os valores de composição centesimal para filé (tabela 13) foram semelhantes em estudos de CHAKRABARTY & BAG (2013) para MS (24,89%) para farinha de folha da leguminoso guandu, e inferiores aos encontrados para a farinha de folha de amendoim de 27,23% e PB para ambas farinhas, respectivamente, (13,39% e 14,74%). Para EE foram superiores para ambas as farinhas (5,53% e

6,56%) e para cinzas (5,35% e 5,07%), demonstrando uma concentração maior de lipídeos na musculatura da tilápia do Nilo, quando utilizados na inclusão de FFA nas dietas.

Os valores médios para composição de minerais da carcaça e filé centesimal de juvenis de tilápia do Nilo, submetidos às dietas com níveis de inclusão crescentes de FFA estão apresentados na tabela 14. A composição mineral de Ca, Mg, K, Fe, Mn, e Zn na carcaça e no filé não apresentaram diferenças significativas dentre os minerais avaliados no presente trabalho para juvenis de tilápia do Nilo.

Tabela 14. Composição dos minerais na carcaça e filé dos juvenis de tilápia do Nilo submetidos as dietas crescentes com FFA.

Parâmetros	Tratamentos com a inclusão				EPM ⁷	Pvalor
	de FFA					
	Controle	8%	16%	24%		
Carcaça						
Ca ¹ mg/Kg	43911	40511	40718	42705	1627	0,886
Mg ² mg/Kg	1132	1146	1139	1123	24,9	0,992
K ³ mg/Kg	5407	5795	5631	5756	72,3	0,231
Fe ⁴ mg/Kg	32,5	32,6	34,1	35,7	0,87	0,555
Mn ⁵ mg/Kg	2,95	2,77	2,48	3,03	0,15	0,636
Zn ⁶ mg/Kg	51,5	48,8	47,1	48,7	0,81	0,293
Filé						
Ca ¹ mg/Kg	1655	1379	1517	1375	104	0,786
Mg ² mg/Kg	1334	1368	1314	1298	12,3	0,207
K ³ mg/Kg	14559	13839	13500	13144	278	0,341
Fe ⁴ mg/Kg	19,6	40,6	20,8	21,8	4,37	0,288
Mn ⁵ mg/Kg	0,502	0,799	0,475	0,615	0,07	0,353
Zn ⁶ mg/Kg	17,5	18,8	17,3	16,8	0,34	0,187

¹Ca: Cálcio; ²Mg: Magnésio; ³K: Potássio; ⁴Fe: Ferro; ⁵Mn: Manganês e ⁶Zn: Zinco. ⁷EPM: Erro Padrão Médio.

Os valores de composição mineral no filé (Tabela 14) da tilápia do Nilo apresentaram um aumento ao serem comparados com os obtidos por CLEMENT & LOVELL (1994) com dietas comerciais para os seguintes minerais: Ca, Mg, Mn, K e Zn, da mesma forma, para os estudos com dietas isentas de ingredientes de origem animal, principalmente, a farinha de peixe. Entretanto para a composição na carcaça (Tabela 14) foi inferior com relação ao Ca, semelhantes ao Mg, e superiores ao K e

Zn, além do presente trabalho encontrar valores de Mn, que não foram obtidos por GONZALES & BROWN (2006). Os valores médios dos parâmetros hematológicos dos juvenis de tilápias do Nilo submetidos a níveis crescentes de inclusão da FFA estão apresentados na tabela 15. Esses parâmetros não apresentaram diferenças significativas entre o controle e os tratamentos experimentais.

Tabela 15. Parâmetros hematológicos dos juvenis de tilápia do Nilo submetidos as dietas crescentes com FFA.

Parâmetros	Tratamentos com a inclusão da FFA				EPM ⁷	Pvalor
	Controle	8%	16%	24%		
Hct ¹ (%)	28,3	29,1	29,1	30,4	0,49	0,534
Hg ² (g/dL ⁻¹)	7,8	7,7	7,8	7,6	0,29	0,994
RBC ³ (x10 ⁶ µL ⁻¹)	1,9	1,8	1,7	1,9	0,08	0,562
VCM ⁴ (fL)	152	164	156	169	6,56	0,808
CHCM ⁵ (g/dL ⁻¹)	27,7	26,8	26,9	25,1	1,04	0,847
Leucócitos ⁶ (células µL ⁻¹)	353.201	435.305	418.669	432.536	300.99	0,758

¹Hct: Hematócrito; ²Hg: Hemoglobina; ³RBC: Eritrócitos; ⁴VCM: Volume Corpuscular Médio e ⁵CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. ⁶EPM: Erro Padrão Médio.

Em estudos utilizando o extrato de folha de amoreira em níveis crescentes (15, 30, 60, 90 e 120g/Kg) para *C. auratus gibelio*, foi observado um efeito na redução dos parâmetros hematológicos de RBC e VCM (LI *et al.*, 2020). Porém, houve uma similaridade nos valores e Hct e RBC quando comparados com os do presente estudo com tilápia do Nilo.

O extrato da folha de moringa (*M. oleifera*) foi utilizado na suplementação de dietas com 1 e 2g/Kg para tilápia do Nilo, apresentaram valores semelhantes para Hg, e superiores para RBC e leucócitos suplementados com FFA (MAHMOUD *et al.*, 2022). Os valores médios dos parâmetros bioquímicos do sangue dos juvenis de tilápias do Nilo alimentados com dietas contendo diferentes níveis de FFA são apresentados na tabela 16. Os peixes alimentados com 24% apresentaram menores níveis de glicemia do que aqueles alimentados com a dieta controle, enquanto, os tratamentos 8% e 16% foram similares ao controle. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para PPT, Triglicerídeos, Colesterol e Cortisol entre o controle e os tratamentos.

Tabela 16. Parâmetros bioquímicos do sangue de juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de FFA.

Parâmetros	Tratamentos com a inclusão da FFA				EPM ²	Pvalor
	Controle	8%	16%	24%		
	PPT ¹ (g/dL ⁻¹)	4,19	4,27	4,05		
Triglicerídeos (mg/dL ⁻¹)	98,9	112	101	82,4	6,12	0,379
Colesterol (mg/dL ⁻¹)	92,4	85,1	71,0	83,3	4,14	0,335
Glicose (mg/dL ⁻¹)	49,0a	44,2ab	43,6ab	33,5b	1,82	0,017*
Cortisol (ng/mL)	1,62	1,81	1,61	1,79	0,05	0,246

¹PPT: Proteína Plasmática Total. ²EPM: Erro Padrão Médio. *Médias na mesma linha seguidas de letras distintas são diferentes (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Em estudos com *M. salmoides*, a suplementação da dieta com 50 Kg de FFA reduziu os níveis de glicose, triglicerídeos e colesterol, interferindo no metabolismo da glicose e, portanto, reduzindo o conteúdo de glicogênio no fígado dos peixes (XV et al., 2021). Porém, outros estudos com tilápia do Nilo relataram resultados similares (SHEN et al., 2016). A administração da FFA em suplementação de dietas, apresentou atividade no papel de modulação do metabolismo da glicose, além de exibir efeitos de regulação dos lipídeos, ocasionando eliminação do acúmulo de lipídeos no fígado, como também, reduziu os triglicerídeos e o colesterol plasmático em peixes (XV et al., 2021; TSUDUKI et al., 2013). Em razão da regulação das enzimas hepáticas com a suplementação de FFA pode ocorrer inibição na síntese de lipídeos e, assim, promover a degradação destes, resultando na diminuição de triglicerídeos e colesterol plasmático (LI et al., 2018; TSUDUKI et al., 2013).

Em estudos com juvenis de *M. amblycephala*, foi verificado que a utilização da FFA, em comparação com a folha fermentada, ambas apresentaram uma diminuição no colesterol, principalmente, nos tratamentos com 4,44% (JIANG et al., 2022). No entanto, alguns estudos demonstraram que a utilização das folhas não fermentadas aumenta mais o potencial do que a fermentada, principalmente, no requisito de utilização como aditivo funcional em dietas para peixes. Além de não perder suas propriedades em algumas atividades biológicas (YANG et al., 2024; JIANG et al., 2022; TANG et al., 2021).

Em um outro estudo foi verificado a comparação entre a farinha e o extrato de folhas de amoreira em dietas para *M. salmoides*, ambos os tratamentos

apresentaram níveis menores de glicemia, cujos resultados foram semelhantes aos encontrados pelo presente trabalho (tabela 16) para a tilápia do Nilo. Além de valores menores para triglicerídeos e colesterol (WEI *et al.*, 2023). No entanto, nos estudos de SHEN *et al.*, (2016), o extrato apresentou um impacto hiperglicêmico para a tilápia do Nilo.

Em estudos com a farinha de folha de moringa (*M. oleifera*) para tilápia do Nilo, houve uma redução nos níveis de glicose, colesterol e triglicerídeos de acordo com o aumento na inclusão da farinha gradativamente (2,4 a 6g/Kg), cujos valores são compatíveis aos níveis obtidos pelo presente trabalho para FFA.

Os valores de PPT obtidos pelo presente estudo (Tabela 16) foram semelhantes aos encontrados para o extrato de farinha de folha de inhame (*C. esculenta*), quando suplementados com 20% nas dietas de tilápia do Nilo, (ADESHINA *et al.*, 2021b).

7.4 CONCLUSÕES

O uso da FFA para juvenis de tilápia do Nilo não apresentou influências significativas nos parâmetros zootécnicos, principalmente, com relação ao GP, TCE e EA e sugerem que houve uma melhoria na diminuição do acúmulo de gordura para os índices de rendimento corporal, além de, apresentarem níveis baixos de glicose, cortisol, triglicerídeos e colesterol. Portanto, é recomendada a utilização do menor nível (6%) da FFA para inclusão em dietas, por não apresentarem uma diferença entres os níveis.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-HACK, M. E., EL-SAADONY, M. T., NADER, M. M., SALEM, H. M., EL-TAHAN, A. M., SOLIMAN, S. M., & KHAFAGA, A. F. Effect of environmental factors on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International journal of biometeorology**, v. 66, n. 11, p. 2183-2194, 2022.
- ADESHINA, I.; TIAMIYU, L.O.; AKPOILIH, B.U.; JENYO-ONI, A.; AJANI, E.K. Dietary *Mitracarpus scaber* leaves extract improved growth, antioxidants, non-specific immunity, an resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Gyrodactylus malalai* infestation. **Aquaculture**, v.535, n.736377, 2021b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736377>
- ANDRADE, J. L. R.; NUNES, M. S.; GEDANKEN, V. **Piscicultura: fundamentos da produção de peixes**. Brasília-DF: Serviço Nacional de Aprendizagem Rural, 2017.
- AOAC: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. 21th etd., AOAC International, Arlington, 2019.
- AZEVEDO, K.S.P. et al. Farinha do subproduto de feijão phaseolus vulgarisem dietas para juvenis de tilápia do Nilo. **Boletim de Indústria Animal**, v. 74, p. 79-85, 2017.
- BABALOLA, T. O.; APATA, D. F.; OMOTOSHO, J. S.; ADEBAYO, M. A. Differential effects of dietary lipids on growth performance, digestibility, fatty acid composition and histology of African catfish (*Heterobranchus longifilis*) fingerlings. **Food and Nutrition Sciences**, v. 2, p. 11-21, 2011.
- BEZERRA, K.S.; MELO, J.F.B. Utilização da farinha de manga residual como ingrediente na alimentação de Tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Revista Varia Scientia Agrárias**, v.04, n.01, p.117-130, 2014.
- BOYD, C. E.; TUCKER, C. S. **Pond aquaculture water quality management**. Boston: Kluwer, 1998.
- CASTILLO, S. & GATLIN, D.M. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: A review. **Aquaculture**, v, 435, p. 286– 292, 2015.
- CHAKRABARTY, D.; BAG, M.P. Growth performance and flesh fatty acid profiles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed with two leguminous plant leaf meals. **Electronic Journal of Biology**, v.9, n.4, p.84-91, 2013.
- CHAN, E.W.; LYE, P.Y.; WONG, S.K. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. **Chinese Journal Natural Medicines**, v. 14, p. 17-30, 2016.
- CHEN, C.; MOHAMAD, R. U.; SAIKIM, F. H.; MAHYUDIN, A.; MOHD, N. N. *Morus alba* L. plant: bioactive compounds and potential as a functional food ingrediente. **Foods**, v. 10, n. 3, 2021.

CHEN, G.; LONG, J.; LI, H.; XU, J.; YUAN, J.; YANG, Q.; FENG, L.; WU, M.; JIANG, J. The protective effect of a dietary extract of mulberry (*Morus alba* L.) leaves against a high stocking density, copper and Trichlorfon in Crucian Carp (*Carassius auratus*). **Animals**, v. 13, n.6, 2652, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13162652>

CHEN, W.Y.; CHEN, Y.J.; PENG, X.H.; LIN, S.M.; HUANG, X.Z.; LI, Y. Replacement of fish meal with fermented mulberry leaves protein in low fish meal diets for Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chinese Journal of Animal Nutrition**, v. 27, p.3968-3974, 2015.

CHOU, B.S.; SHIAU, S.Y. Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*. **Aquaculture**, v.143, p.185-195, 1996.

CLEMENT, S. & LOVELL, R.T. Comparison of processing yield and nutrient composition of cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v.119, p. 299-310, 1994.

CONTRERAS-GUZMÁN, E.S. **Bioquímica de pescados e derivados**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

DALSGAARD, J.; BACH KNUDSEN, K.E.; VERLHAC, V.; EKMANN, K.S. & PEDERSEN, P.B. Supplementing enzymes to extruded, soybean-based diet improves breakdown of non-starch polysaccharides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture Nutrition**, v.2, n 2, p. 419–426, 2016.

DIAS, P.S. **Digestibilidade e inclusão da farinha da folha de amoreira (*Morus alba*) em rações para alevinos de tilapia do Nilo**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável) -Setor de Palotina, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2019.

DIAS, P.S.; SANTOS, H. K.; BALEN, R. E. ZADINELO, I. V.; MEURER, F. Energy and nutrient digestibility from mulberry (*Morus alba*) leaf meal for Nile tilapia. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 44, p. 1–6, 8 mar. 2022a.

EL-TAWIL, N.; ALI, S.; EL-MESALLAMY, A. Effect of using taro leaves as a partial substitute of soybean meal in diets on growth performance and feed efficiency of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries**, v.24, n. 7, p.383-396, 2020.

GANZON, J.G.; CHEN, L.G.; WANG, C.C. 4-O-Caffeoylquinic acid as an antioxidant marker for mulberry leaves rich in phenolic compounds. **Journal of Food Drug Analysis**, v. 26, n. 3, p. 985-993, 2018.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. **American Journal of Clinical Pathology**, v.56, n.1, p.35-39, 1971.

GONZALES Jr., J.M.; BROWN, P.B. Nile tilapia *Oreochromis niloticus* as a food source in advanced life support systems: Initial considerations. **Advances in Space Research**, v.38, p.1132-1137, 2006.

HAYASHI, C. *et al.* Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2 SUPPL. p. 823–828, 2002.

HE, X.; FANG, J.; RUAN, Y.; WANG, X.; SUN, Y.; WU, N.; ZHAO, Z.; CHANG, Y.; NING, N.; GUO, H.; HUANG, L. Structures, bioactivities and future prospective of polysaccharides from *Morus alba* (white mulberry): A review. **Food Chemistry**, v. 245, p. 899-910, 2018.

HUANG, J.; LIAO, Y.X.; WEI, J.T.; WU, H. Application status and development mode of mulberry leaf in aquaculture. **North. Sericulture**, v. 41, p. 45-49, 2020. DOI: 10.19443/j.cnki.1673-9922.2020.04.011

HUNT, A.Ö.; YILMAZ, F.Ö.; ERÇEN, Z. Comparing the effects of feeding a fish Oil-or a cod liver Oil-based diet on growth, feed utilization and muscle fatty acid composition Nile tilapia. **Mediterranean Fisheries and Aquaculture Research**, v. 1, n. 3, p.130-142, 2018.

HUSSEIN, E.E-S.M. Effect of moringa leaves, *Moringa Oleifera* meal as a feed additive on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Aquaculture**, v.7, 2017.

JIANG, W.; LIN, Y.; QIAN, L.; MIAO, L.; LIU, B.; GE, X.; SHEN, H. Mulberry leaf meal: A potential feed supplement for juvenile *Megalobrama amblycephala* “Huahai No. 1”. **Fish & Shellfish Immunology**, v.128, p.279-287, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.07.022>

KASIGA, T.; CHEN, R.; SINK, T.; LOCHMANN, R. Effects of reduced soybean-meal diets containing *Moringa oleifera* or *Leucaena leucocephala* leaf meals on growth performance, plasma lysozyme, and total intestinal proteolytic enzyme activity of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in outdoor tanks. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.45, n.5, October, 2014. DOI: 10.1111/jwas.12143

KAVIRAJ, A., MONDAL, K., MUKHOPADHYAY, P.K., TURCHINI, G.M. Impact of fermented mulberry leaf and fish offal in diet formulation of Indian major carp (*Labeo rohita*). **Proceedings of the Zoological Society (Calcutta)**, v. 66, n.1, p. 64-73, 2013.

KUBITZA, F. **Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial**. 2.ed. rev. ampl. Jundiaí: Acqua Supre Com. Suprim. Aquicultura, 316p., 2011.

LI, F.; YANG, Y.; CHEN, W.; LIN, S.; LUO, L.; HUANG, X. Effects of dietary mulberry leaves on growth performance, fat metabolism and muscle quality of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chinese Journal of Animal Nutrition**, v. 26, n. 11, p. 3485-3492, 2014.

LI, H.; LU, L.; WU, M.; XIONG, X.; LUO, L.; MA, Y.; LIU, Y. The effects of dietary extract of mulberry leaf on growth performance, hypoxia-reoxygenation stress and biochemical parameters in various organs of fish. **Aquaculture Reports**, v.18, n. 100494, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100494>

LI, H.X.; JO, E.; MYUNG, C.S.; KIM, Y.H.; YANG, S.Y. Lipolytic effect of compounds isolated from leaves of mulberry (*Morus alba* L.) in 3T3-L1 adipocytes. **Natural Product Research**, v.32, p.1963-1966, 2018.

LI, Y.G.; ZHANG, L.; ZHONG, S.; ZHANG, X.D.; LI, Q.H.; LV, Z.Q.; JI, D.F. Effects of dietary mulberry leaf on growth performance, fat metabolism and meat quality of finishing pigs. **Chinese Journal of Animal Nutrition**, v. 24, n.9, p.1805-1811, 2013.

LI, Y.G.; JI, D.F.; ZHONG, S.; LIN, T.B.; LV, Z.Q.; HU, G.Y.; WANG, X. 1-deoxynojirimycin inhibits glucose absorption and accelerates glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic mice. **Scientific Reports – Nature**, v.3, n.7442, 1377, 2012.

LIMA, M.R.; LUDKE, M.C.M.M.; HOLANDA, M.C.R.; PINTO, B.W.C.; LUDKE, J.V.; SANTOS, E.L. Performance and digestibility of Nile tilapia fed with pineapple residue bran. **Revista Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 34, p. 41-47, 2022.

LIMA, C.S.; SILVEIRA, M.M.; TUESTA, G.M.R. Nutrição proteica para peixes. **Ciência Animal**, v. 25, p. 27-34, 2015.

LIMA, M.R.; LUDKE, M.C.M.M.; SANTOS, E.L.; NUNES, C.A.R.; OLIVEIRA, C.J.P. Effect of the addition of poultry by-product meal on the zootechnical performance of Nile tilapia fingerlings. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 21, n. 4, p. 489-496, 2022a.

LIU, Y.; LI, Y.; PENG, Y.; HE, J.; XIAO, D.; CHEN, C.; LI, F.; HUANG, R.; YIN, Y. Dietary mulberry leaf powder affects growth performance, carcass traits and meat quality in finishing pigs. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutri.** (Berlin), v. 103, p. 1934-1945, 2019.

LUSTOSA-NETO, A.D.; NUNES, M.L.; FERREIRA, R.N.C.; BEZERRA, J.H.C. & FURTADO-NETO, M.A.A. Elaboração, rendimento e custo de almôndegas de tilápia do Nilo e pirarucu cultivados: aplicação na merenda escolar. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v.4, n.2, p.101-109, 2016. DOI: DOI 10.2312/ActaFish.2016.4.2.101-109

MAHMOUD, H.K.; FARAG, M.R.; REDA, F.M.; ALAGAWANY, M.; ABDEL-LATIF, H.M.R. Dietary supplementation with *Moringa oleifera* leaves extract reduces the impacts of sub-lethal fipronil in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Scientific Reports – Nature**, v.12, n. 21748, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25611-6>

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W.R. Apparent digestibility of some protein sources for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 32, n. 06, p. 1801-1809, 2003.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M.; BOSCOLO, W.R. Utilização de levedura em spray dried na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Acta Scientiarum**, v. 22, n.2, p. 479-484, 2000. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v22i0.2995>

MIRANDA, J. E., BONACIN, G. A., & TAKAHASHI, R. Produção e qualidade de folhas de amoreira em função da época do ano e de colheita. **Scientia Agricola**, v. 59, p. 499–504, 2002.

MITHUNKUMAR, S., ATHITHAN, S., PADMAVATHY, P., LINGAPRABU, D., & VIJAYAMIRTHARAJ, K. S. Effect of deoiled silkworm pupae meal (*Bombyx mori*) as a replacement of fish meal in the diet of juveniles of Silver pompano, *Trachinotus blochii*. **Research Square**, 2023.

MONDAL, K., KAVIRAJ, A., MUKHOPADHYAY, P.K. Growth performance of Indian minor carp *Labeo bata* fed varying inclusions of fermented fish-offal and mulberry leaf meal based-diets. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 14, n. 3, p.567-582, 2015.

MONDAL, K.; KAVIRAJ, A.; MULHOPAHYAY, P.K. Effects of partial replacement of fishmeal in the diet by mulberry leaf meal on growth performance and digestive enzyme activities of Indian minor carp *Labeo bata*. **International Journal of Aquatic Science**, v.3, n.1, p.72-83, 2012.

MORAES, S.G.S. **Cafeína para peixe de corte**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2018.

MORANDI, R.A. & CAETANO-FILHO, M. **Processamento de tilápias: rendimentos e perdas**. 2015. Disponível em: < <http://criapeixe.blogspot.com.br/2015/01/>>. Acesso em 30 de julho de 2024.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of Fish and Shrimp**. Washington, D.C., 376p., 2011.

OFORI. J.K.; DANKWA, H.R.; BRUMMETT, R.; ABBAN, E.K. Producing tilapia in small cage in West Africa. **World fish center technical manual no the WFC**, Penang, Malaysia. 16p. 2009.

OLIVEIRA, E.G.; SANTOS, F.J.S.; PEREIRA, A.M.L.; LIMA, C.B. **Produção de Tilápia: Mercado, Espécie, Biologia e Recria**. Circular Técnica 45. Embrapa Meio – Norte, 2007.

OLIVIERO, F.; SCANU, A.; ZAMUDIO-CUEVAS, Y.; PUNZI, L.; SPINELLA, P. Antiinflammatory effects of polyphenols in arthritis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 5, p. 1653-1659, 2018.

PEDROZA FILHO, M.X.; RIBEIRO, V.S.; ROCHA, H.S.; UMMUS, M.E.; VALE, T.M. **Caracterização da cadeia produtiva da tilápia nos principais polos de produção do Brasil**. Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura. 51p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 26), 2020.

PEIXEBR. **Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixes BR 2024**. Associação Brasileira de Piscicultura, 2024.

PEREIRA, A. C. **Produção de Tilápia**. Programa de Desenvolvimento Rural Sustentável em Microbacias, p. 52, 2012.

PINTO, L.G.Q. et al. Digestibilidade de fontes proteicas e disponibilidade de fosfatos inorgânicos em três fases de desenvolvimento da tilápia-do-Nilo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, p. 1-13, 2017.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Ed. EDUEM: Maringá, 2013.

RASMUSSEN, R.S.; OSTENFELD, T.H. Effect of growth rate on quality traits and feed utilization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Aquaculture**, v.184, p.327-337, 2000.

SÁ, M.V.C. **Limnocultura Limnologia para Aquicultura**. Fortaleza: UFC, 2012.

SÁ, M.V.C.; FRACALOSSO, D.M. Exigência protéica e relação energia/proteína para alevinos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.1-10, 2002.

SANTOS, E.L.; BEZERRA, K.S.; SOARES, E.C.S.; SILVA, T.J.; FERREIRA, C.H.L.H.; SANTOS, C.C.S.; SILVA, C.F. Desempenho de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com folha de mandioca desidratada na dieta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n.5, p.1421-1428, 2015. DOI: 10.1590/1678-4162-8200

SANTOS, L.; PEIREIRA FILHO, M.; SOBREIRA, C.; ITAUSSÚ, D.; FONSECA, F.A.L. Exigência protéica de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) após privação alimentar. **Acta Amazonica**, v.40, n. 3, p.597-604, 2010.

SATAKE, F.; PÁDUA, S.B.; ISHIKAWA, M.M. Distúrbios morfológicos células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: TAVARES-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. 1º ed. Macapá: Embrapa Amapá, p.330-345, 2009.

SHEIKHLAR, A., ALIMON, A.R., DAUD, H., SAAD, C.R., WEBSTER, C.D., MENG, G.Y., EBRAHIMI, M. White mulberry (*Morus alba*) foliage methanolic extract can alleviate *Aeromonas hydrophila* infection in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Scientific World Journal**, v. 2014, 592709, 2014.

SHEN, H.M.; PENG, X.H.; LIN, S.M.; CHEN, Y.J.; HUANG, X.Z. Regulation of fermented mulberry leaves on serum lipid and blood glucose levels of hyperlipidemia Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chinese Journal of Animal Nutrition**, v. 28, p.1250-1256, 2016.

SILVA, F.V.; SARMENTO, N.L.A.F.; VIEIRA, J.S. TESSITORE, A.J.A.; OLIVEIRA, L.L.S.; SARAIVA, E.P. Características morfométricas, rendimentos de carcaça, filé,

vísceras e resíduos em tilápia-do-Nilo em diferentes faixas de peso. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.8, p.1407-1412, 2009.

SILVA, T. S. C.; SANTOS, L. D.; SILVA, L. C. R.; MICHELATO, M.; FURUYA, V. R. B.; FURUYA, W. M. Length–weight relationship and prediction equations of body composition for growing-finishing cage-farmed Nile tilapia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.4, n.44, p.133-137, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-92902015000400001>

SOUSA, J. A. A.; SANT, B. D.; MELO, J. D. G.; CARVALHAL, M. V. L. Acompanhamento biométrico de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema de recirculação de água em diferentes adensamentos. **Natural Resources**, v.11, n.3, p.82-90, 2021. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPC2237-9290.2021.003.0009>

TANG, X.; FU, J.; GAO, Q.; LIU, G.; YE, J.; GUAN, W.; SHI, Y.; XU, M. Effects of mulberry (*Morus alba* L.) Leaf extracts on growth, immune response, and antioxidant functions in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Annals of Animal Science**, 2021. DOI: [10.2478/aoas-2021-0038](https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0038)

TOCHER, D.R.; FONSECA-MADRIGAL, J.; GORDON BELL, J.; DICK, J.R.; JAMES HENDERSON, R.; SARGENT, J.R. Effects of diets containing linseed oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.26, p.157-170, 2002.

TSUDUKI, T.; KIKUCHI, I.; KIMURA, T.; NAKAGAWA, K.; MIYAZAWA, T. Intake of mulberry 1-deoxynojirimycin prevents diet-induced obesity through increases in adiponectin in mice. **Food Chemistry**, v.139, p.16-23, 2013.

WATANABE, W. O. *et al.* Tilapia Production systems in the Americas: technological advances, trends, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, v. 10, n. 3-4, p. 465- 498, 2002.

WEI, Y.; HUANG, J.; SUN, H.; FENG, Z.; HE, Y.; CHEN, Y.; LIN, S. Impact of different processing mulberry leaf on growth, metabolism and liver immune function of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture Reports**, v. 29: 101508, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2023.101508>

XU, J.; WANG, X.; CAO, K.; DONG, Z.; FENG, Z.; LIU, J. Combination of β -glucan and *Morus alba* L. Leaf extract promotes metabolic benefits in mice fed a high-fat diet. **Nutrients**, v. 9, 1110, 2017.

XV, Z.C.; HE, L.; WANG, L.; SHUN, H.; CHEN, J.; LIN, S.M. Mulberry leaf powder ameliorate high starch-induced hepatic oxidative stress and inflammation in fish model. **Animal Feed Science and Technology**, v.278, 115012, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115012>

YANG, M.; JIANG, D.; ZHANG, L.; LU, L.; XU, Y.; KHAN, M.S.; JIANG, J. Mulberry (*Morus alba*) leaves improve the growth and intestinal health in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed a cottonseed protein concentrate-based diet.

Aquaculture, v.592, 741212, 2024. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741212>

ZENG, X.-N.; ZHANG, X.-Y.; CHEN, B.; GAO, L.-L.; LIU, S.; WU, F.; PAN, Q. Dietary four different woody forages differentially affect the growth, feed utilization, apparent digestibility, intestinal morphology and microbiota composition in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Reports**, v.21, n.100786, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100786>

ZHOU, S.; HUANG, Z.; LIN, H.; KONG, L.; MA, J.; LONG, Z.; QIN, H.; LIU, L.; LIN, Y.; LI, Z. Effects of mulberry leaf extract on the intestinal health os spotte sea bas (*Lateolabrax maculatus*). **Frontiers in Marina Science**, v. 10:1185795, 2023b. DOI: [10.3389/fmars.2023.1185795](https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1185795)

ZHOU, S.; LIN, H.; KONG, L.; MA, J.; LONG, Z.; QIN, H.; HUANG, Z.; LIN, Y.; LIU, L.; LI, Z. Effects of mulberry leaf extract on the liver function of juvenile spotted Sea Bass (*Lateolabrax maculatus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 2023, 2892463, 14p., 2023b. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/2892463>

8 CAPÍTULO IV

**EFEITO NOS ÍNDICES HEMATOLÓGICOS DE JUVENIS DE PACU SUBMETIDOS
A DIFERENTES TIPOS DE DIETAS APÓS DESAFIO COM *Aeromonas hydrophila***

8.1 INTRODUÇÃO

Em 2023, a produção nacional de peixes nativos, incluindo o pacu (*P. Mesopotamis*), correspondeu a 29,7% da produção total de peixes de cultivo (PEIXEBR, 2024). O pacu é uma espécie neotropical amplamente distribuída na bacia o rio da Prata (MASTROCHIRICO-FILHO *et al.*, 2019; URBINATI *et al.*, 2013). É uma espécie de peixe onívoro muito valorizada pelapiscicultura intensiva devido as seguintes características zootécnicas, crescimento rápido, baixo custo nos hábitos alimentares e resistência a distúrbios ambientais, além de excelente aproveitamento de nutrientes (VOLKOFF *et al.*, 2017; URBINATI *et al.*, 2013; URBINATI & GONÇALVEZ, 2005). Por essas razões, o pacu contribui significativamente para produção de espécies nativas de peixes na América do Sul (VALLADÃO *et al.*, 2016).

Embora a aquicultura esteja crescendo em países em desenvolvimento, a falta de medidas de controle sanitário é um fator limitante para a atividade (MASTROCHIRICO-FILHO *et al.*, 2019). As práticas comuns adotadas nas pisciculturas, como densidade de estocagem altas, procedimentos frequentes de manejos, problemas de qualidade de água, causam muitos surtos de doenças, resultando em perdas significativas na produção (LEUNG & BATES, 2013; JANSEN *et al.*, 2012).

Uma das bactérias gram-negativas oportunistas que causam grandes perdas econômicas na piscicultura globalmente é a *A. hydrophila* (MU *et al.*, 2010; CRUMLISH *et al.*, 2010; HARIKRISHNAN & BALASUNDARAM, 2005; CAMUS *et al.*, 1998). No Brasil causam mortalidades de 20-30% da produção e, embora, falem dados precisos grande parte desses problemas é devido à falta de controle sanitário (MASTROCHIRICO-FILHO, 2019). Além de estar associada à síndrome ulcerativa epizootia, seus efeitos ainda causam restrição das nadadeiras (NILENSEN *et al.*, 2001). Essa infecção também causa perda de apetite e natação letárgica ou errática (CONTE, 2004). Além de apresentar riscos à segurança alimentar, pois, está ligada a doenças humanas como gastroenterite, septicemia e doenças de pele (IGBINOSA *et al.*, 2012).

No Brasil, é comum usar antibióticos como oxitetraciclina e florfenicol para tratar doenças bacterianas nas pisciculturas (MONTEIRO *et al.*, 2018). O uso

frequente desses antibióticos pode poluir o ambiente aquático e gerar resíduos na carne. O uso excessivo de forma inadequada destes antibióticos tem favorecido o surgimento de cepas resistentes em espécies nativas, incluindo o pacu (CABELLO, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2018, BELÉM-COSTA & CYRINO, 2006). Embora a vacinação contra *A. hydrophila* tenha apresentado altas taxas de sobrevivência em peixes vacinados, a prática é considerada demorada, trabalhosa e estressante para os animais (POOBALANE *et al.*, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

A amoreira (*M. alba*), é amplamente estudada por seu potencial antibacteriano, devido a fotoquímicos como taninos, alcaloides e flavonoides (BATIHA *et al.*, 2023). Pesquisas revelaram que suas folhas e extratos inibem bactérias patogênicas, evidenciando suas propriedades antibacterianas e antiprotozoárias, principalmente, contra *Ichthyophthirius multifiliis* em peixes (FU *et al.*, 2014). Esses resultados destacam a importância da amoreira como um recurso natural relevante para combater patógenos em ambientes aquáticos.

A ora-pro-nóbis (*P. aculeata*) também tem se destacado pelas suas propriedades antimicrobianas, comprovando o seu potencial na avicultura e na piscicultura (MEZALIRA *et al.*, 2023, MACEDO *et al.*, 2023). A ora-pro-nobis é uma planta rica em compostos bioativos, proteínas, carboidratos, minerais e vitaminas em suas folhas (SILVA *et al.*, 2023; TAKEITI *et al.*, 2009). Estudos indicam sua eficácia contra bactérias como *Escheriachia coli* e *Samonella spp.*, (MEZALIRA *et al.*, 2023), e *Staphylococcus aureus* (MACEDO *et al.*, 2023). Suas propriedades podem ajudar nos desafios bacterianos na piscicultura.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros hematológicos, os sinais clínicos e a sobrevivência de pacus (*P. Mesopotamis*) desafiados com *A. hydrophila*, alimentados com diferentes tipos de dietas. As dietas foram comparadas para determinar a mais eficaz entre a dieta comercial; o controle (isenta de ingrediente de origem animal); a dieta com inclusão de 6% de FFA e 32% de FFO.

8.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no mesmo local mencionado no item 6.2, com duração de 47 dias, e foram utilizados 60 juvenis de Pacu (*P. Mesopotamis*). Os seguintes resultados foram obtidos com a biometria inicial, peso médio de $13,54 \pm 3,7$ g, CT médio $9,1 \pm 1,4$ cm e CP médio de $6,7 \pm 1,1$ cm. Os peixes foram adquiridos de uma piscicultura cadastrada na CEUA da Embrapa, e a cepa TR3 da bactéria de *A. hydrophila* foi doada e manipulada pela Coleção de Culturas de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da Embrapa Meio Ambiente. Todos os procedimentos desse estudo seguiram os Princípios Éticos da Experimentação Animal e foram aprovados pela CEUA da EMBRAPA Meio Ambiente, conforme registro nº 003/2023 (anexos III). As dietas foram fabricadas no Lataq/UFPR campus avançado de Jandaia do Sul/PR.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos (comercial, controle, FFO e FFA). Os peixes foram considerados como repetições e foram distribuídos em um sistema de recirculação fechada. Esse sistema era composto por 4 linhas independentes compostas por duas caixas de água de polietileno com capacidade de 1.000L cada uma. No interior das caixas foram instalados tanques-rede para estocagem dos peixes durante o período experimental. Uma caixa com capacidade de 300L foi conectada as 4 linhas para servir como um biofiltro e recirculação da água (Figura 10).

Para a distribuição dos tratamentos entre 4 linhas do sistema de recirculação de água foi realizado um sorteio, conforme as seguintes linhas: 1: comercial; 2: controle; 3: FFO e 4: FFA.



Figura 10. Estrutura experimental, composta por quatro linhas, com dois tanques de polietileno de 1.000 litros, dois tanques-rede e um biofiltro. **Fonte:** Autoria própria: Dias, (2024).

No interior dos biofiltros foram instaladas três caixas de plástico empilhadas da mesma forma descrita no capítulo II no item 6.5.2. Na primeira das três caixas de plástico foram colocados sacos de nylon com 500g de carvão ativado para melhorar o processo de filtração da água do sistema de recirculação (Figura 11)



Figura 11. Saco de nylon com aproximadamente 500g de carvão ativado. **Fonte:** Autoria própria: Dias, (2024).

A composição das dietas controle, FFA e FFO está detalhada na Tabela 17. A formulação e a fabricação dessas dietas seguiram a metodologia descrita no Capítulo II, item 6.5.3. Além disso, foi utilizada uma ração comercial comprada em uma loja agropecuária localizada na cidade de Jaguariúna/SP. As rações experimentais foram compostas pelos seguintes ingredientes: milho, farelo de glúten de milho, farelo de trigo, óleo de soja, farinha de carnes e ossos de bovinos, farinha de pena hidrolisada, farinha de sangue, calcário calcítico, sulfato de ferro, sulfato de cobre, monóxido de manganês, óxido de zinco, iodato de cálcio, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, Vitamina B5, vitamina B6, vitamina 12, BHT, BHA, com PB 32%, EE 5%.

Tabela 17. Composição química calculada e analisada das dietas experimentais controle, 8% FFA e 32% FFO, submetidas a juvenis de pacu.

Ingredientes	Dietas experimentais		
	Controle	8% FFA	32% FFO
Farelo de soja	50,65	56,93	58,70
Milho moído	45,07	29,60	2,12
FFA	0,00	8,00	0,00
FFO	0,00	0,00	32,00
Óleo de soja	0,75	2,07	3,64
Premix ¹	0,50	0,20	0,50
Fosfato bicálcico	2,25	2,40	2,40
Calcário	0,67	0,67	0,52
BHT	0,01	0,01	0,01
Sal comum	0,10	0,10	0,10
Adsorvente de micotoxinas	0,01	0,01	0,01
Total	100,00	100,00	100,00
Nutrientes %	Composição Calculada		
Ácido linoleico	1,60	2,12	2,46
Amido	31,31	25,60	7,86
Cálcio	1,00	1,00	1,00
Energia Bruta ²	3964,33	4033,36	4068,07
Energia Digestível ²	3000,00	3000,00	3000,00

Fósforo total	0,80	0,82	0,80
Gordura	3,26	4,38	5,57
Proteína Digestível	24,65	30,00	24,65
Proteína Bruta	27,42	31,71	32,99
Matéria Seca	91,92	93,52	92,24
Cinzas	3,53	7,75	3,53
Lisina Total	1,59	1,75	1,71
Metionina Total	0,40	0,41	0,37

¹Premix: Suplemento vitamínico e mineral para peixes composto por Ácido fólico - 1200,00 mg/Kg; Ácido pantotêmico - 10,00g/Kg; B.H.T. - 8.000,00mg/Kg; Biotina - 200,00mg/Kg; Cobalto 80,00mg/Kg; Cobre - 3.500,00mg/Kg; Ferro - 20,00g/Kg; Inositol - 25,00g/Kg; Iodo - 160,00mg/Kg; Manganês - 10,00g/Kg; Niacina - 20,00g/Kg; Selênio - 100,00mg/Kg; Vitamina A - 2.400.000,00UL/Kg; Vitamina B1 - 4.000,00mg/Kg; Vitamina B12 - 8,000mcg/Kg; Vitamina B2 - 4.000,00mg/Kg; Vitamina B6 - 3.500,00mg/Kg; Vitamina D3 - 600.000,00UI/Kg; Vitamina E - 30.000,00 UI/Kg; Vitamina K3 - 3.000,00mg/Kg; Zinco - 24,00g/Kg. **Fonte:** PX PEIXES COCARI S/COL (Lote: 2023). ²Kcal/Kg.

O manejo de distribuição da ração e o arraçoamento adotados foram conduzidos conforme mencionado no Capítulo II, item 6.5.4, no entanto, a sifonagem foi realizada a cada três dias. O monitoramento da qualidade da água foi realizado conforme descrito no Capítulo II, item 6.5.5.

A cepa TR3 foi cultivada em placa de petri com meio sólido TSA (*Tryptic Soy Agar*), incubada a 30°C por 24 h, depois replicada em meio líquido TSB (*Trypticase Soy Broth*) em erlenmeyer de 25mL nas mesmas condições sob agitação a 80 rpm. Após 24h foi transferida para tubos falcon de 50 mL, centrifugados a 7.000 rpm por 12 min, em seguida, foi descartado o sobrenadante e incluída uma solução salina 0,9% sobre o precipitado homogeneizado e novamente centrifugado a 7.000 rpm por 12 min. Esse procedimento foi realizado mais duas vezes para ter certeza que não havia mais conteúdo do meio de cultura, sendo que na última centrifugada o sobrenadante não foi descartado dos tubos falcon. Após homogeneização da solução (cepa TR3 + salina 0,9%) contida nos tubos falcon, foi feito o ajuste da concentração da solução com leitura em espectrofotômetro na curva de 600 nm com DO 0,0517 de absorbância, correspondente a $2,04 \times 10^7$ UFC/ml⁻¹.

Após 45 dias de alimentação dos juvenis de pacu submetidos aos 4 tratamentos (controle, comercial, 8% FFA e 32% FFO) os peixes foram submetidos ao desafio com a cepa TR3. Para isso, foram coletados todos peixes dos quatro tratamentos e anestesiados com eugenol a 135 mg/L. Foi feita pesagem individual

de cada peixe de forma aleatória para a determinação da solução de inoculação. Foram utilizados 0,25 mL da solução de inoculação (cepa TR3 + salina 0,9%) para cada 10g de peso de cada um dos peixes seguindo metodologia indicada SILVA et al., (2012). Essa metodologia foi adaptada para as condições experimentais do laboratório, e a inoculação foi feita por meio de injeção na região intraperitoneal com auxílio de uma seringa de 1 mL e agulha hipodérmica de 13 X 0,45 mm (Figura 11).



Figura 12. Exemplar de juvenil de pacu (*P. mesopotamicus*) recebendo a injeção com inoculação da solução (cepa TR3 + salina 0,9%) na região intraperitoneal. **Fonte:** Autoria própria: Dias, (2024).

Após 46h da inoculação da solução (cepa TR3 + salina 0,9%), foram coletados 12 animais de cada tanque para a coleta sanguínea e análises, conforme as metodologias descritas no item 6.5.7. Além disso, foi observada a letalidade e os sinais clínicos característicos de bacterioses nos peixes durante todo o experimento. Os sinais comuns encontrados nos peixes desafiados com *A. hydrophila* foram a necrose das nadadeiras e úlceras no tegumento, além de, septicemia hemorrágica (RALNNAN e KAWAI, 2000). Os sinais clínicos foram comparados entre os tratamentos usados.

As análises estatísticas foram realizadas conforme descrito no Capítulo II, item 6.2.8, e foram complementadas por uma análise multivariada, incluindo a análise de componentes principais (PCA) para reduzir a dimensionalidade dos dados e identificar os principais pontos de variância. Em seguida, foi feita uma análise de

clusters nos dados transformados pela PCA. Entretanto, a regressão mencionada no Capítulo II, item 6.2.8, não foi aplicada, pois é uma análise adequada quando os tratamentos representam níveis crescentes de uma variável contínua. No presente estudo, os tratamentos consistiram de tratamentos distintos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R Studio 4.3.1.

8.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os Parâmetros de qualidade da água monitorados diariamente como a temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade, estão apresentados na figura 8. Os demais parâmetros de qualidade de água, como por exemplo, nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e amônia, foram monitorados a cada três dias. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 9 e não demonstraram diferenças significativas.

Embora tenha ocorrido variações em todos os parâmetros ao longo do experimento, não foram observados impactos negativos no desempenho dos animais. Todos os parâmetros de qualidade de água permaneceram dentro da faixa de conforto térmico da espécie durante todo o período experimental (CUNHA, 2017).

As variações de nitrito, nitrato e amônia observadas no início do experimento apresentaram valores elevados, os quais, estariam atribuídos à falta de bactérias anaeróbicas redutoras, indicando que os biofiltros não estavam adequadamente maturados com a presença de bactérias redutoras no início do estudo (SIPAÚBA-TARVARES, 1994). Além disso, essas variações podem ter sido causadas pelas trocas de água, bem como, pelo acúmulo de íons provenientes de resíduos de excretas dos animais e das rações nas caixas de polietileno (RAFIEE & SAAD, 2005; ITUASSU *et al.*, 2004).

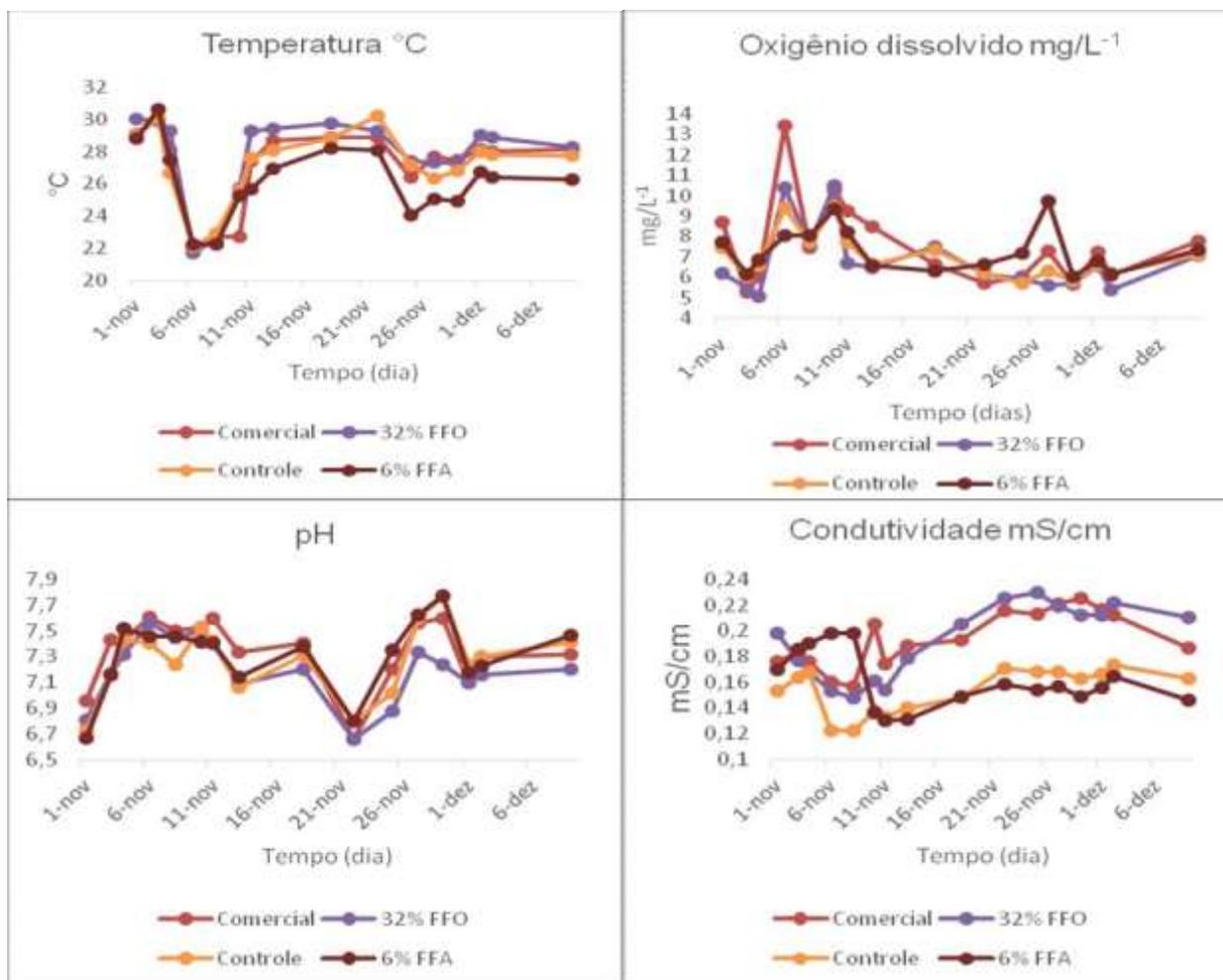


Figura 13. Parâmetros físico-químicos de qualidade de água, temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade medidos nas linhas do sistema de recirculação, correspondentes aos tratamentos durante o período experimental.

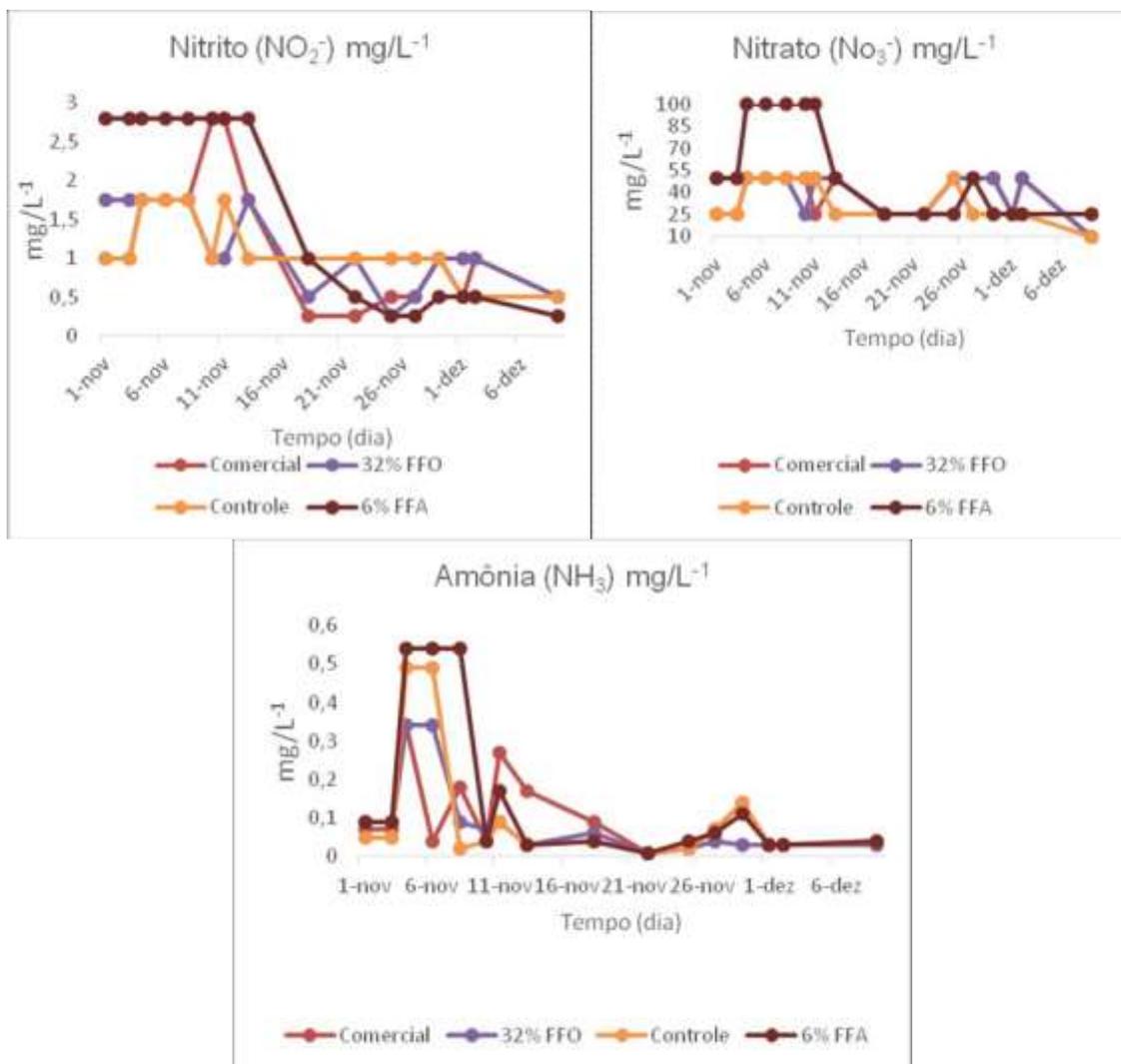


Figura 14. Parâmetros físico-químicos de qualidade de água, nitrito, nitrato e amônia medidos nas linhas do sistema de recirculação, correspondentes aos tratamentos durante o período experimental

Observou-se que houve uma notável alteração na coloração dos peixes alimentados com as dietas FFA e FFO, especialmente, na região inferior do abdômen, a qual, geralmente é amarela. Foi observado que a coloração dessa região se tornou mais intensa em comparação aos peixes dos grupos controle e comercial (Figura 15A e B).

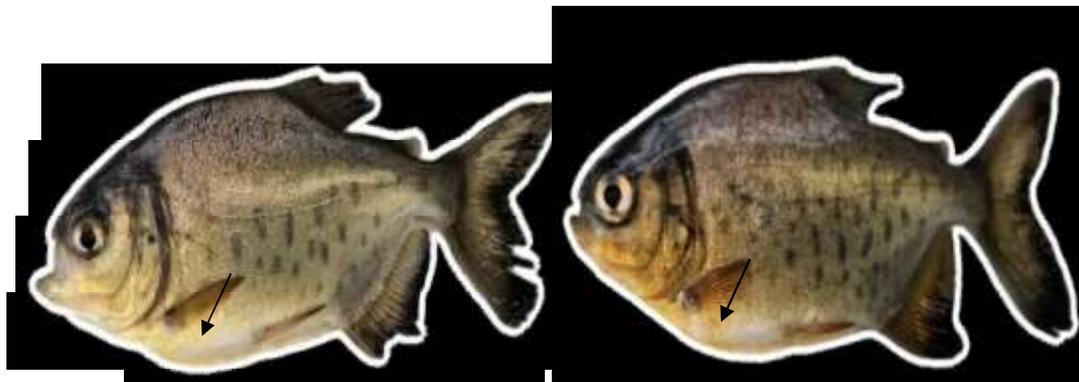


Figura 15. Espécimes de cavalo-de-rio (*P. micropeternicus*) coletados após alimentação com as dietas experimentais. **A)** grupo comercial e controle com coloração mais clara, principalmente, na região inferior da coloração amarelo Próximo a nadadeira peitoral e pélvica; **B)** grupos de FFA (farinha de folha e amoreira) e FFO (farinha de folha de ora-pro-nóbis), com coloração mais intensa nas regiões inferiores. **Fonte:** Autoria própria: Dias, (2024).

Após o desafio bacteriano com a *A. hydrophila* na concentração de $2,04 \times 10^7$ UFC/ml⁻¹, foram observados sinais clínicos de aeromonose na aparência externa dos peixes, tais como, alterações macroscópicas de hemorragia cutâneas na boca, hifema, opérculo e nadadeiras (Figura 16 A, B, C, D, E, F, G, H), o que resultou na mortalidade dos grupos alimentados com as dietas controle e comercial.

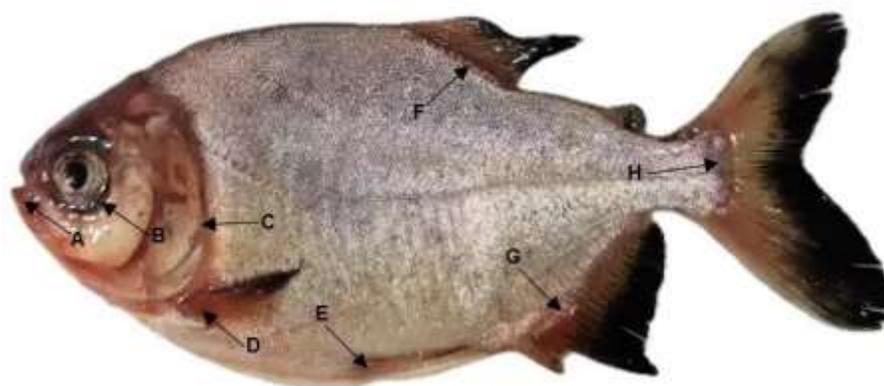


Figura 16. Sinais clínicos de aeromonose com alterações macroscópicas de hemorragia cutâneas, **A:** Boca; **B:** Hifema; **C:** Nadadeira peitoral; **E:** Nadadeira pélvica; **F:** Nadadeira Dorsal; **G:** Nadadeira anal e **H:** Nadadeira caudal. **Fonte:** Autoria própria: Dias, (2024).

O efeito da coloração mais intensa também foi observado no plasma que apresentou uma tonalidade amarela mais forte nos peixes submetidos as dietas com inclusão de FFA e FFO, em comparação com os peixes do grupo controle e comercial, que exibiram uma coloração amarela mais clara, como ilustrado na figura 17.

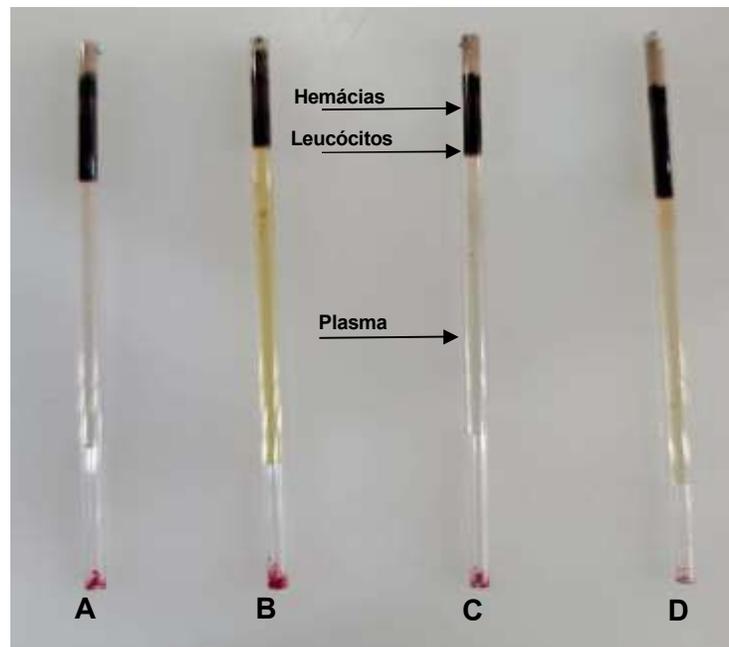


Figura 17. Tubos capilares de micro-hemátrocito após centrifugação, separação do plasma, leucócitos e hemácias, diferenças na coloração do plasma entre as dietas, **A:** Comercial; **B:** FFO; **C:** Controle e **D:** FFA. **Fonte:** Autoria própria: Dias, (2024).

Os resultados obtidos no presente trabalho para os parâmetros hematológicos estão apresentados na tabela 18. As dietas demonstraram ter um impacto significativo em vários parâmetros, o que pode refletir a eficácia das dietas na modulação da resposta ao desafio patogênico, visto que, houve apenas mortalidade de 10% no controle e na dieta comercial. Entretanto, as dietas com FFA e FFO apresentaram uma sobrevivência de 100% dos animais submetidos ao desafio.

Tabela 18. Parâmetros hematológicos de juvenis de pacu submetidos ao desafio com *A. hydrophila* alimentados durante 45 dias com quatro tipos diferentes de dietas.

Parâmetros	Dietas diferentes				EPM ⁷	Pvalor
	Comercial	Controle	FFA	FFO		
Hb ¹ (g/dL ⁻¹)	7,42	6,89	7,21	7,27	0,10	0,25
Htc ² (%)	25,7a	20,6b	23,7a	23,6a	0,46	<0,001
VCM ³ (fL)	161a	124b	127 a	122b	4,35	0,002
CHCM ⁴ (g/dL ⁻¹)	29,1b	33,9a	30,6ab	31,4ab	0,59	0,030
RBC ⁵ (x10 ⁶ µL ⁻¹)	1,65	1,67	1,88	1,92	0,04	0,060
Leucócitos totais (células µL ⁻¹)	166949b	181927b	244155a	177912b	7759	<0,001

¹Hg: Hemoglobina; ²Htc: Hematócrito; ³VCM: Volume Corpuscular Médio; ⁴CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média e ⁵RBC: Eritrócitos. ⁶EPM: Erro Padrão Médio. *Médias na mesma linha seguidas de letras distintas são diferentes (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Os valores de VCM, HCM e CHCM apresentaram diminuição devido a infecção bacteriana, com diferenças significativas entre as dietas. Os valores de CHCM foram semelhantes aos estudos com tambaqui (*Colossoma macropomum*) submetidos a inclusão com óleo de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) nas concentrações de 0,5% (RIBEIRO *et al.*, 2016).

A concentração de Hb variou entre as dietas, apresentado a maior concentração nos animais submetidos a dieta comercial, e a menor concentração foi com a dieta controle. Não houve diferença significativa entre as dietas, apenas alterações de valores (Tabela 18). Entretanto, os valores de VCM obtidos por esse estudo para as dietas e FFA, FFO e controle permaneceram próximos, porém, para o tratamento com a dieta comercial houve um aumento com uma diferença significativa entre as dietas. Este resultado pode ser considerado como um efeito positivo das dietas, devido aos parâmetros hematopoiéticos, geralmente, apresentarem elevação sob estresse causados pela inoculação da bactéria, o que interfere no fornecimento de energia para superar as condições de estresse geradas (TORT, 2011).

As dietas comercial, FFA e FFO apresentaram os maiores valores de hematócrito (Tabela 18). Os resultados obtidos que houve um aumento das hemácias dos peixes alimentados com as dietas experimentais de FFA e FFO. Os valores obtidos apresentaram diferença significativa ao serem comparados com a dieta controle (isenta de ingrediente de origem animal).

Conforme observado no presente estudo, o número de RBC e a hemoglobina, indicam uma condição de estresse desencadeada pelo desafio bacteriano, entretanto, os valores de RBC não apresentaram diferença significativa entre as dietas (tabela 18). Ao comparar os resultados obtidos com os estudos realizados por NURJANNAH *et al.*, (2013) com o extrato da folha de graviola (*Annona muricata*) para carpas comuns (*Cyprinus carpio*) submetidas ao desafio com *A. hydrophila*, constatou-se resultados inferiores aos obtidos no presente trabalho. Indicadores do eritrograma, também podem ser considerados como sinais de estresse, tais como, o número de RBC e a concentração de hemoglobina. Eles indicam a capacidade do sangue de transportar oxigênio para os tecidos, refletindo a demanda energética dos peixes em situações de estresse (HOUSTON, 1997).

Os resultados obtidos para os parâmetros bioquímicos do sangue, indicaram que as dietas influenciaram significativamente, indicando que as dietas apresentaram efeitos nas respostas fisiológicas dos peixes após desafio com bactérias (Tabela 19),

Tabela 19. Parâmetros bioquímicos do sangue de juvenis de pacu submetidos ao desafio com *A. hydrophila* após alimentação por 45 dias com diferentes dietas.

Parâmetros	Dietas diferentes				EPM ²	Pvalor
	Comercial	Controle	FFA	FFO		
PPT ¹ (g/dL ⁻¹)	5,6 ^a	3,0 ^b	3,8 ^a	3,4 ^{ab}	0,46	<0,001
Triglicerídeos (mg/dL ⁻¹)	161 ^c	172 ^{bc}	242 ^a	188 ^b	5,69	<0,001
Colesterol (mg/dL ⁻¹)	127 ^a	86,2 ^c	96,6 ^{bc}	97,8 ^b	2,68	<0,001
Glicose (mg/dL ⁻¹)	63,3 ^b	81,4 ^a	84,2 ^a	60,5 ^b	2,45	<0,001
Cortisol (ng/mL)	1,65 ^a	1,31 ^b	1,26 ^b	1,78 ^a	0,050	<0,001

¹PPT: Proteína Plasmática Total. ²EPM: Erro Padrão Médio. *Médias na mesma linha seguidas de letras distintas são diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os níveis de colesterol plasmático, em geral, podem aumentar após desafio bacteriano, porém, houve um aumento significativo apenas nos peixes do grupo do tratamento com dieta comercial, o que sugere que as dietas com FFA e FFO apresentam imunostimulantes em suas composições. Esses compostos poderiam estar proporcionando um efeito protetor ao tecido hepático dos peixes, evitando, assim o desenvolvimento de dislipidemia grave (RIBEIRO *et al.*, 2016). Os níveis de triglicerídeos plasmático apresentaram uma diferença significativa entre as dietas,

apesar das diferenças os valores não foram altos, mostrando que as dietas apresentam uma redução de lipídeos totais.

Os valores de PPT variaram significativamente entre as dietas. A dieta comercial apresentou o maior valor ($5,6 \text{ g/dL}^{-1}$) e o menor valor foi observada no controle ($3,0 \text{ g/dL}^{-1}$), de modo que, esses resultados demonstram que as diferenças foram altamente significativas (Tabela 19). Entretanto, os resultados obtidos para a dieta com FFA para PPT, apresentaram resultados semelhantes aos obtidos por TAKAHASHI *et al.*, (2016), quando testou o levamisol para pacu submetidos ao desafio com *A. hydrophila*.

Os valores obtidos para glicose apresentaram diferença significativa entre a FFO e os tratamentos restantes. Em estudo desenvolvido por XV *et al.*, (2021) utilizando 5% de FFA em dietas ricas de amido, foi observada uma redução em sua concentração no sangue de *Micropterus salmoides*. Estudos com FFA sugerem desempenho fundamental na regulação do metabolismo da glicose e na função da insulina (SHEN *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2012). Contudo, o mecanismo pelo qual a FFA exerce sua ação anti-hiperglicêmica ainda não foi totalmente esclarecido. O que se tem conhecimento até o momento é que não há estudos descrevendo o isolamento de compostos bioativos da FFA em peixes (XV *et al.*, 2021).

Os valores da concentração de cortisol apresentaram uma variação significativa entre as dietas, com valores mais altos para dieta comercial e FFO ao serem comparados com o controle e FFA (Tabela 19). Essas variações dos níveis de glicose e cortisol no sangue são principais sinais de estresse devido as alterações no ambiente ou na alimentação dos animais. Em condições normais, o cortisol é responsável pela regulação de diversos processos fisiológicos nos animais, além de facilitar as rápidas adaptações do organismo em resposta ao estresse submetido aos peixes (MOMMSEN *et al.*, 1999).

O estresse estimula vários componentes energéticos do metabolismo, aumentando a absorção de oxigênio e, conseqüentemente, promovendo a gliconeogênese e inibindo a síntese de glicogênio no organismo dos animais (ALMARRI *et al.*, 2023). Além disso, o cortisol desempenha um papel crucial, tanto no metabolismo aeróbico quanto no anaeróbico (TORT & KOUMOUNDOUROS, 2010).

Na aquicultura, os animais são frequentemente expostos a agentes estressores devido, principalmente, as densidades elevadas de estocagens, entre outros fatores. Para minimizar esses efeitos é necessário adotar práticas de manejo eficazes, além de, realizar avaliações dos níveis de estresse dos peixes com base nos níveis de glicose e cortisol (SOPINKA *et al.*, 2016; BARTON, 2000; ROBERTSON *et al.*, 1987).

A exposição à um estressor e à infecção bacteriana elevam as concentrações de glicose e cortisol, aumentam a atividade respiratória dos leucócitos e o número de neutrófilos, além de diminuir o número de monócitos (SOARES *et al.*, 2017). Em contrapartida, após o estresse e a inoculação bacteriana, dietas que incluíram farinhas de folhas impediram a elevação do cortisol plasmático, especialmente, a FFA que resultou em um aumento significativo na contagem total de leucócitos, em comparação com as outras dietas.

Os resultados apresentados na figura 10, exibem a quantidade de variações indicadas pelos primeiros setes componentes principais, entretanto, nota-se que o primeiro componente principal indica um pouco mais de 40% da variância, o segundo cerca de 20% de variação, e os componentes subsequentes indicam quantidades progressivamente menores de variância.

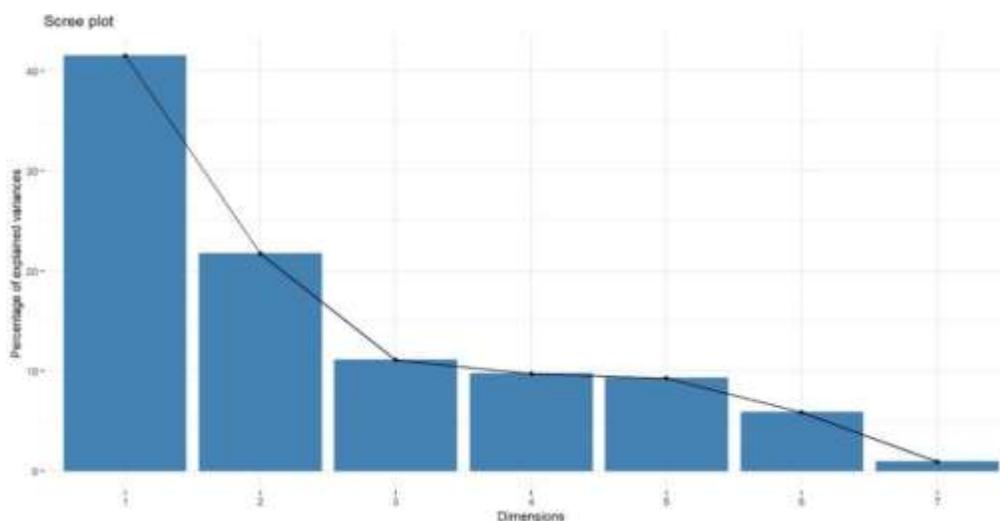


Figura 18. Variação na porcentagem dos componentes bioquímicos do sangue de juvenis de pacu submetidos ao desafio com bactéria após alimentação de 45 dias com diferentes tipos de dietas.

Na Figura 18, os resultados obtidos no cluster plot, indicam que a Dimensão1 é capaz de explicar 98,1% da variância total dos dados, enquanto, a Dimensão 2 explica 1,3% apenas. Isso significa que a maior parte da variação nos dados pode ser explicada pela dimensão 1.

Os clusters (Figura 19) são agrupados em quatro clusters distintos (1 – comercial; 2 – 32% FFO; 3 – Controle e 4 – 6% FFA), o que representa que os grupos observados são de características semelhantes, principalmente, 1 e o 4, que apresentam uma interação grande, entretanto, o 3 interage com os quatros clusters. Todavia, o 2 não demonstra uma interação com o 1 e 4, assim, está análise demonstra como as observações foram agrupadas com base nos dois primeiros componentes principais (Figura 18).

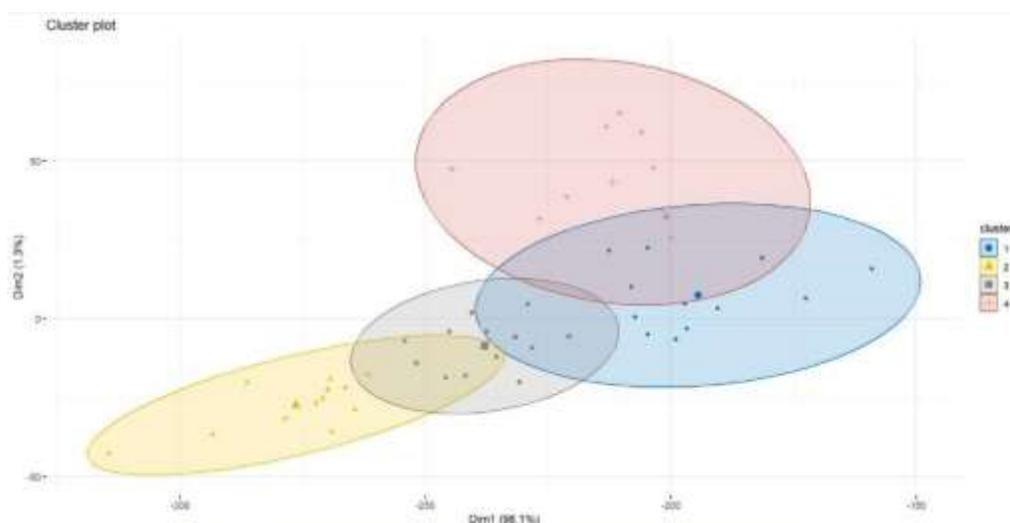


Figura 19. Distribuição dos resultados em duas dimensões principais demonstrando a dispersão entre os diferentes clusters identificados. Cada ponto no gráfico representa uma observação, e a cor e o formato dos pontos indicam qual cluster (1 – comercial; 2 – 32% FFO; 3 – Controle e 4 – 6% FFA) a observação.

Segundo os estudos realizados por ASSIS & URBINATI (2020), a utilização de plantas como aditivos em dietas apresenta melhoria na imunidade inata, demonstrando que seu uso em forma de extratos na suplementação das dietas para peixes pode proporcionar uma redução a resposta do estresse.

8.4 CONCLUSÕES

Os pacus alimentados com 6% FFA e 32% FFO, apresentaram coloração corporal mais intensa, principalmente, na coloração amarela. Para ambos o ensaio a taxa de sobrevivência foi superior quando comparada com as dietas comercial e controle.

Para os juvenis de pacu, as dietas com 6% FFA e 32% FFO, proporcionaram uma sobrevivência de 100%, demonstrando sua eficácia na modulação da resposta ao desafio bacteriano com *A. hydrophila*. No entanto, a dieta com 32% FFO apresentou um desempenho superior para a maioria dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue, indicando sua capacidade de reduzir o estresse fisiológico dos animais e proporcionando um aumento na imunidade dos peixes.

REFERÊNCIAS

ALMARRI, S.H.; KHALIL, A.A.; MANSOUR, A.T.; EL-HOUSEINY, W. Antioxidant, Immunostimulant, and Growth-Promoting Effects of Dietary *Annona squamosa* Leaf Extract on Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, and Its Tolerance to Thermal Stress and *Aeromonas sobria* Infection. **Animals**, v. 13, p. 746, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13040746>

ASSIS, R. W. S.; URBINATI, E.C.; Physiological activity of Aloe vera in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) inoculated with *Aeromonas hydrophila*. **Fish Physiol Biochem**, v.46, p.1421-1430, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00800-0>

BARTON, B. A. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. **North American Journal of Aquaculture**, v. 62, n. 1, p. 12-18, 2000.

BATIHA, G.E.S.; AL-SNAFI, A.E.; THUWAINI, M.M.; TEIBO, J.O.; SHAHEEN, H.M.; AKOMOLAFE, A.P.; TEIBO, T.K.A.; AL-KURAIKY, H.M.; AL-GARBEEB, A.; I.; ALEXIOU, A.; PAPADAKIS, M. *Morus alba*: a comprehensive phytochemical and pharmacological review. **Naunyn-Schmoedeberg's Archives of Pharmacology**, v.396, p.1399-1413, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02434-4>

BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J.E.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, v. 63, n. 3, p. 281 –284, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0103-90162006000300011>

CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v.8, n. 7, p. 1137–1144, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>

CAMUS, A.C.; DURBOROW, R.M.; HEMSTREET, W.G.; THUNE, R.L.; HAWKE, J.P. *Aeromonas* bacterial infections -motile aeromonad septicemia, in: Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication 478. **Southern Regional Aquaculture Center**, Stoneville, p. 1-4, 1998.

CONTE, F.S. Stress and the welfare of cultured fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, n. 3, p. 205-223, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.003>

CRUMLISH, M.; THANH, P.C.; KOESLING, J.; TUNG, V.T.; GRAVNINGEN, K. Experimental challenge studies in Vietnamese catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage), exposed to *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*, (Newman 1993). **The Journal of Fish Disease**, v. 33, n. 9, p. 717–722, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01173>

CUNHA, M.C.D.S., COSTA, A.C.V., BOOR, M.A.V., & COSTA, F.N. Características microbiológicas e físico-químicas da água utilizada para a espécie Tambaqui *Colossoma macropomum*, no Estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 18, p. 430-438, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402017000300003>

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008001300002>

FU, Y.; ZHANG, Q.; XU, D.-H.; XIA, H.; CAI, X.X.; WANG, B.; LIANG, J. Parasitocidal effects of *Morus alba* root bark extracts against *Ichthyophthirius multifiliis* infecting grass carp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.108, p.129-136, 2014. DOI: [10.3354/dao02708](https://doi.org/10.3354/dao02708)

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C. Modern trends in *Aeromonas hydrophila* disease management with fish. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 13, n. 4, p. 281-320, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/10641260500320845>

HOUSTON, A. H. Review: are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health? **Transactions of the American Fisheries Society**, v.126, n. 6, p. 879-894, 1997.

IGBINOSA, I.H.; IGUMBOR, E.U.; AGHDASI, F.; TOM, M.; & OKOH, A.I. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. **Scientific World Journal**, p. 625023, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1100/2012/625023>

ITUASSU, D.R.; SANTOS, G.R.S.; ROUBACH, R.; PEREIRA-FILHO, M. Desenvolvimento de tambaqui submetido a períodos de privação alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.12, p.1199- 1203, dez. 2004.

JANSEN, P.A.; KRISTOFFERSEN, A.B.; VILJUGREIN, H.; JIMENEZ, D.; ALDRIN, M.; STIEN, A. Sea lice as a density-dependent constraint to salmonid farming. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1737, p. 2330 –2338, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0084>

LEUNG, T.L.F.; BATES, A.E. More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: Implications for food security. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 1, p. 215 –222, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2644.12017>

LIU, Q.; LI, X.; LI, C.; ZHENG, Y.; PENG, G. 1-Deoxynojirimycin Alleviates Insulin Resistance via Activation of Insulin Signaling PI3K/AKT Pathway in Skeletal Muscle of *db/db* Mice. **Molecules**, v. 20, n. 12, p.21700-21714, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules201219794>

LU, G.B.; REN, C.J.; CUI, W.Z.; WANG, Y.W.; GAO, H.J.; MU, Z.M. Improvement effect of polysaccharide MLP11 from mulberry leaves on hepatic insulin resistance in Diabetic model Rat. **Sci. Seric.**, v.38, p.116-121, 2012.

MACEDO, M.C.C.; SILVA, V.D.M.; SERAFIM, M.S.M.; DA VEIGA CORREIA, V.T.; PEREIRA, D.T.V.; AMANTE, P.R.; DA SILVA, A.S.J.; DE OLIVEIRA PRATA MENDONÇA, H.; AUGUSTI, R.; DE PAULA, A.C.C.F.F.; MELO, J.O.F.; PIRES, C.V.; FANTE, C.A. Elaboration and Characterization of *Pereskia aculeata* Miller Extracts Obtained from Multiple Ultrasound-Assisted Extraction Conditions. **Metabolites**, v. 13, p. 691, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo13060691>

MASTROCHIRICO-FILHO, V.A.; ARIEDE, R.B.; FREITAS, M.V.; LIRA, L.V.G.; AGUDELO, J.F.G.; PILARSKI, F.; REIS NETO, R.V.; YÁÑEZ, J.M.; HASHIMOTO, D.T. Genetic parameters for resistance to *Aeromonas hydrophila* in the neotropical fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734442>

MEZALIRA, T. S.; SANTOS, G. R.; OLIVEIRA, L. P. de; JACOMASSI, E.; FERREIRA, R. G.; BONDEZAN, M. A. D.; MATUSAIKI, C. de C.; DORNELES, I. C.; MARTINS, K. N.; BARBOSA, M. P. da S. B.; MELO, M. E. da S.; OTUTUMI, L. K. A problemática da resistência aos antimicrobianos na avicultura e a busca por produtos alternativos como o extrato de *Pereskia aculeata* Mill. **Seven Editora**, [S. l.], 2023. Disponível em: <https://sevenpublicacoes.com.br/editora/article/view/2184>. Acesso em: 2 agosto. 2024.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211–268, 1999.

MONTEIRO, S.H.; ANDRADE, G.C.R.M.; GARCIA, F.; PILARSKI, F. Antibiotic residues and resistant bacteria in aquaculture. **The Pharmaceutical and Chemical Journal**, v. 5, n. 4, p. 127-147, 2018.

MU, Y.; DING, F.; CUI, P.; AO, J.; HU, S.; CHEN, X. Transcriptome and expression profiling analysis revealed changes of multiple signaling pathways involved in immunity in the large yellow croaker during *Aeromonas hydrophila* infection. **BMC Genomics**, v. 11, p.506, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-506>

NIELSEN, M. E.; HØI, L.; SCHMIDT, A.S.; QIAN, D.; SHIMADA, T.; SHEN, J. Y.; LARSEN, J.L. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China?. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 46, p. 23–29, 2001. DOI: <https://doi.org/10.3354/dao046023>

NURJANNAH, R.D.D.; PRAYITNO, S.B.; LUSIASTUTI, A.M. Pengaruh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*) terhadap profil darah dan kelulushidupan ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hidrophila*. **Journal of Aquaculture Management and Technology**, v. 2, n. 4, p. 72-83, 2013.

PEIXEBR. **Anuário Brasileiro da Piscicultura Peixes BR 2024**. Associação Brasileira de Piscicultura, 2024.

POOBALANE, S.; THOMPSON, K. D.; ARDÓ, L.; VERJAN, N.; HAN, H.; JENEY, G.; HIRONO, I.; AOKI, T.; ADAMS, A. Production and efficacy of an *Aeromonas*

hydrophila recombinant S-layer protein vaccine for fish. **Vaccine**, v. 28, p. 3540–3547, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.011>

RAFIEE, G.; SAAD, C. R. Nutrient cycle and sludge production during different stages of red tilapia (*Oreochromis* sp.) growth in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 244, n. 1-4, p. 109-118, 2005.

RIBEIRO, S.C.; CASTELO, A.S.; SILVA, B.M.P.; CUNHA, A.S.; PROIETTI JÚNIOR, A.A.; OBA-YOSHIOKA, E.T. Hematological responses of tambaqui *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae) fed with diets supplemented with essential oil from *Mentha piperita* (Lamiaceae) and challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Acta Amazonica**, v. 46, n.1, p. 99-106, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201501284>

ROBERTSON, L., THOMAS, P., ARNOLD, C. R., TRANT, J. M. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 49, n. 1, p. 1-12, 1987.

SHEN, H. M., PENG, X. H., LIN, S. M., CHEN, Y. J., & HUANG, X. Z. Regulation of fermented mulberry leaves on serum lipid and blood glucose levels of hyperlipidemia tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chinese Journal of Animal Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 1250-1256, 2016.

SILVA, A.S.E.; LIMA, J.T.A.X.; BLANCO, B.S. Hematologia em peixes (revisão bibliográfica). **Revista Centauro**, v.3, n.1, p.24-32, 2012.

SILVA, N.F.N.; SILVA, S.H.; BARON, D.; NEVES, I.C.O.; CASANOVA, F. *Pereskia aculeata* Miller as a novel food source: A review. **Foods**, v.12, n.1, p. 2092, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12112092>

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. **Limonologia aplicada á aquicultura**. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

SOARES, M.P.; OLIVEIRA, F.C.; CARDOSO, I.L.; URBINATI, E.C.; MELDAU DE CAMPOS, C.; HISANO, H. Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology**, 2017. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.11.046

SOPINKA, N. M.; DONALDSON, M.R.; O'CONNOR, C. M.; SUSKI, C. D.; COOKE, S. J. Stress indicators in fish. In *Biology of stress in fish*. **Fish Physiology** (SCHRECK, C. B.; TORT, L.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J.; eds), v. 11, p. 407-460, 2016.

TAKAHASHI, J.D.B; MONTASSIER, H.J.; TAKAHASHI, L.S.; URBINATI, E.C. Levamisole promotes an adjuvant effect on the immunity of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) when immunized with *Aeromonas hydrophila*, even when provided in the diet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 211, p.164-173, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.11.008>

TAKEITI, C. Y., ANTONIO, G. C., MOTTA, E. M., COLLARES-QUEIROZ, F. P., & PARK, K. J. Nutritive evaluation of non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, n. 1, (Suppl.1), p. 148-160, 2009.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, 35, p. 1366-1375, 2011.

TORT, L.; KOUMOUNDOUROS, G. Stress in farmed fish. Its consequences in health and performance. **Recent Advances in Aquaculture Research**; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, p. 55–83, 2010.

URBINATI, E.C., GONÇALVEZ, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), in: BALDISSEROTTO, B., GOMES, L.C. (Eds.), **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. UFSM, Santa Maria, pp. 225 -246, 2005.

URBINATI, E.C.; GONÇALVEZ, F.D.; TAKAHASHI, I.S. Pacu (*piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B.; DE CARVALHO GOMES, I. **Espécies nativas para piscicultura no brasil. 2ª edição revisada e ampliada**. Editora UFSM, Santa Maria, p. 205–244, 2013.

VALLADÃO, G.M.; GALLANI, S.U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, p. 351-369, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12164>

VOLKOFF, H.; SABIONI, R.E.; COUTINHO, L.L.; CYRINO, J.E.P. Appetite regulating factors in pacu (*Piaractus mesopotamicus*): Tissue distribution and effects of food quantity and quality on gene expression. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A. 203, p. 241 -254, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.09.022>

XV CHENG, Z.; HE, G.L.; WANG, X.L.; SHUN, H.; CHEN, Y.J.; LIN, S.M. Mulberry leaf powder ameliorate high starch-induced hepatic oxidative stress and inflammation in fish model. **Animal Feed Science and Technology**, v. 278, 115012, 2021. DOI: [10.1016/j.anifeedsci.2021.115012](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115012)

9 CAPÍTULO V

**EFEITO NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE DIFERENTES DIETAS APÓS
DESAFIO COM *Aeromonas hydrophila* PARA TILÁPIA DO NILO**

9.1 INTRODUÇÃO

O setor da aquicultura no Brasil vem crescendo e a tilápia se destaca com uma das principais espécies cultivadas, mostrando sua importância no cenário do agronegócio brasileiro (FLORES, 2020). A produção de tilápia no Brasil tem uma importância econômica significativa e seu cultivo é um empreendimento lucrativo (NOSKOSKI *et al.*, 2023; SIQUEIRA *et al.*, 2021). Além disso, a demanda do consumo de filés de tilápia tem sido promissor devido a preferência dos consumidores por filés frescos em relação aos congelados (FLORES, 2020).

A *A. hydrophila* é uma bactéria gram-negativa que causa grandes prejuízos na piscicultura global ((MU *et al.*, 2010; CRUMLISH *et al.*, 2010; HARIKRISHNAN & BALASUNDARAM, 2005; CAMUS *et al.*, 1998). e pode causar mortalidades de 20-30%. No Brasil devido à falta de controle sanitário (MU *et al.*, 2010; MASTROCHIRICO-FILHO *et al.*, 2019), e também em outros países, a *A. hydrophila* é identificada como grande ameaça devido a ocorrência de altas mortalidades de peixes e perdas econômicas (ELSAYED *et al.*, 2024). A *A. hydrophila* está associada a problemas como síndrome ulcerativa epizootica (NILENSEN *et al.*, 2001) e natação errática (CONTE, 2004), além de, representar riscos à saúde humana, causando gastroenterite (IGBINOSA *et al.*, 2012)

No Brasil, o tratamento das doenças bacterianas nas pisciculturas, geralmente, envolve o uso de antibióticos como oxitetraciclina e florfenicol (MONTEIRO *et al.*, 2018). O uso excessivo desses antibióticos pode poluir o ambiente aquático e deixar resíduos na carne, além disso, contribuem para o surgimento de cepas resistentes (CABELLO, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2018). Apesar da vacinação contra *A. hydrophila* ter demonstrado altas taxas de sobrevivência, essa prática é considerada demorada, trabalhosa e estressante para os peixes (POOBALANE *et al.*, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Vários estudos investigaram o uso de diferentes folhas em dietas para tilápia do Nilo a fim de aumentar sua imunidade e resistência contra desafios bacterianos (PARICHAT & PONGSAK, 2024).

Um exemplo é a utilização da amoreira (*Morus alba*) que tem demonstrado um grande potencial antibacterianas devido aos seus compostos fitoquímicos (BATILHA *et al.*, 2023), e segundo FU *et al.*, (2014), foi verificado seu efeito positivo

frente a bactérias patogênicas e antiprotozoários em peixes. Esses resultados comprovam que a amoreira é um grande recurso natural para o combate de patógenos emergentes em pisciculturas.

A ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*) também é reconhecida pelo seu potencial antimicrobiano na piscicultura (MACEDO *et al.*, 2023). Em estudos realizados por MEZALIRA *et al.*, (2023), verificou-se a sua eficácia contra bactérias gram-negativas. A ora-pro-nóbis é uma planta com excelentes propriedades para ser utilizada nos desafios bacterianos da piscicultura.

Objetivo deste estudo foi examinar a glicose, os sinais clínicos e a taxa de sobrevivência de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) alimentadas com diferentes tipos de dietas submetida ao desafio com o patógeno *A. hydrophila*, e também ao estresse causado pela troca de ambiente após a inoculação. As dietas foram avaliadas para identificar a mais eficaz entre a dieta comercial; a dieta de controle (livre de ingredientes de origem animal); e a dieta com inclusão de 6% de FFA e 32% de FFO.

9.2 MATERIAL E MÉTODOS

A manipulação da cepa da bactéria *A. hydrophila* e o registro na CEUA estão descritos no capítulo anterior, item 7.2. O experimento teve duração de 42 dias, e foram utilizados 60 juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), com peso médio de 41,64 ± 5,60g. Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo CEUA da EMBRAPA Meio Ambiente, conforme protocolo 003/2023 (Anexo III).

O delineamento experimental foi inteiramente atualizado, com 4 tratamentos (comercial; controle; FFO e FFA), onde cada peixe foi considerado como uma repetição. O sistema de recirculação de água utilizado está descrito no Capítulo III, item 7.2.2.

Após a inoculação da solução (cepa da bactéria *A. hydrophila* + solução salina 0,9%), os peixes foram distribuídos de acordo com os seus respectivos tratamentos da seguinte forma: Linha 1: o primeiro e segundo aquário correspondiam ao tanque 1; o terceiro e o quarto aquário ao tanque 2; linha 2: o mesmo padrão foi seguido, porém, correspondendo aos tanques 3 e 4. A distribuição

dos peixes nos aquários definida por sorteio. A estrutura experimental utilizada está descrita no Capítulo II, item 6.5.2.

A formulação e a fabricação das dietas controle, FFA e FFO seguiram a metodologia descrita no Capítulo II, item 6.5.3. Além disso, foi utilizada uma ração comercial comprada em uma loja agropecuária localizada na cidade de Jaguariúna/SP. A formulação das dietas experimentais está descrita no item 7.2.3 deste capítulo.

O manejo de distribuição da ração e o arraçoamento adotados foram conduzidos conforme mencionado no Capítulo II, item 6.5.4, com a diferença de que a sifonagem foi realizada a cada três dias. Os procedimentos de monitoramento da qualidade da água seguiram o método descrito no Capítulo II, item 6.5.5. O preparo da bactéria para inoculação e o procedimento de inoculação estão detalhados no capítulo III, item 7.2.6. A inoculação foi realizada por meio de injeção na região intraperitoneal com o uso de uma seringa (Figura 15).



Figura 20. Espécime de juvenil de tilápia do Nilo recebendo a injeção com inoculação da solução (cepa TR3 + salina 0,9%) na região intraperitoneal. **Fonte:** Autoria própria: Dias, (2024).

A avaliação do experimento foi realizada exclusivamente com base nos critérios de sobrevivência dos animais.

9.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros utilizados para o monitoramento da qualidade de água foram os mesmos do ensaio com pacu, uma vez que, os ensaios foram realizados simultaneamente, embora, em tanques-redes diferentes. Os dados resultados obtidos estão apresentados nas figuras 13 e 14 no capítulo anterior, item 8.3.

Os seguintes parâmetros físico-químicos de qualidade da água, temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade permaneceram dentro dos limites de conforto térmico e bem-estar animal para ambas as espécies (ZENI *et al.*, 2016; KUBITZA, 2011; KUBITZA 2000). Apesar de um aumento na condutividade não foram observadas alterações no comportamento dos peixes. Provavelmente, o aumento da condutividade pode estar associado tanto às trocas de água, quanto ao acúmulo de íons provenientes de resíduos de ração e excretas dos peixes (RAFIEE & SAAD, 2005; ITUASSU *et al.*, 2004). No entanto, a tilápia é uma espécie mais resistente em relação a outras espécies de cultivo.

As concentrações de NO_2^- , NO_3^- e NH_3 apesar de terem apresentado alguns picos no início do ensaio, não chegaram a afetar o desempenho dos animais, permanecendo, estáveis e dentro da faixa de conforto para a tilápia (SIPAÚBA-TAVARES, 1995). . Esse procedimento foi feito até o biofiltro atingir a maturação adequada, permitindo, assim o pleno desenvolvimento das bactérias nitrificantes e, conseqüentemente, a normalização dos níveis desses compostos (BOYD *et al.*, 1998)

Após a exposição ao desafio bacteriano com a *A. hydrophila*, em uma concentração de $2,04 \times 10^7$ UFC/ml⁻¹, observou-se mortalidades em todos os tratamentos. No entanto, os grupos alimentados com FFA e FFO mostraram uma sobrevivência significativamente maior em comparação aos grupos alimentados com a dieta comercial e o grupo controle, respectivamente de 66,7%, 40%, 13,3% e 26,7%. O estresse ao qual os peixes foram submetidos, pode ter influenciado a sobrevivência, pois foram submetidos a dois estresses simultâneos, quais sejam, a

inoculação e a mudança de ambiente, favorecendo a queda na imunidade dos animais, e a proliferação das bactérias nos seus organismos.

Estudos com extrato da folha de amoreira comparados com 10% FFA nas dietas, evidenciaram melhor efeito do extrato no desempenho da tilápia, e um aumento significativo nas atividades antioxidantes e fosfatase ácida no soro (TANG *et al.*, 2021). Esta atividade é um bioindicador relacionado com atividade enzimática de peixes (NICHOLSON & LAM, 2005; VIARENGO & CANESI, 2003), além do aumento das expressões de citocinas imunológicas (TANG *et al.*, 2021).

O extrato da folha de amoreira apresenta maiores teores de dois componentes bioativos principais, os polissacarídeos e os polifenóis (TANG *et al.*, 2021). Os polissacarídeos desempenham várias atividades biológicas como, por exemplo, antidiabética, antitumorais, anti-inflamatórias, imunoestimulantes e antioxidantes (HE *et al.*, 2018). E os polifenóis exibem capacidades de modular o sistema imunológico em situações de inflamações crônicas, além de, possuírem ação antioxidante e anti-inflamatória (OLIVEIRO *et al.*, 2018).

A utilização do extrato da folha de ora-pro-nóbis está relacionada as propriedades anti-inflamatórias (NOGUEIRA SILVA *et al.*, 2023). Em estudos realizados por PINTO *et al.*, (2015), verificou-se sua eficácia em testes com vários agentes tóxicos apresentando uma redução significativa dos processos inflamatórios. Esse efeito analgésico foi atribuído aos compostos presentes no extrato da ora-pro-nóbis como os alcaloides e à quercetina. Estudos com o extrato da folha da fruta-do-conde (*Annona squamosa*), demonstraram uma sobrevivência maior das tilápias do Nilo devido a presença de uma variedade de compostos fitoquímicos como alcaloides, flavonoides, fenólicos, os quais, influenciam o aumento da imunidade dos animais (KALYANI *et al.*, 2019). Os compostos fenólicos, são elementos-chaves nos mecanismos de ação antimicrobiana, pois interferem nos processos metabólicos das bactérias (CHANDRA *et al.*, 2017).

O uso da folha fermentada de acácia-branca (*Moringa oleifera*) incluída na ração de tilápias do Nilo, e submetidas ao desafio com *A. hydrophila* apresentou uma maior taxa de sobrevivência, demonstrando uma melhora na resistência dos peixes contra infecções bacterianas, decorrentes da atividade imunoestimulante (NASSAR *et al.*, 2024). Resultados obtidos por RANZANI-PAIVA *et al.*, (2024), utilizando a suplementação de algas marinhas nas dietas demonstraram melhora na

taxa de sobrevivência de tilápias submetidas a desafios com *A. hydrophila*. Nesse estudo foi confirmada a preservação do fígado dos animais, fato fundamental para regular o sistema imunológico inato durante respostas a infecções e inflamações.

Portanto, as melhorias na taxa de sobrevivência criam um ambiente favorável para que os peixes resistam e superem surtos de infecções causadas por agentes etiológicos oportunistas (LIN *et al.*, 2019; CASTRO *et al.*, 2014; BELO *et al.*, 2014). Além disso, a suplementação nas dietas tem demonstrado potencial como imunostimulantes, contribuindo para o aumento da taxa de sobrevivência e aprimorando a imunidade inespecífica dos animais, proporcionando, assim uma proteção mais eficaz (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2024).

9.4 CONCLUSÕES

No caso da tilápia, apesar de todos os tratamentos apresentarem mortalidade após o desafio bacteriano com *A. hydrophila*, os tratamentos com a inclusão de FFA e FFO na dieta resultaram em melhor desempenho. No entanto, a dieta com 32% FFO proporcionou os melhores resultados de sobrevivência. Portanto, recomenda-se o uso da inclusão de 32% FFO, tanto para pacu quanto para tilápia do Nilo, por apresentarem melhores resultados com relação a resposta imunológica e a sobrevivência ao desafio bacteriano, superando as dietas comerciais e controle.

A suplementação de dietas com ingredientes à base de folhas, utilizando 6% FFA e 32% FFO, mostrou-se promissora para melhorar a saúde do pacu e da tilápia do Nilo, principalmente, em situações de contaminação por patógenos bacterianos.

REFERÊNCIAS

- BATIHA, G.E.S.; AL-SNAFI, A.E.; THUWAINI, M.M.; TEIBO, J.O.; SHAHEEN, H.M.; AKOMOLAFE, A.P.; TEIBO, T.K.A.; AL-KURAIISKY, H.M.; AL-GARBEEB, A.; I.; ALEXIOU, A.; PAPADAKIS, M. *Morus alba*: a comprehensive phytochemical and pharmacological review. **Naunyn-Schmoedeberg's Archives of Pharmacology**, v.396, p.1399-1413, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02434-4>
- BELO, M.A.A.; MORAES, F.R.; YOSHIDA, L.; PRADO, E.J.R.; MORAES, J.R.E.; SOARES, V.E.; SILVA, M.G. Deleterious effects of low level of vitamin E and high stocking density on the hematology response of pacus, during chronic inflammatory reaction. **Aquaculture**, v. 422-423, p. 124-128, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.013>
- BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. **Ponds aquaculture water quality management**. Springer, 700 pp., 1998.
- CABELLO, F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v.8, n. 7, p. 1137–1144, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>
- CAMUS, A.C.; DURBOROW, R.M.; HEMSTREET, W.G.; THUNE, R.L.; HAWKE, J.P. Aeromonas bacterial infections -motile aeromonad septicemia, in: Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication 478. **Southern Regional Aquaculture Center**, Stoneville, p. 1-4, 1998.
- CASTRO, M.P.; CLAUDIANO, G.S.; PETRILLO, T.R.; SHIMADA, M.T.; BELO, M.A., MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; MORAES, J.R.; MANRIQUE, G.W.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; DIAS, D.C.; CAVALCANTE, R.B.; TELLI, G.; OSHIRO, E.; ISHIKAWA, C.M.; PETESSE, M.L.; FERNANDEZ-ALARCON, M.F.; NATORI, M.M.; MORIÑIGO, M.A.; TAPIA, S.; HAMED, S.B.; TACHIBANA, L. Prebiotic, probiotic an marine alga e supplementation in juvenile tilapia diet. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 50, n.e819, p.1-16, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.047>
- CHANDRA, H.; BISHNOI, P.; YADAV, A.; PATNI, B.; MISHRA, A.P.; NAUTIYAL, A.R. Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials - A review. **Plants**, v.6, n.16, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants6020016>
- CONTE, F.S. Stress and the welfare of cultured fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, n. 3, p. 205-223, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.003>
- CRUMLISH, M.; THANH, P.C.; KOESLING, J.; TUNG, V.T.; GRAVNINGEN, K. Experimental challenge studies in Vietnamese catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage), exposed to *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*, (Newman 1993). **The Journal of Fish Disease**, v. 33, n. 9, p. 717–722, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01173>

ELSAYED, N.S.; FAHMY, K.N.E.; ABOU-OKADA, M.; ABDELBAKY, A.A.; ELTAHAN, A.A.; EISSA, A.E. Major Bacterial Challenges Facing Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Egyptian Fish Hatcheries. **Journal of Applied Veterinary Sciences**, v. 9, n. 2, p. 67-78, 2024. DOI: 10.21608/JAVS.2024.259686.1304

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 8-14, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008001300002>

FLORES, R.M.V. Economic evaluation of tilapia and tambaqui production, consumption and supply chain in Brazil. **Purdue University Graduate School. Thesis**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.25394/PGS.12043212.v1>

FU, Y.; ZHANG, Q.; XU, D.-H.; XIA, H.; CAI, X.X.; WANG, B.; LIANG, J. Parasiticidal effects of *Morus alba* root bark extracts against *Ichthyophthirius multifiliis* infecting grass carp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.108, p.129-136, 2014. DOI: 10.3354/dao02708

HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C. Modern trends in *Aeromonas hydrophila* disease management with fish. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 13, n. 4, p. 281-320, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/10641260500320845>

HE, X.; FANG, J.; RUAN, Y.; WANG, X.; SUN, Y.; WU, N.; ZHAO, Z.; CHANG, Y.; NING, N.; GUO, H.; HUANG, L. Structures, bioactivities and future prospective of polysaccharides from *Morus alba* (white mulberry): A review. **Food Chemistry**, 245: 899-910, 2018.

IGBINOSA, I.H.; IGUMBOR, E.U.; AGHDASI, F.; TOM, M.; & OKOH, A.I. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. **Scientific World Journal**, p. 625023, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1100/2012/625023>

ITUASSU, D.R.; SANTOS, G.R.S.; ROUBACH, R.; PEREIRA-FILHO, M. Desenvolvimento de tambaqui submetido a períodos de privação alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.12, p.1199- 1203, dez. 2004.

KALYANI, R.L.; VIJAYKUMAR, P.; PAMMI, S.; RAJKUMAR, M.; SWAMY, P.; MURTHY, K. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Annona squamosa* leaf extract with synergistic antibacterial activity. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, p. 1036–1044, 2019. DOI: 10.36468/pharmaceutical-sciences.601

KUBITZA, F. **Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Panorama da Aquicultura, 2000.

KUBITZA, F. **Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial**. 2.ed. rev. ampl. Jundiaí: Acqua Supre Com. Suprim. Aquicultura, 316p., 2011.

LIN, Y.S.; SAPUTRAB, F.; CHEN, Y.O.; HU, S.Y. Dietary administration of *Bacillus amyloliquefaciens* R8 reduces hepatic oxidative stress and enhances nutrient metabolism and immunity against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus*

agalactiae in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 86, p. 410-419, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.047>

MACEDO, M.C.C.; SILVA, V.D.M.; SERAFIM, M.S.M.; DA VEIGA CORREIA, V.T.; PEREIRA, D.T.V.; AMANTE, P.R.; DA SILVA, A.S.J.; DE OLIVEIRA PRATA MENDONÇA, H.; AUGUSTI, R.; DE PAULA, A.C.C.F.F.; MELO, J.O.F.; PIRES, C.V.; FANTE, C.A. Elaboration and Characterization of *Pereskia aculeata* Miller Extracts Obtained from Multiple Ultrasound-Assisted Extraction Conditions. **Metabolites**, v. 13, p. 691, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo13060691>

MASTROCHIRICO-FILHO, V.A.; ARIEDE, R.B.; FREITAS, M.V.; LIRA, L.V.G.; AGUDELO, J.F.G.; PILARSKI, F.; REIS NETO, R.V.; YÁÑEZ, J.M.; HASHIMOTO, D.T. Genetic parameters for resistance to *Aeromonas hydrophila* in the neotropical fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734442>

MEZALIRA, T. S.; SANTOS, G. R.; OLIVEIRA, L. P. de; JACOMASSI, E.; FERREIRA, R. G.; BONDEZAN, M. A. D.; MATUSAIKI, C. de C.; DORNELES, I. C.; MARTINS, K. N.; BARBOSA, M. P. da S. B.; MELO, M. E. da S.; OTUTUMI, L. K. A problemática da resistência aos antimicrobianos na avicultura e a busca por produtos alternativos como o extrato de *Pereskia aculeata* Mill. **Seven Editora**, [S. l.], 2023. Disponível em: <https://sevenpublicacoes.com.br/editora/article/view/2184>. Acesso em: 2 agosto. 2024.

MONTEIRO, S.H.; ANDRADE, G.C.R.M.; GARCIA, F.; PILARSKI, F. Antibiotic residues and resistant bacteria in aquaculture. **The Pharmaceutical and Chemical Journal**, v. 5, n. 4, p. 127-147, 2018.

MU, Y.; DING, F.; CUI, P.; AO, J.; HU, S.; CHEN, X. Transcriptome and expression profiling analysis revealed changes of multiple signaling pathways involved in immunity in the large yellow croaker during *Aeromonas hydrophila* infection. **BMC Genomics**, v. 11, p.506, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-506>

NASSAR, A.A.M.A.; GHARIB, A.A. E.-A.; ABDELGALIL, S.Y.; ABDALLAH, H.M.; ELMOWALID, G.A. Immunomodulatory, antioxidant, and growth-promoting activities of dietary fermented *Moringa oleifera* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with in-vivo protection against *Aeromonas hydrophila*. **BMC Veterinary Research**, 20:231, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04070-3>

NICHOLSON, S.; LAM, P.K.S. Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarker in the mytilid mussel *Perna viridis* (*Mytilidae*: Bivalvia). **Environment International**, v.31, p.121-132, 2005.

NIELSEN, M. E.; HØI, L.; SCHMIDT, A.S.; QIAN, D.; SHIMADA, T.; SHEN, J. Y.; LARSEN, J.L. Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China?. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 46, p. 23–29, 2001. DOI: <https://doi.org/10.3354/dao046023>

NOSKOSKI, L.E.C.; DURIGON, E.G.; SCHMIDT, M.R.; CHRISTOFARI, L.F.; LAZZARI, R.; & VAZ, R.Z. Analysis of zootechnical and economic indicators in carp and tilapia production: Análise dos indicadores zootécnicos e econômicos na produção de carpas e tilápia. **Concilium**, v. 23, n. 18, p. 507–521, 2023. DOI: <https://doi.org/10.53660/CLM-1973-23N42>

OLIVIERO, F.; SCANU, A.; ZAMUDIO-CUEVAS, Y.; PUNZI, L.; SPINELLA, P. Antiinflammatory effects of polyphenols in arthritis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 5, p.1653-1659, 2018.

PARICHAT, P.; PONGSAK, R. Effects of Azadirachta indica Leaf Aqueous Extract supplemented Fish Diets on Innate Immune Response and Disease Resistance of Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Research Journal of Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 1-8, 2024. DOI: [doi: https://doi.org/10.25303/1905rjbt01008](https://doi.org/10.25303/1905rjbt01008)

PINTO, N.D.C.C.; MACHADO, D.C.; DA SILVA, J.M.; CONEGUNDES, J.L.M.; GUALBERTO, A.C.M.; GAMEIRO, J.; MOREIRA CHEDIER, L.; CASTAÑON, M.C.M.N.; SCIO, E. *Pereskia aculeata* Miller Leaves Present in Vivo Topical Anti-Inflammatory Activity in Models of Acute and Chronic Dermatitis. **Journal of Ethnopharmacol**, v.173, p.330–337, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.07.032>

POOBALANE, S.; THOMPSON, K. D.; ARDÓ, L.; VERJAN, N.; HAN, H.; JENEY, G.; HIRONO, I.; AOKI, T.; ADAMS, A. Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish. **Vaccine**, v. 28, p. 3540–3547, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.011>

RAFIEE, G.; SAAD, C. R. Nutrient cycle and sludge production during different stages of red tilapia (*Oreochromis* sp.) growth in a recirculating aquaculture system. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 244, n. 1-4, p. 109- 118, 2005.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; DIAS, D.C.; CAVALCANTE, R.B.; TELLI, G.; OSHIRO, E.; ISHIKAWA, C.M.; PETESSE, M.L.; FERNANDEZ-ALARCON, M.F.; NATORI, M.M.; MORIÑIGO, M.A.; TAPIA, S.; HAME, S.B.; TACHIBANA, L. Prebiotic, probiotic and marine algae supplementation in juvenile tilapia diet. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 50, e819, 2024. DOI: <https://doi.org/10.20950/1678-2305/bip.2024.50.e819>

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: FUNEP, 1995.

SIQUEIRA, R. P.; MELLO, S. C. R. P.; JORGE, T. B. F.; SEIXAS FILHO, J. T.; PEREIRA, M. M. Economic viability of Nile tilapia production as a secondary activity in rural properties in the State of Rio de Janeiro. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. e38010212502, 2021. DOI: [10.33448/rsd-v10i2.12502](https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12502).

TANG, X.; FU, J.; GAO, Q.; LIU, G.; YE, J.; GUAN, W.; SHI, Y.; XU, M. Effects of mulberry (*Morus alba* L.) Leaf extracts on growth, immune response, and antioxidant functions in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Annals of Animal Science**, 2021. DOI: [10.2478/aoas-2021-0038](https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0038)

VIARENGO, A.; CANESI, L. Mussels as biological indicators of pollution. **Aquaculture**, v.94, p.225-243, 2003.

ZENI, T.O.; OSTRENSKY, A.; WESTPHAL, G.G.C. Respostas adaptativas de peixes a alterações ambientais de temperatura e de oxigênio dissolvido. **Archives of Veterinary Science**, v.21, 3, 2016.

10 CAPÍTULO VI

**TESTE AGUDO DE TOXICOLOGIA DA FARINHA DE FOLHAS DE
AMOREIRA E ORA-PRO-NÓBIS PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS**

10.1 INTRODUÇÃO

O crescimento do setor aquícola tem impulsionado a busca por ingredientes alternativos para compor as dietas, os quais, eventualmente podem gerar impactos significativos nos ecossistemas aquático. O acúmulo de resíduos das rações e os efluentes dos viveiros de produção de peixes podem contribuir para desequilíbrios ambientais e perda da biodiversidade, afetando, especialmente, os macroinvertebrados bentônicos (HENRY-SILVA & CAMARGO, 2008; MORENO & CALLISTO, 2006).

Diante deste cenário, o monitoramento dos ambientes aquáticos é necessário para avaliar sua extensão de poluição com o auxílio de bioindicadores ambientais. Os bioindicadores são eficazes para identificar e monitorar os impactos gerados nas comunidades biológicas, causados pelos efluentes ou substâncias contaminantes presentes na composição das rações (GOULART & CALLISTO, 2003).

Os estudos de ecotoxicologia, normalmente, abrangem diversas classes de organismos de diferentes níveis tróficos, os quais, permitem obter uma visão abrangente dos possíveis impactos que uma substância em análise pode gerar ao meio ambiente aquático (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). Os organismos aquáticos podem entrar em contato com substâncias químicas presentes na água, muitas vezes, originadas de resíduos de rações e efluentes dos viveiros de produção de peixes. Esses poluentes, quando não metabolizados ou eliminados, podem se acumular nos tecidos dos organismos, caracterizando o processo de bioacumulação. Esse acúmulo, por sua vez, pode ser transferido para níveis superiores da cadeia trófica, intensificando o fenômeno da biomagnificação (BAPTISTA et al., 2001).

A *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera), é um microcrustáceo de água doce amplamente utilizado em ensaios ecotoxicológicos devido à sua alta sensibilidade a diferentes tipos de substâncias contaminantes, facilidade de criação e manejo, ciclo de vida curto, e outras características favoráveis (BOWNIK, 2017; FERREIRA et al., 2008). Além disso, a *D. magna* atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática (KÜHL et al., 2022; ABNT, 2016).

O *Danio rerio*, conhecido como zebrafish, ou paulistinha, é uma espécie tropical oriunda da Índia e Paquistão, introduzida em várias partes do mundo (ABNT,

2011). Atuam como consumidores secundários na cadeia alimentar. Além, do seu DNA apresentar cerca de 70% similaridade ao do ser humano (ZHANG et al., 2003).

O ensaio de toxicidade aguda para *D. magna* utiliza o método de imobilização aguda, no qual, a toxicidade é avaliada com base na observação da imobilização dos organismos após 48h de exposição à substância testada (MAGGLIN et al., 2020). Esse método permite determinar concentração efetiva média (CE), ou seja, a concentração mediana que provoca a imobilização de 50% dos indivíduos (MIODUSKI, 2014). Em contraste, para peixes utiliza-se a CL₅₀, que é a concentração mediana responsável pela mortalidade de 50% dos indivíduos testados (MIODUSKI, 2014; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). Compreender a toxicidade de um ingrediente é fundamental para avaliar seu impacto temporário potencial sobre a comunidade aquática. Esse conhecimento também possibilita a definição de limites seguros para a preservação dos ecossistemas aquáticos (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006).

A *Morus alba*, conhecida como amoreira, é amplamente utilizada na medicina chinesa por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e hipoglicemiantes (PEREIRA et al., 2013). Estudos com o seu extrato demonstraram efeitos biológicos benéficos, atribuídos à presença de alcaloides (KIMURA et al., 2004), compostos fenólicos (HAVSTEEN, 2002), flavonoides, terpenos e taninos (PEREIRA et al., 2010). No entanto, até o momento, não foram realizados ensaios de toxicidade em ambientes aquáticos envolvendo a amoreira.

A *Pereskia aculeata*, conhecida como ora-pro-nóbis, é uma planta alimentícia não convencional (BOTREL et al., 2020). A ora-pro-nóbis apresentou toxicidade para larvas de *zophobas morio* (tenébrio gigante), em concentração de até 200 µg/mL (SILVA et al., 2024).

Com base nessas informações, este estudo visa determinar a CE₅₀ para *D. magna*, ainda não investigada. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar a concentração CE_{50-48h} e CL_{50-96h} para a *D. magna* e o *D. rerio* com o uso da farinha de folhas de amoreira e ora-pro-nóbis.

10.2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Ecotoxicologia e Aquicultura da Embrapa Meio Ambiente de Jaguariúna/SP, para os testes com *D. magna*, não houve necessidade de requerer a aprovação prévia do comitê de ética, conforme a legislação vigente, por se tratar de organismos invertebrados. No entanto, os testes com embrião de zebrafish necessitaram e aprovação previa de acordo como protocolo 003/2023 (Anexo III).

Foram testadas 10 concentrações (0; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 180; 324; 583,2 e 1049,7) para FFA e FFO. Foi utilizado o meio de cultura específico para *D. magna* (água reconstituída), conforme a metodologia descrita por JONSSON & MAIA (1999). O meio de cultura foi composto pelas seguintes soluções:

Solução 1: 14,6 g cloreto de cálcio dihidratado e 1,000 mL água de osmose reversa.

Solução 2: 0,37g cloreto de potássio, 7,4g sulfato de magnésio heptahidratado e 1,000 mL água de osmose reversa.

Solução A: 5,0g EDTA dissódico dihidratado; 1,991g sulfato ferroso, 5,72g ácido bórico, 0,721g cloreto de manganês tetrahidratado, 0,304g cloreto de estrôncio hexahidratado, 0,037g brometo de potássio, 0,109g molibdato de amônio tetrahidratado, 0,483 g sulfato de cobre pentahidratado, 0,020g cloreto de cobalto hexahidratado, 0,0065g iodeto de potássio, 0,00438g selenito de sódio e 1,000 mL água de osmose reversa.

Solução B: 0,122g silicato de sódio, 0,0273g nitrato de sódio, 0,0143g fosfato de potássio monobásico, 0,0184g fosfato de potássio dibásico e 1,000 mL de água osmose reversa.

Solução C (armazenada em geladeira): 0,075g tiamina, 0,00075g biotina e 1,000 mL água de osmose reversa.

Para preparar a solução foram usados 2,000 mL de água reconstituída. É necessário misturar 20 mL da solução 1, 20 mL da solução 2, 1,0 mL da solução A, 20 mL da solução B e 2,0 mL da solução C. O preparo do meio do embrião (E3M) seguiu a metodologia descrita por NORAZHAR et al., (2022), constituído de 15 mM cloreto de sódio, 0,5 mM cloreto de potássio, 1 mM cloreto de cálcio, 1 mM sulfato

de magnésio, 0,15 mM fosfato monopotássico, 0,05 mM fosfato de sódio, 0,7 mM bicarbonato de sódio, pH 7,0.

As concentrações foram obtidas por meio de diluições da FFA e FFO, partindo de 209,9mg de cada farinha, dissolvidas em um balão volumétrico de 200 mL contendo água reconstituída, seguida por novas diluições até a obtenção de todas as concentrações desejadas.

O bioensaio foi realizado para a FFA e FFO, seguindo as normas e recomendações estabelecidas pela OECD 202 – *Guidelines for the Testing of Chemicals*, (2004) para *D. magna* e para zebrafish foi OECD 236 (2013), utilizando embriões de zebrafish (3h pós-fertilização – hpf).

As concentrações foram utilizadas em placa de poliestireno contendo 12 poços por placa, sendo cada poço preenchido com 5mL de meio de cultivo (água reconstituída. Em cada poço, foram inseridos dois neonatos de *D. magna*, totalizando 24 organismos por concentração-teste. Para o teste com embrião foi colocado um indivíduo por poço em placas de poliestireno composta por 24 poços, totalizando 24 indivíduos, com cada poço preenchido com 2mL de E3M contendo as concentrações-testes.

A exposição a concentração para *D. magna* teve duração de 48h, onde foram mantidas a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Durante o ensaio, sob iluminação constante, não houve adição de alimentos, apenas, antes das coletas dos neonatos, assim como, não houve troca do meio de cultura. A exposição dos embriões foi feita durante um período de 96h, com um fotoperíodo de 14h de luz e 10h de escuridão, a $26 \pm 0,2^\circ\text{C}$, em uma incubadora BOD com fotoperíodo (SL-224, Solab®), seguindo a metodologia de VALLIM, (2019).

A avaliação dos neonatos de *D. magna* foi realizada com o auxílio de um equipamento de contagem de colônias. A imobilidade foi registrada visualmente a cada 24h durante um período total de 48h de exposição, através de uma ligeira agitação das placas e contabilização dos organismos imóveis em cada poço da placa (CASTRO *et al.*, 2018). Para os embriões e larvas foi realizada a cada 24h com um estereomicroscópio, registrando-se as ocorrências de malformações e/ou mortalidade (VALLIM, 2019).

A concentração média efetiva (CE_{50-48h}), e a concentração letal mediana (CL_{50-96h}) ou seja, aquela que atingiu 50% de imobilidade/morte nos organismos

durante o ensaio, foi determinada com o intervalo de confiança de 95% utilizando o módulo de Análise Probit, juntamente com a ANOVA one-way, no Software Statgraphics Centurion XVII, versão 1.17.04, (STATGRAPHICS19 CENTURION, 2022).

10.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esses organismos *D. magna* e *D. rerio* são amplamente utilizados em ensaios toxicológicos devido ao seu pequeno tamanho e alta sensibilidade a várias substâncias tóxicas (GUTIERREZ *et al.*, 2012).

A farinhas de FFA e FFO não apresentaram uma relação dose-efeito, o que é um fator essencial para a avaliação do risco ambiental das substâncias testadas (COSTA *et al.*, 2008). A ausência dessa relação é significativa porque permite determinar a toxicidade aguda das substâncias com base na imobilidade da *D. magna*, espécie selecionada como bioindicador ambiental. Esse parâmetro é utilizado devido ao pequeno tamanho dos organismos, o que dificulta a avaliação precisa de suas condições, como a confirmação de mortalidades (SHAW & CHADWICK, 1998).

Com isso, os resultados sugerem que o valor de CE_{50-48h} é superior a 100 mg/L⁻¹. De acordo com a classificação da USEPA - *United States Environmental Protection Agency* (2002), o resultado obtido classifica os materiais testados como “praticamente não tóxicos”. Apesar de uma imobilidade de 20-30% ter sido observada no controle (0,0 mg/L⁻¹), sendo que as maiores concentrações apresentaram um percentual de efeito inferior ao do controle, reforçando a baixa toxicidade. Nesse caso, a determinação da CE_{50-48h} não se faz necessária, uma vez que, o nível de toxicidade aguda é extremamente baixo e não foi observado neste ensaio (LU, 1996).

Estudos realizados por OLIVEIRA *et al.*, (2015) com o extrato de FFA em microcrustáceo *Artemia salina*, não detectaram toxicidade em nenhuma das concentrações testadas, sugerindo que esse extrato não representa riscos de toxicidade para o ambiente aquático. Por outro lado, estudos com a FFO envolvendo larva de tenébrio gigante (*Z. Morio*) demonstraram efeitos anti-inflamatórios significativos, isso indica que, embora a FFO possa não ser extremamente tóxica, ela pode influenciar os processos biológicos em organismos aquáticos (SILVA *et al.*,

2024). A presença de compostos fitoquímicos, como fitoesteróis e fenólicos na FFO, pode contribuir para essa atividade biológica, embora, os dados específicos sobre toxicidade aquática ainda sejam limitados (SOUZA *et al.*, 2016).

Além disso, estudos com extrato de folhas de mucura (*Petiveria alliacea*) da Amazônia peruana mostraram que tanto o extrato hexânico, quanto o etanólico e o aquoso, apresentaram, respectivamente, uma CE_{50} de 26,9; 230,6 e 657,9 mg/L^{-1} , (BRACHO-PÉREZ *et al.*, 2024). Os percentuais mínimos de imobilidade foram observados, principalmente, no extrato aquoso demonstrando a possibilidade de seu uso sustentável com impacto ambiental mínimo (BRACHO-PÉREZ *et al.*, 2024).

No Brasil, a realização de análises de toxicidade é exigida por regulamentações ambientais, embora, existam poucas normas específicas sobre a toxicidade de substâncias. As mais relevantes, são a Resolução CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente 357/05 e a Lei Federal de Recursos Hídricos 9.433/97, as quais, são as principais referências para controle de substâncias tóxicas no país (BRASIL, 1997; CONAMA, 2005).

De acordo com a Resolução do CONAMA 357/05, que trata da classificação dos corpos d'água e estabelece diretrizes ambientais, o Art. 7º define que “as substâncias, especificadas ou não na Resolução, não podem conferir às águas características que provoquem efeitos letais, alterações comportamentais, reprodutivas ou fisiológicas nos organismos aquáticos” (CONAMA, 2005). No capítulo IV, que aborda as condições e padrões para o lançamento de efluentes, o Art. 34º, §§ 1 e 2, estabelece que “os efluentes não devem causar ou ter potencial de causar efeitos tóxicos nos organismos aquáticos do corpo receptor (CONAMA, 2005).

Além destas regulamentações, existem órgãos responsáveis pelo desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade. A Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (ABNT, 2009), desempenha um papel fundamental na criação desses protocolos. No estado de São Paulo, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB (CETESB, 1994), também estabelece padrões para a realização de testes de toxicidade.

Os resultados deste estudo indicam que, de acordo com a OECD (2013) a FFA e FFO, podem ser classificadas como não tóxicas com base nos altos valores de CL_{50} : 562,25 mg/L^{-1} para FFA e 613,74 mg/L^{-1} para FFO. Esses valores

demonstram a relação entre as concentrações de FFA e FFO e o tempo como variável resposta (Gráfico 15: A e B), com intervalos de confiança adequados. No entanto, concentrações superiores a 100 mg/L^{-1} revelaram efeitos adversos agudos no desenvolvimento embrionário dos embriões, atribuídos à decantação das farinhas que comprometeu a oxigenação das larvas após a eclosão.

Estudos prévios, como o de NORAZHAR *et al.*, (2022) com o extrato de folhas de asas de borboleta (*Christia vesperilionis*), foi observada uma CL_{50} de $419,84 \text{ } \mu\text{g/mL}^{-1}$. No entanto, os autores relataram que altas concentrações do extrato resultaram em retardamento na eclosão, o que, por sua vez, afetou o crescimento dos embriões. Esse retardo na eclosão pode ser causado por anomalias no desenvolvimento embrionário, o que prejudica a capacidade de rompimento do cori3n (MURUGESU *et al.*, 2019).

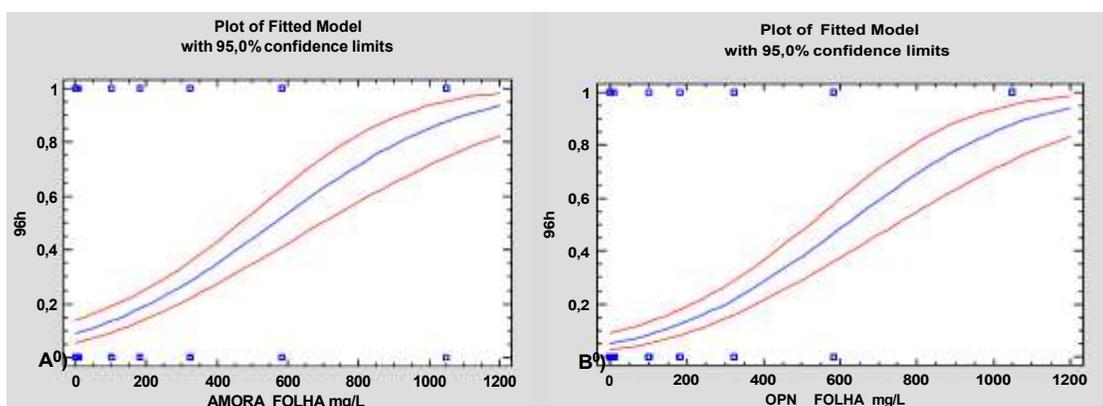


Figura 21. Regress3o linear ajustada com limites de confian3a de 95% para a rela33o entre a concentra33o de FFA (A) e FFO (B) e o desenvolvimento dos embri3es de zebrafish.

Embora, as plantas sejam uma fonte rica de compostos com propriedades farmacol3gicas, 3 importante considerar que os fitoqu3micos presentes podem atuar como toxinas em potencial para animais em altas concentra33es (CHANDRA *et al.*, 2012).

Os efeitos adversos observados nos embri3es expostos a elevadas concentra33es das farinhas das folhas de amoreira e OPN podem ser atribuídos 3 sua composi33o fitoqu3mica, como tamb3m, foi observado com o extrato de folhas de *C. vesperilionis* tamb3m (NORAZHAR *et al.*, 2022). A presen3a de altos n3veis de compostos polifen3licos, como flavonoides e fen3licos, foi identificada (NORAZHAR *et al.*, 2021).

Pesquisas recentes destacam que, embora, os compostos polifenólicos sejam conhecidos por seus benefícios farmacológicas, indicam que a ingestão de grandes quantidades de alimentos ricos nestes compostos pode desencadear efeitos adversos devido as suas ações pró-oxidantes (MARTIN & APPEL, 2009). Em vez de apresentar apenas atividades antioxidantes, as concentrações elevadas desses compostos podem aumentar o estresse oxidativo no nível celular, elevando assim o risco de desenvolvimento de doenças (NORAZHAR et al., 2022).

ISMAIL et al. (2017) demonstraram que embriões de zebrafish expostos a extratos aquosos ricos em compostos fenólicos de canela (*Cinnamon zeylanicum*) e eugenia (*Eugenia polyantha*) apresentaram toxicidade significativa após 48 hpf, evidenciada por uma redução na taxa de sobrevivência, deformidades nos órgãos, irregularidades nos batimentos cardíacos e atraso no processo de eclosão. A FFO em larvas de tenébrio gigante (*Z. Morio*) relevaram efeitos de toxicidade, impactando os processos biológicos desses organismos (SILVA et al., 2024). Assim como, nos extratos de folhas de *C. vesperilionis*, *C. zeylanicum* e *E. Polyantha*, a FFA e FFO também contêm compostos fenólicos entre seus principais fitoquímicos.

Por fim, os estudos com FFA em embrião de zebrafish revelaram toxicidade em concentrações elevadas, impactando o desenvolvimento dos embriões. Esses resultados destacam a necessidade de identificar quais são os componentes tóxicos que podem ter contribuído para esses efeitos no desenvolvimento dos organismos (HA et al., 2021).

10.4 CONCLUSÕES

Conclui-se que as farinhas de FFA e FFO não apresentam toxicidade para microcrustáceos com base na ausência de efeito adverso observado para *D. magna*.

A FFA e FFO apresentaram valores para CL₅₀ de 562,25 mg/L⁻¹ e 613,74 mg/L⁻¹, respectivamente, sugerindo que essas farinhas não são altamente tóxicas. No entanto, concentrações superiores a 100mg/L podem causar efeitos significativos no desenvolvimento dos embriões, incluindo o atraso na eclosão e comprometimento da oxigenação das larvas.

Esses resultados destacam a necessidade de investigar mais detalhadamente a composição fitoquímica e os mecanismos de toxicidade, pois os compostos polifenólicos presentes em altas concentrações podem induzir efeitos pró-oxidantes adversos.

REFERÊNCIAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Norma Técnica NBR12713, Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com peixe**. ABNT, 2011. (NBR 15088).

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera)**. ABNT, 2009. (NBR 12713).

BAPTISTA, D.F.; DORVILLÉ, L.F.M.; BUSS, D.F.; NESSIAMIAN, J.L. Sptail and temporal organization of aquatic insects assemblages in the longitudinal gradient of a tropical river. **Revista Brasileira de Biologia**, v.61, n.2, p.295-304, 2001.

BOTREL, N., FREITAS, S., FONSECA, M. J. O., DE CASTRO E MELO, R. A., & MADEIRA, N. Valor nutricional de hortaliças folhosas não convencionais cultivadas no Bioma Cerrado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, n. 1, p. 1–8, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.17418>

BOWNIK, A. *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. **Science of the Total Environment**, p.194-205, 2017.

BRACHO-PÉREZ, J.C.; TACZA-VALVERDE, I.; CHÁVEZ-ROJA, D.; AQUIJE, C.; HARO, J.; VÁSQUEZ-CASTRO, J.A. Toxicity of mucura (*Petiveria alliacea*) extracts from the peruvian amazon against *Daphnia magna* for environmental protection and sustainable development. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, e278758, 2024. DOI: | <https://doi.org/10.1590/1519-6984.278758>

BRASIL. **Lei Federal n. 9433, de 08 de janeiro de 1997. Institui a política nacional de recursos hídricos**. Diário Oficial. Brasília, 1997.

CASTRO, V. L.; CLEMENTE, Z.; JONSSON, C.; SILVA, M.; VALLIM, J.H.; MEDEIROS, A.M.Z.; MARTINEZ, D.S.T. Nanoecotoxicity assessment of graphene oxide and its relationship with humic acid. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 7, p. 1998-2012, 4 jun. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.4145>

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Norma técnica L5.018, Água – teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, (Cladocera, Crustacea): método de ensaio**. São Paulo, 1994.

CHANDRA, S. J, SANDHYA, S., VINOD, K. R., DAVID, B., SUDHAKAR, K., & CHAITANYA, R. Plant toxins-useful and harmful effects. **Hygeia Journal for Drug and Medicines**, v. 4, n. 1, p. 79-90, 2012.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 357**. Diário Oficial da União de 17 de Março de 2005. Seção1, pág.58-63. 2005.

- COSTA, C.R.; OLIVI, P.; BOTTA, C.M.R.; ESPINDOLA, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>
- FERREIRA, A.L.G.; LOUREIRO, S.; SOARES, A.M.V.M. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v.89, p. 28-39, 2008.
- GOULART, M. D. C.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista FAPAM**, v.2, n.1, 2003.
- GUTIERREZ, M. F.; PAGGI, J. C.; GAGNETEN, A. M. Microcrustaceans escape behavior as na Early bioindicator of copper, chromium and endosulfan toxicity. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 428-438, 2012.
- HA, Y.; KIM, Y.; CHOI, J.; HWANG, I.; KO, J.-Y.; JEON, H.K.; KIM, Y.-J. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity, and zebrafish embryo toxicity of mixtures containing *Hyssopus officinalis*, *Morus Alba*, *Engraulis japonicus*, and 27 other extracts for cosmetic safety assessment. **Molecular & Cellular Toxicology**, v.17, p.221-232, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13273-021-00128-7>
- HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.
- HENRY-SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Impacto das atividades de aquicultura e sistemas de tratamento de efluentes com macrófitas aquáticas relato de caso. São Paulo. **BoTem do Instituto de Pesca**, v. 34, n.1, p. 163-173, 2008.
- ISMAIL, H. F., HASHIM, Z., SOON, W. T., RAHMAN, N., ZAINUDIN, A. N., & MAJID, F. Comparative study of herbal plants on the phenolic and flavonoid content, antioxidant activities and toxicity on cells and zebrafish embryo. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 4, p. 452-465, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.12.006>
- JONSSON, C.M.; MAIA, A.H.N. **Protocolo de avaliação de agentes microbianos de controle de pragas para registro como biopesticidas. III. Testes Toxicopatológicos em organismos não-alvo do ambiente aquático: Organismos zooplanctônicos, fitoplanctônicos e vertebrados.** Documentos – Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna/SP, v.11, p. 1-33, 1999.
- KIMURA T, KIYOTAKA N, YUKO S, KENJI Y, MASAHIRO S, KOHJI Y, HIROSHI S, TERUO M. Determination of 1 Deoxynojirimycin in Mulberry Leaves Using Hydrophilic Interaction Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p.1415-1418, 2004.
- KÜHL, A.M.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; MANTOVANO, T.; DEOSTI, S.; LANSAC-TÔHA, F.A. Toxic tests show the sensitivity of the *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera) and *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae) to commercial pesticides.

Annals of the Brazilian Academy of Sciences, v. 94, 4, e20201234, 2022. DOI: 10.1590/0001-3765202220201234

LU, F.C. **Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs, and Risk Assessment**. Taylor & Francis. USA, 1996.

MAGGLIN, C.; FIKRIAH, I.; KOSALA, K.; KUNCORO, H. Acute toxicity assay from seeds and flesh of tarap fruit (*Artocarpus odoratissimus Blanco*) ethanolic extract against *Daphnia magna* Larvae. **Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 95-97, 2020.

MARTIN, K. R., & APPEL, C. L. Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. **Dove Press**, v. 2, p. 1-12, 2009. DOI: <https://doi.org/10.2147/NDS.S6422>

MIODUSKI, J. **Avaliação da toxicidade de extratos da semente de *Moringa oleifera* Lam. frente aos organismos *Daphnia magna* Straus. e *Artemia salina* Lench**. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

MORENO, P.; CALLISTO, M. Benthic macroinvertebrates in the watershed of na urban reservoir in southeastern Brazil. **Hydrobiologia**, n. 560, p.3111-321, 2006.

MURUGESU, S., UDDIN, Q., IBRAHIM, Z., FATHAMAH, B., BENCHOULA, K., IDRIS, N., & EL-SEEDI, H. R. Toxicity study on *Clinacanthus nutans* leaf hexane fraction using *Danio rerio* embryos. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 1148–1154, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.10.020>

NORAZHAR, A. I., LEE, S. Y., FAUDZI, S. M. M., & SHAARI, K. Metabolite profiling of *Christia vespertilionis* leaf metabolome via molecular network approach. **Applied Sciences**, v. 11, n. 8, p. 1-29, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/app11083526>

NORAZHAR, A.I.; IBRAHIM, W.N.W.; HODIN, N.A.S.; FAUDZI, S.M.M.; SHAARI, K. Zebrafish embryotoxicity and teratogenic effects of *Christia vespertilionis* leaf extract. **Pertanika Journal Tropical Agricultural Science**, v.45, n. 2, p. 351-366, 2022. DOI: <https://doi.org/10.47836/pjtas.45.2.01>

NORAZHAR, A.I.; IBRAHIM, W.N.W.; HODIN, N.A.S.; FAUDZI, S.M.M.; SHAARI, K. Zebrafish embryotoxicity and teratogenic effects of *Christia vespertilionis* leaf extract. **Pertanika Journal Tropical Agricultural Science**, v. 45, n.2, p. 351-366, 2022. DOI: <https://doi.org/10.47836/pjtas.45.2.01>

OECD - Guidelines for the Testing of Chemicals. **Revised Proposal for updating Guidelines 202. *Daphnia* sp. Acute Imobilisation Test**. Revised Draft Document. April, p. 1-12, 2004.

OECD - Guidelines for the Testing of Chemicals. **Test Guideline 236, Fish embryo acute toxicity (FET) test**. 2013. DOI: 10.1787/9789264203709

OLIVEIRA, A.M.; MESQUITA, M.S.; SILVA, G.C.; LIMA, E.O.; MEDEIROS, P.L.; PAIVA, P.M.G.; SOUZA, I.A.; NAPOLEÃO, T.H. Evaluation of toxicity and antimicrobial activity of an ethanolic extract from leaves of *Morus alba* L. (Moraceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/513978>

PEREIRA, C.B.; MARIN, A.; DALMORA, S.L.; NECCHI, R.M.M.; MORESCO, R.N.; MANFROM, M.P. Atividade anti-inflamatória e Avaliação da toxicidade do extrato hidroetanólico de *Morus alba* (Moraceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 43-46, 2013.

PEREIRA, C.B.; NECCHI, R.M.M.; CASOTI, R.; MAKI, T.D.T.; MARIN, A.; MANFRON, M.P. **Análise Fitoquímica Qualitativa das folhas *Morus alba***. In: Jornada Interdisciplinar em saúde; Santa Maria: Universidade Federal de Santa maria; 2010.

SHAW, I. C.; CHADWICK, J. **Principles of Environmental Toxicology**, Taylor & Francis: Philadelphia, 1998.

SILVA, D.M.; NUNES, L.G.A.; SILVA, N.P.; FREITAS, P.H.S.; SCIO, E.; TAVARES, G.D.; ALVES, I.A.; COSTA, J.C. Anti-inflammatory activity and acute toxicity of *Pereskia aculeata*, in *Zophobas morio* larvae. **Chemistry & Biodiversity**. e202400686, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202400686>

SOUZA, L.F.; CAPUTO, L.; BARROS, I.B.I.; FRATIANNI, F.; NAZZARO, F.; FEO, V. *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) leaves: chemical composition and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n.9, p. 1478, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17091478>

STATGRAPHICS19 CENTURION. **Statgraphics centurion XVII (Version 17.1.04)**. [S.l.]: Statgraphics Technologies, Inc, [s.d.]. Disponível em: <https://www.statgraphics.com/download-statgraphics-centurion-xvii>. Acesso em: 02 jun. 2022.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Perchlorate Environmental Contamination: Toxicological Review and Risk Characterization based on emerging information**. Washington, DC 31, January, 2002.

VALLIM, J.H. **Avaliação dos efeitos toxicológicos do dimetoato e dimetoato nanoencapsulado em *Danio rerio* (Zebrafish)**. 2019. 115f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2019.

ZAGATTO, P.A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2ª ed. São Carlos: Editora RiMa, 2008.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. Rima, 1 ed., 478p, São Carlos. 2006.
ZHANG, C.; WILLET, C.; FREMGEN, T. Zebrafish: na animal model for toxicological studies. **Current Protocols in Toxicology**, v.17, n.1, p. 171-178, 2003.

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos no presente estudo sugerem que a inclusão das farinhas de FFA e FFO nas dietas de pacu e tilápia do Nilo apresentam perspectivas promissoras para a digestibilidade, desempenho zootécnico e a saúde dos peixes. A FFA e a FFO demonstraram uma digestibilidade adequada e não impactaram negativamente o crescimento, apresentando benefícios para a saúde dos juvenis de ambas as espécies.

As dietas contendo 6% de FFA e 32% de FFO melhoraram a resposta imunológica dos peixes ao desafio com a bactéria *A. hydrophila*, evidenciando melhorias na sobrevivência, especialmente, com a inclusão de FFO nas dietas para ambas as espécies.

Apesar de os valores de CE50-48h e CL50 sugerirem baixa toxicidade para FFA e FFO, os compostos polifenólicos presentes na composição das farinhas podem conter efeitos adversos, principalmente, no desenvolvimento dos embriões de zebrafish e nas eclosões. Esses resultados destacam a necessidade de avaliações mais aprofundadas da composição fitoquímica e dos mecanismos de toxicidade para garantir a segurança ambiental, e a eficácia dessas farinhas como um aditivo em dietas para peixes. Assim, a utilização de FFA e FFO, nas concentrações recomendadas deste estudo, mostra-se uma estratégia viável para melhorar a saúde os peixes, promovendo, ao mesmo tempo, a sustentabilidade e a redução de custos na produção de rações.

ANEXOS

Anexo I. Certificado e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR (CEUA/Palotina).

Ministério da Educação Universidade Federal do Paraná Setor Palotina Comissão de Ética no Uso de Animais	
Certificado	
<p>Certificamos que o Protocolo nº 15/2022 referente ao projeto de pesquisa Avaliação de cinco Ingredientes Alternativos para o Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>), sob responsabilidade da Prof. Fábio Meurer, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR (CEUA/Palotina) em 06/07/2022.</p>	
<p>O Docente responsável pelo envio do formulário deve estar ciente de que deve:</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • informar qualquer intercorrência, efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo; • informar sobre a necessidade de modificações ou emendas ao protocolo que foi descrito e aprovado, identificando a parte do protocolo a ser modificada e apresentando justificativas claras 	
<p>Palotina, 06 de julho de 2022</p>	
Certificate	
<p>Certify that the Protocol n. 15/2022 regarding the research project Evaluation of Five Alternative Ingredients for Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) of Fábio Meurer is according to the Ethical Principles of Animal Experimentation adopted by the National Council for Animal Experiments Control (CONCEA) and was APPROVED by the Ethics Committee on Animal Use of the UFPR – Setor Palotina (CEUA / Palotina) in July 06, 2022.</p>	
<p>Palotina, July 06, 2022.</p>	
	
<p>Prof. Geraldo Camilo Alberton Coordenador/Coordinator CEUA/Palotina - UFPR</p>	

Anexo II. Certificado e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente.



Embrapa

Meio Ambiente

M.CEUA.CNPMA No 003/2022

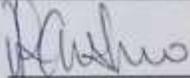
Jaguariúna, 10 de maio de 2022.

Márcia Mayumi Ishikawa
Embrapa Meio Ambiente

AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo do efeito do uso da farinha da folha da amoreira (*Morus alba*) na dieta da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no desempenho, saúde e qualidade da água", registrada com o nº 002/2022, sob a responsabilidade de Márcia Mayumi Ishikawa que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente, em reunião de 09/05/2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/08/2022 a 31/12/2024
Espécie/linhagem/raça	<i>Oreochromis niloticus</i>
Nº de animais	260
Peso/Idade	160 animais com 15g e 40 com 200 g
Sexo	Machos
Origem	Piscicultura Polettini



Coordenadora da CEUA



Secretário da CEUA

Anexo III. Certificado e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente.



M.CEUA.CNPMA No 1/2024

Jaguariúna, 15 de abril de 2024.

Márcia Mayumi Ishikawa
Embrapa Meio Ambiente

AUTORIZAÇÃO PARA A REALIZAÇÃO DE ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da farinha de folhas na dieta de peixe: amoreira para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e de ora-pro-nóbis para pacu (*Piaractus mesopotamicus*), registrada com o nº 003/2023, sob a responsabilidade de Márcia Mayumi Ishikawa que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Embrapa Meio Ambiente, em 12/054/2024.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	09/2023 a 12/2024
Espécie/linhagem/raça	<i>Oreochromis niloticus</i> ; <i>Piaractus mesopotamicus</i> ; e <i>Danio rerio</i>
Nº de animais	220; 440; 50, 25 e 480
Peso/Idade	15 g; 15 g; 4 a 12 meses
Sexo	macho; macho; macho, fêmea e embriões
Origem	Piscicultura comercial; biotério LAE

Coordenadora da CEUA

Secretário da CEUA

Anexo IV. Dispensa da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp.

	Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp	 CEUA/Unicamp
---	---	---

INFORMAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP – CEUA/UNICAMP – esclarece que não há necessidade de submeter o projeto de pesquisa **“Estudo da farinha de folhas nas dietas de peixes: amoreira para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e de ora pro nobis para pacu (*Piaractus mesopotamicus*)”**, de responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Mayumi Ishikawa e da executora Patrícia da Silva Dias, para análise desta comissão.

Justifica-se por se tratar de experimentos com tilápias (*Oreochromis niloticus*) que será executado nos recintos da Embrapa Meio Ambiente, localizada em Jaguariúna-SP (protocolo N° 02/2022 aprovado pela CEUA da Embrapa Meio Ambiente) e experimentos com pacus (*Piaractus mesopotamicus*) que será executado nos recintos do Campus de Jandaia do Sul da UFPR (protocolo N° 15/2022 aprovado pela CEUA da UFPR/Palotina). Para este projeto, não haverá manipulação in vivo na Unicamp.

Campinas, 15 de julho de 2022.

<p>Prof. Dr. Wagner José Fávaro Presidente CEUA/UNICAMP</p> <p><small>CEUA/UNICAMP Rua Monteiro Lobato, 215 13083-962 Campinas, SP – Brasil</small></p>	<p>Rosângela dos Santos Secretária Executiva CEUA/UNICAMP</p> <p><small>Telefone: (19) 2521-6399 E-mail: comisa@unicamp.br http://www.z.unicamp.br/comissao/ceua_principal</small></p>
---	---

Documento assinado. Verifique autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código: 76C0F489 AC0345AF 827E5303 0E44C886

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSÉ FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 22/07/2022, às 06:58 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

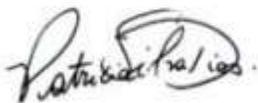
Documento assinado eletronicamente por **ROSÂNGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA DA CEUA/UNICAMP**, em 21/07/2022, às 10:55 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

	<p><small>A autenticidade do documento pode ser conferida no site: sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador: 76C0F489 AC0345AF 827E5303 0E44C886</small></p>	
---	--	---

Anexo V. Declaração de direitos autorais.**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Estudo da farinha de folhas nas dietas de peixes: amoreira para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e de ora-pro-nóbis para pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

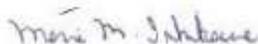
Campinas, 17 de dezembro de 2024



Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Patricia da Silva Dias**

RG n.º 12.833.681-8



Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Marcia Mayumi Ishikawa**

RG n.º 20.150.125-9