

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CÂMPUS DOIS VIZINHOS  
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

CLEYTON DA SILVA CAMARGO

**ASSOCIAÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEO E ÁCIDO ORGÂNICO  
NA ALIMENTAÇÃO DA TILÁPIA DO NILO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

DOIS VIZINHOS  
2022

**CLEYTON DA SILVA CAMARGO**

**ASSOCIAÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEO E ÁCIDO ORGÂNICO NA  
ALIMENTAÇÃO DA TILÁPIA DO NILO**

**ASSOCIATION OF FRUCTOOLIGOSACCHARIDE AND ORGANIC ACID IN NILE  
TILAPIA DIET**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao  
Curso de graduação apresentada como requisito para  
obtenção do título de Bacharel em Zootecnia da  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus  
Dois Vizinhos (UTFPR)  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yuji Sado

**DOIS VIZINHOS**

**2022**



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

CLEYTON DA SILVA CAMARGO

**ASSOCIAÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEO E ÁCIDO ORGÂNICO  
NA ALIMENTAÇÃO DA TILÁPIA DO NILO.**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação  
apresentado como requisito do título de  
Bacharel em nome do Curso de Zootecnia da  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
(UTFPR), Campus Dois Vizinhos

Data de aprovação: 08 de junho de 2022

---

Ricardo Yuji Sado  
Dr. em Ciência Animal e Pastagens  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Valter Oshiro Vilela  
Mestre em Biologia  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Sabrina Endo Takahashi  
Dra. em Zootecnia  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**DOIS VIZINHOS  
2022**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por toda força e resiliência que me manteve e proporcionou-me a chegar até aqui.

Ao meu orientador Ricardo Yuji sado, por todos os ensinamentos e orientações durante esses anos.

Aos colegas de setor por todo apoio e troca de conhecimento durante o período.

Aos meus amigos Dyanja, Gabrielly e Nicole por todos as conversas, aprendizados, perrengues e momentos vividos juntos durante a graduação. Muito obrigado!

Aos meus pais Lourival e Maria do Carmo, por todo apoio, força, amor e por me mostrarem que independente de tudo você pode alcançar seu objetivo. Vocês não mediram esforços para que esse momento acontecesse, essa conquista é de vocês! Muito obrigado!

CAMARGO, Cleyton da Silva. **Associação de frutooligossacarídeo e ácido orgânico na alimentação da tilápia do Nilo**. 2022. Trabalho (Conclusão de curso) - Programa de graduação em Bacharelado em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2022.

## RESUMO

Sistemas intensivos de produção de peixe impõe estresse aos animais, o qual afeta negativamente o crescimento e o sistema imunológico, tornando-os susceptíveis a doenças. Com intuito de aumentar a resistência a doenças, o uso de aditivos alimentares como prebióticos e ácidos orgânicos surgem como importante ferramenta para melhorar o desempenho e atividade imunológica dos peixes. Diante do exposto, objetivou-se avaliar o potencial da associação de um prebiótico (FOS) e do ácido cítrico como promotor de crescimento e resistência ao estresse em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Cento e quarenta e quatro juvenis de tilápia do Nilo ( $47,5 \pm 3,89$  g) foram separados em lotes homogêneos e distribuídos em doze caixas de polietileno (250 L) com temperatura média de  $22,50 \pm 2,10^{\circ}\text{C}$  compondo um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (T1= 1,5% de ácido cítrico, T2= 1,5% de ácido cítrico + 0,2% de FOS, T3= 0,2 % de FOS, T4= Controle) e três repetições, alimentados duas vezes ao dia por 48 dias (8:00 h e 17:00 h) até aparente saciedade. Ao final, foi realizada a primeira coleta biológica, para a segunda coleta os animais foram alimentados por mais 10 dias com cortisol dietético (400 mg de hidrocortisona/ kg da dieta), coletada a segunda parte do material biológico e avaliados os parâmetros hematológicos e imunológicos. A associação de ácido cítrico + FOS apresentou maior número de monócitos ( $P < 0,05$ ) no tempo 1 e maior volume corpuscular médio na dieta com FOS em relação a dieta controle. Após o cortisol, as análises do hematócrito e número de linfócitos foram respectivamente maiores e menores significativamente para o tratamento com FOS em relação a dieta controle ( $P < 0,05$ ). As análises após a suplementação dietética com cortisol corroboram com resultados apresentados pela literatura em organismos submetidos ou em situação de estresse. Os tratamentos não tiveram capacidade imunomodulatória e resistência ao estresse.

Palavras chaves: Ácido cítrico, prebióticos, estresse, *Oreochromis niloticus*,

CAMARGO, Cleyton da Silva. **Association of fructooligosaccharide and organic acid in Nile tilapia diet.** 2022. Work (Completion of course) - Bachelor's degree program in Animal Science Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2022.

### ABSTRACT

Intensive fish production systems impose stress on animals, which negatively affects growth and the immune system, making them susceptible to disease. In order to increase disease resistance, the use of food additives such as prebiotics and organic acids emerge as an important tool to improve the performance and immune activity of fish. Given the above, the objective was to evaluate the potential of the association of a prebiotic (FOS) and citric acid as a promoter of growth and resistance to stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). One hundred and forty-four juveniles of Nile tilapia ( $47.5 \pm 3.89$  g) were separated into homogeneous batches and distributed in twelve polyethylene boxes (250 L) with an average temperature of  $22.50 \pm 2.10^{\circ}\text{C}$ , composing a design completely randomized with four treatments (T1= 1.5% citric acid, T2= 1.5% citric acid + 0.2% FOS, T3= 0.2% FOS, T4= Control) and three replications, fed twice a day for 48 days (8:00 h and 17:00 h) until apparent satiety. At the end, the first biological collection was carried out, for the second collection the animals were fed for another 10 days with dietary cortisol (400 mg of hydrocortisone/kg of diet), the second part of the biological material was collected and the hematological and immunological parameters were evaluated. . The association of citric acid + FOS showed a higher number of monocytes ( $P < 0.05$ ) at time 1 and a higher mean corpuscular volume in the diet with FOS in relation to the control diet. After cortisol, the analysis of hematocrit and number of lymphocytes were respectively higher and lower significantly for the treatment with FOS in relation to the control diet ( $P < 0.05$ ). The analyzes after dietary supplementation with cortisol corroborate the results presented in the literature in organisms submitted to or under stress. The treatments did not have immunomodulatory capacity and resistance to stress.

Key words: Citric acid, prebiotics, stress, *Oreochromis niloticus*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>8</b>
2.1	Objetivos gerais: .....	8
2.2	Objetivos específicos: .....	8
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>9</b>
3.1	Histórico da aquicultura.....	9
3.2	Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	9
3.3	Aditivos alimentares .....	11
3.4	Prebióticos .....	11
3.4.1	Frutooligossacarídeo .....	12
3.5	Ácidos orgânicos .....	13
3.5.1	Ácido cítrico .....	13
3.6	Sistema imune .....	14
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
4.1	Arranjo experimental.....	16
4.2	Dieta experimental.....	17
4.3	Avaliação dos parâmetros hematológicos .....	18
4.3.1	Determinação da concentração de hemoglobina.....	18
4.3.2	Contagem total de eritrócitos .....	18
4.3.3	Valor do hematócrito .....	19
4.3.4	Variáveis hematimétricas.....	19
4.3.5	Determinação da concentração de leucócitos e trombócitos .....	19

4.3.6	Contagem diferencial de leucócitos .....	20
4.4	Avaliação dos parâmetros imunológicos .....	20
4.4.1	Atividade respiratória dos leucócitos ( <i>burst oxidativo</i> ) .....	20
4.4.2	Concentração de lisozima sérica .....	20
4.4.3	Determinação de lisozima no muco .....	21
4.4.4	Determinação da glicose plasmática .....	22
4.5	Análise estatística .....	22
<b>5</b>	<b>Resultados. ....</b>	<b>23</b>
5.1	Análise hematológicas e imunológicas .....	23
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento da cadeia aquícola se dá pelo aumento do consumo mundial médio per capita de peixes, que entre 1961 a 2018 cresceu em média 1,5% ao ano chegando a 20.5 kg/habitante/ano de acordo com o Estado Mundial da Pesca e Aquicultura (FAO, 2020) e superiores a 50 kg/habitante/ano em países desenvolvidos como Japão, Noruega e Portugal (ACOPE, 2018). A produção de peixes proveniente da aquicultura está seguindo esse caminho, em 2018 chegou a 82,1 milhões de toneladas de peixes produzidos correspondendo a 46% da produção total de produtos aquícolas (FAO, 2020).

A cadeia piscícola Brasileira em 2021 produziu cerca de 841 mil toneladas de peixes em cativeiro, crescimento de 4,74% em comparação com o ano anterior e prosseguindo com o crescimento que nos oito últimos anos chegou a um acumulado 45% (PEIXE BR, 2022), seguindo a perspectiva da (FAO, 2016) que prevê crescimento da produção no país em 104% até 2025. O estado do Paraná é o maior produtor de peixes de cultivo com 188 mil toneladas por ano, seguido de São Paulo e Rondônia (PEIXE BR, 2022).

A tilapicultura acompanhou esse crescimento chegando à produção de 534 mil toneladas em 2021, sendo o estado do Paraná líder com 182 mil toneladas de tilápia (PEIXE BR, 2021). Esse crescimento se dá pela intensificação piscícola, que permitem aumento da densidade de produção por área através da implantação de novas tecnologias como sistemas de aeração e manejos mais frequentes, contudo acarreta em acúmulo de matéria orgânica (fezes) no fundo dos viveiros e baixa qualidade de água, sendo agentes estressantes aos peixes, que se expostos a essas condições a um longo período de tempo acionam as respostas primárias do sistema nervoso como a liberação de corticosteróides e catecolaminas, que estimulam as respostas secundárias e terciárias que conseqüentemente leva o animal a imunodepressão tornando-os susceptíveis a patógenos dentre eles bactérias, fungos e parasitas (BONGA, 1997; KUBITZA, 2015; BRANDÃO et al., 2006; SERRA et al., 2019).

O uso de antibióticos como finalidade terapêutica e/ ou profilática é comum, e sua utilização de forma excessiva ou inadequada tem ocasionado problemas como resistência de bactérias e patógenos no meio aquático sendo prejudicial ao ambiente (CABELLO, 2006), como o principal destino da carne dos peixes é a espécie humana, em muitos países como Suécia, Dinamarca e Suíça desde 1986 já proibiam o uso de antibióticos na ração animal

(EMBRAPA, 2001). Neste contexto, o uso de aditivos alimentares vem com uma alternativa profiláctica, minimizando os efeitos dos agentes estressores (BOYD e QUEIROZ, 2004), contribuindo com o desempenho zootécnico (SABOYA ET AL, 2013), e resposta imune (BERTO, 2013).

O frutooligossacarídeo é um prebiótico de origem vegetal capaz de chegar ao intestino sem sofrer ações químicas e enzimáticas sendo uma fonte de substrato para os microrganismos benéficos ao hospedeiro modulando a microbiota intestinal, mantendo a integridade da mucosa e aumentando a área de absorção de nutrientes, (SOLEIMANI et al., 2012; WU et al., 2013; ZHANG et al., 2014), além de possuir capacidade imunoestimulante, contribui com o aumento na produção de ácidos graxos de cadeia curta que reduzem o pH do meio, dificultando a proliferação de algumas bactérias patogênicas que são prejudiciais ao hospedeiro (PASSOS; PARK, 2003).

O ácido cítrico cuja fórmula química é  $C_6H_8O_7$ , é um aditivo alimentar acidificante encontrado em produtos de origem vegetal comum em frutas cítricas, é produzido de forma sintética a partir da fermentação de melão de cana, representando 90% da produção industrial (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2018). No trato gastrointestinal reduz o pH e colabora para ação enzimática e, reduz a adesão das bactérias patogênicas na parede intestinal, melhorando desempenho zootécnico e saúde dos animais (HOSSAIN; PANDEY; SATOH, 2007, BARUAH et al., 2007).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais:**

Avaliar o potencial do prebiótico e do ácido orgânico na saúde e resistência ao estresse em juvenis de tilápia do Nilo.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Determinar o efeito dos aditivos sobre os parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo.
- Determinar o efeito dos aditivos sobre o sistema imune da tilápia do Nilo.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Histórico da aquicultura

A aquicultura é definida como o cultivo de organismos aquáticos em ambiente controlado (EMBRAPA, 2005). Evidências arqueológicas mostram que o *Homo sapiens* já praticava a pesca há 80 mil anos atrás para fins de sobrevivência (SANTOS, 2009), com o aumento da população, os recursos pesqueiros foram diminuindo, e o homem começou a buscar alternativas para suprir sua demanda. Documentos históricos relatam que na China Há mais de 4 mil anos atrás, as macroalgas foram o primeiro organismo aquático cultivado pelo homem, seguido do cultivo de carpas, onde gravuras em pedras mostram tanques de peixes relatando o início da aquicultura no antigo Egito e na Itália com o cultivo de peixes marinhos (PANORAMA DA AQUICULTURA, 1995).

Segundo dados da FAO (2020) a aquicultura mundial chegou a um marco importante, com a produção de 114,5 milhões de toneladas de produtos de origem aquícola dentre elas algas, crustáceos e peixes com um faturamento de 263,6 bilhões de dólares. A produção de peixes provenientes da aquicultura correspondeu por 46% da produção total de pescados no mundo e 52 % dos pescados destinados a consumo humano (FAO, 2020).

A piscicultura no Brasil vem crescendo nos últimos anos (PEIXE BR, 2022), e continua com previsão de constante crescimento (FAO, 2018) isso se dá pelo aumento da demanda mundial por produtos de origem animal para atender a população que em 2050 pode chegar a 9,7 bilhões de pessoas (ONU, 2019). O país possui grande potencial de crescimento por suas condições climáticas e grande área disponível para realização da atividade, possuindo imensa área litorânea e 12% dos reservatórios de água doce do mundo (ITAMARATY, 2018).

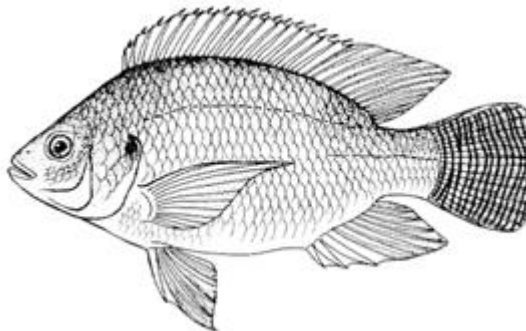
#### 3.2 Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia do Nilo tem origem no continente Africano, na bacia do rio Nilo que corta a região de temperatura altas. A espécie possui hábito alimentar onívoro e tem boa adaptação a diferentes ambientes, tolerando temperaturas entre 14° e 33°C (SEBRAE, 2017), registros mostram que foi introduzida no país na década de 50 na região Nordeste com o intuito de diminuir a população de algumas plantas aquáticas, e se popularizou devido a sua grande

capacidade de reprodução, alto crescimento e rendimento de filé (SEBRAE, 2007; SENAR, 2017).

No entanto, sua introdução oficial ocorreu em 1971 pelo DNOCS (Departamento Nacional de Obras Contra as Secas) com importação de alevinos para repovoamento dos reservatórios no Nordeste. Na década de 1980 companhias hidroelétricas no Sudeste já realizavam a reprodução para repovoamento dos reservatórios e vendas de alevinos para a população (SCHULTER; FILHO, 2017). A partir da tecnologia de reversão sexual exposta em 1990 por Popma e Green, a produção de tilápia se desenvolveu rapidamente, sendo o estado do Paraná o pioneiro, seguido dos estados de Santa Catarina, São Paulo e Bahia (SCHULTER; FILHO, 2017). Atualmente a tilápia é a segunda espécie mais produzida no mundo, somente atrás da criação de carpa, e a mais produzida no Brasil com a linhagem GIFT (*Genetically Improved Farmed Tilápia*) sendo destaque (FAO, 2018; PEIXE BR, 2020).

**Figura 1. Foto ilustrativa da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**



**Fonte:** ([http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/en))

A intensificação e implantação de novas tecnologias proporciona o destaque da tilapicultura por oferecer uma alta produtividade por área em comparação a outras atividades do meio agrícola/agropecuário, possibilitando a produção de 10-40 toneladas/hectare/safra de 8 meses índice maior que o de gado de corte: (1,3- 2,5 toneladas/hectare/safra de 24 meses) e cultura da soja: (3,5- 4 toneladas/hectare/safra de 4 meses) (SEBRAE, 2007).

O crescimento da cadeia chega a 9,8% ao ano (PEIXE BR, 2022). Entretanto esse crescimento demanda a intensificação dos sistemas produtivos, elevando a quantidade de matéria orgânica, prejudicando a qualidade da água e elevando o número de agentes patogênicos, estes estressores que são divididos em físicos, químicos, biológicos e ambientais causando um desequilíbrio nos organismos tornando-os susceptíveis a doenças, tendo a

necessidade do tratamento com o uso de químicos como os antibióticos (FERREIRA; BARCELLOS, 2008).

Os antibióticos vêm sendo utilizados na aquicultura de forma terapêutica e profilática, ministrados via injeção, água e ração e atuam com efeito bactericida e bacteriostático. No entanto seu uso de forma inadequada e/ou indiscriminada pode causar resistência de bactérias, impedindo efeito eficaz no uso futuro, além de oferecerem risco à saúde humana (GASTALHO; SILVA; RAMOS, 2014). Além dos problemas de resistência podem causar impacto ambiental, bem como causar morte de organismos aquáticos como algas, fitoplâncton e zooplâncton (CARVALHO; JUNIOR; AMÉRICO-PINHEIRO, 2016). Sendo assim os aditivos alimentares vêm como uma alternativa para diminuir o uso de antibióticos, por seu baixo custo e sua capacidade de melhorar desempenho do animal (RODRIGUES; MEURER; BOSCOLO, 2015).

### **3.3 Aditivos alimentares**

Segundo a Instrução Normativa nº 44/15 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) os aditivos são produtos considerados não ingredientes, que têm ou não valor nutricional e são adicionados intencionalmente na alimentação animal, para manter ou melhorar o desempenho, são classificados de acordo com suas funções e propriedades em: tecnológicos, sensoriais, nutricionais e zootécnicos (MAPA, 2015). Dentre os aditivos que estão sendo utilizados na piscicultura, os prebióticos, probióticos e os ácidos orgânicos são os de destaque, várias pesquisas relacionadas vem crescendo e mostrando que a utilização dos aditivos pode melhorar a imunidade e desempenho dos animais (SILVA; GALÍCIO, 2012).

### **3.4 Prebióticos**

O prebiótico é um carboidrato não digestível que chega ao intestino sem sofrer reações, servindo de substrato para fermentação que resulta na produção ácido lático e ácidos graxos de cadeia curta, diminuindo o pH do meio, reduzindo a população de bactérias prejudiciais e aumentando o número de bactérias benéficas a saúde do hospedeiro. Os Mananoligossacarídeos (MOS), galactooligossacarídeos, xilo-oligossacarídeos, inulinas e frutooligossacarídeos (FOS) são os mais utilizados como aditivos alimentares (SAAD, 2006) com o objetivo de melhorar a saúde e desempenho animal por meio da imunomodulação.

Estudos vêm mostrando os benefícios da adição de prebióticos na alimentação de peixes, dentre eles o observado por (SCHWARZ et. al., 2016) que com a adição de 0,2% de MOS na dieta de tilápia do Nilo apresentaram maior conversão alimentar mostrando ser eficiente e viável economicamente, já (WATANABE; VIEGAS; GONÇAVES, 2010) constataram que a adição de prebiótico em pacus possui efeito positivo na eficiência alimentar e sua adição também contribui para aumento da vilosidades intestinais (CARVALHO et al., 2011). Apresentam melhoria na saúde dos peixes através do fortalecimento do sistema imunológico, prevenindo e fortalecendo o organismo contra agentes patogênicos e doenças (AKRAMI et al., 2013; GUERREIRO et al., 2014)

#### 3.4.1 Frutooligossacarídeo

O frutooligossacarídeo (FOS) é um oligossacarídeo de origem vegetal, encontrado principalmente em produtos como a cebola, chicória, alho, aspargo, centeio, cevada, soja, grão de bico entre outros, são denominados como oligômeros de frutose, resistentes à ação de enzimas digestivas e tem sua formação por 1- kestose (GF<sub>2</sub>), nistose (GF<sub>3</sub>) e frutofuranosil (GF<sub>4</sub>) com os elementos de furanosil ligados na posição ( $\beta= 2, 1$ ) da sacarose (FILHO; SAMPAIO, 1999; PASSOS; PARK, 2003; SAAD, 2006).

O (FOS) é muito utilizado na alimentação humana, principalmente em lácteos como iogurtes e leites fermentados. Em países como Holanda e Japão, o consumo do prebiótico é comum, mostrando a consolidação nesses países (PASSOS; PARK, 2003). Na alimentação animal pesquisas em aves mostram a capacidade do FOS como substrato para algumas bactérias benéficas como o *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, melhorando o desempenho de frangos, além de diminuir a atividade de algumas bactérias como *Salmonella ssp.* (FILHO; SAMPAIO, 1999).

Na aquicultura alguns autores citam a utilização do frutooligossacarídeo e os resultados obtidos mostram que a suplementação dietética desse prebiótico atua sobre o desempenho como a taxa de crescimento específico e conversão alimentar (AI, 2011), melhora da resposta imune inata, como atividade da lisozima, lisozima sérica e resistência ao estresse quando suplementados com (FOS) (SOLANEIME et. al, 2012), promovem melhorias nos parâmetros hematológicos como concentração de eritrócitos, leucócitos e trombócitos (DEON, 2021).

### 3.5 Ácidos orgânicos

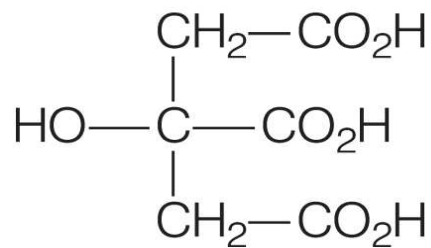
Os ácidos orgânicos e seus sais são ácidos de cadeia curta (C1- C7) descoberto por Carl Wihelm Scheele dentre os anos (1742-1786), possuem uma estrutura (R-COOH) e são considerados acidificantes fracos (FLORUCCI; FLORA; CAVAREIRO, 2002). Segundo Mroz (2005), esses ácidos têm a capacidade de: destruir ou impedir o crescimento de algumas bactérias patogênicas através do rompimento do citoplasma; liberar íons de H<sup>+</sup> diminuindo o pH do meio e impedir a proliferação de bactérias prejudiciais ao hospedeiro; diminuir o pH gástrico colaborando para a ação de enzimas digestivas como a pepsina e quimiotripsina. Os ácidos orgânicos são utilizados para a conservação de alimentos, pela sua ação da queda de pH impedindo ou retardando as perdas por ação de microrganismos (FOODS INGREDIENTS BRASIL, 2012).

Na alimentação animal os ácidos orgânicos são classificados como aditivo zootécnico segundo a *instrução normativa nº 44, de 15/12/2015*, (MAPA, 2015). Estudos em diferentes espécies inclusive em tilápia do Nilo mostram que com a suplementação desse aditivo na dieta influência positiva na morfologia intestinal, aumentando a altura de vilos, reduzindo bactérias patogênicas devido à redução do pH intestinal e dissociação dos ácidos orgânicos rompendo o citoplasma e destruindo bactérias (SILVA, 2018; MROZ, 2005), aumentando a digestão de proteínas (ANDRADE et. al., 2016), conversão alimentar, taxa de crescimento (AMORIM, 2018) e ganho de peso (SILVA et. al., 2008).

#### 3.5.1 Ácido cítrico

O ácido cítrico é encontrado principalmente em frutas cítricas, muito utilizado pela indústria como conservante, acidulante e antioxidante em alimentos, bebidas, lácteos e na agricultura por sua capacidade de aumentar a disponibilidade de alguns minerais para as plantas (FOODS INGREDIENTS BRASIL, 2012). Em 1784 composto conhecido quimicamente como 2-hidroxi-1,2,3 propanotricarboxílico cuja fórmula é (C<sub>6</sub> H<sub>8</sub> O<sub>7</sub>) foi cristalizado a partir do suco de limão e possui sua acidez graças aos seus três grupos carboxilas, tendo a capacidade de perder prótons e formar íons de citratos que controlam as soluções ácidas (FOODS INGREDIENTS BRASIL, 2012; MROZ, 2005).

**Figura 02. Fórmula estrutural do ácido cítrico.**



**Fonte: (FLORUCCI, FLORA E CAVAREIRO, 2002).**

Cerca de 90 % do ácido cítrico é produzido atualmente é pelo processo de fermentação a partir cana de açúcar (sacarose) e do farelo de trigo (amido), são inoculados com o fungo *Aspergillus niger* para sintetizar o ácido cítrico (FOODS INGREDIENTS BRASIL, 2014). A utilização na piscicultura como suplementação tem um objetivo parecido com os outros ácidos orgânicos, no entanto destaca-se por sua característica de sabor agradável e inodoro (MROZ, 2005), trabalhos mostram a redução do pH da ração e aumento da atividade da fitase, enzima que quebra o fitato possibilitando melhor absorção dos minerais, melhor ganho de peso, conversão alimentar e fortalecimento do sistema imune e saúde do animal (BARUAH, et. al., 2005; HOSSAIN; PANDEY; SATOH, 2007).

### **3.6 Sistema imune**

Os peixes possuem um sistema de defesa que é dividido em sistema imune inato (não específico), e sistema imune específico. O sistema imune inato não necessita de contato com o agente etiológico para ação de defesa, onde ocorre primeiramente a ação do tegumento que é compostos pelas barreiras físicas como escamas, pele e muco, logo após terá ação da imunidade celular que é composta por células fagocitárias como os macrófagos, neutrófilos basófilos e células *natural killer* que realizam a fagocitose de patógenos após entra em ação substâncias do sistema humoral componentes como lisozima, proteína C reativa (PRC) e as proteínas do sistema complemento que estão presentes no soro e muco que agem quimicamente prevenindo a entrada de microrganismos patogênicos (ELLIS, 1999; ELLIS 2001; URIBE, 2011). A lisozima é uma enzima produzida pelos leucócitos e está comumente presente no muco e soro, tem ação bactericida lizando a membrana de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (URIBE, 2011).



Os órgão linfoides (timo, baço e o rim) são os órgãos responsáveis pela produção de células de defesa, o baço e o rim encefálico são os órgão responsáveis pela hematopoese, já o timo é responsável pela produção de linfócitos T que recebem a resposta do antígeno liberando células citotóxicas que juntamente da ativação das células fagocitárias agem para destruir o patógeno, processo esse que é denominado sistema específico dos peixes (ELLIS 2001; URIBE, 2011).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Arranjo experimental

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Dois Vizinhos- PR (protocolo n° 2020-015). O experimento foi desenvolvido no laboratório de nutrição e sanidade de peixes na Unidade de Ensino e Pesquisa de Piscicultura - UNEPE PISCICULTURA da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos- PR. Espécimes de juvenis de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) adquiridos em piscicultura comercial foram mantidos na UNEPE. Antes do início do experimento, os peixes passaram por um período de 15 dias de aclimação ao ambiente e foram alimentados com duas refeições diárias (09h00m e 17h00m) até aparente saciedade com a dieta do tratamento controle.

Posteriormente ao período de aclimação e para o início do experimento, os peixes foram sedados com benzocaína (1:10.000), pesados individualmente ( $47,5 \pm 3,89$  g) e separados em lotes homogêneos com 12 exemplares, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado em 12 caixas redondas de polietileno (250 L), sendo quatro tratamentos (T1= 1,5% de ácido cítrico, T2= 1,5% de ácido cítrico + 0,2% de FOS, T3= 0,2 % de FOS, T4= Controle) e três repetições para cada tratamento (n=3). As caixas permaneceram conectadas em um sistema de fechado de recirculação de água com aeração forçada. Os animais permaneceram recebendo as dietas experimentais duas vezes ao dia (9h00m e 17h00m) até a aparente saciedade. Após os 48 dias do fornecimento, os peixes foram submetidos a um jejum de 24 horas, posteriormente foram sedados com benzocaína (1:10.000) para a coleta do material biológico referente a primeira parte do experimento. Para a realização da segunda parte do experimento os peixes foram submetidos a estresse por meio do fornecimento das dietas experimentais com cortisol (400 mg de hidrocortisona/ kg da dieta) por um período de 10 dias e no final realizado a segunda coleta do material biológico para posterior análises. Durante todo período experimental foram avaliados os parâmetros de qualidade de água (pH, oxigênio dissolvido e amônia) além da temperatura da água (Tabela 1).

**Tabela 1. - Parâmetros físico-químicos da qualidade de água**

Temperatura °C	O <sub>2</sub> D (Mg/L)	pH	Amônia tóxica (ppm)
22,50±2,10	6,30±1,12	7,37±0,78	0,27±0,07

Fonte: Autoria própria (2022)

## 4.2 Dieta experimental

Os ingredientes da dieta formulada foram adquiridos em agropecuárias da região, moídos em uma granulometria de 0,03 mm, misturados com os devidos tratamentos (tabela 2) e extrusados em partículas de 2 mm de diâmetro na UNEPE piscicultura, com o auxílio de uma extrusora com capacidade de 40 kg/ hora e secador rotativo. Após a extrusão, as rações foram secas em estufa de ventilação forçada a 40°C por 24 horas e armazenadas a -5°C, até o momento do uso. Todas as matéria-primas foram submetidas a análise de proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria seca (MS) e matéria mineral (MM) de acordo com o método *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1999). A proteína bruta (N x 6,25) foi determinada pelo método Kjeldahl, matéria seca determinada em estufa a 105°C, a matéria mineral em forno mufla de 550-600°C. A fibra bruta determinada pela digestão ácido/básica e o extrato etéreo em extrator Ankon® (XT15) (Tabela 3).

**Tabela 2. Formulação, composição aproximada das dietas.**

Ingredientes	Tratamentos (%)			
	Ácido cítrico	Ácido cítrico + FOS	FOS	Controle
Farinha de vísceras	33,81	33,81	33,81	33,81
Farelo de soja 46,87%	28,6	28,6	28,6	28,6
Milho 7,88%	23,74	23,74	23,74	23,74
Farelo de trigo	10	10	10	10
Óleo de soja	0,83	0,83	0,83	0,83
Ácido cítrico	1,5	1,5	-	-
FOS	-	0,2	0,2	-
Inerte	0,5	0,3	1,8	2
Sup. Vitamina/mineral	1	1	1	1
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02
Total	100	100	100	100

Fonte: Autoria própria (2022). Composição mineral-vitáminica (Tectron, Toledo - PR, Brasil) kg dieta – 1: vitamina A: 1.000.000UI, vitamina D3: 500.000UI, vitamina E: 20.000UI, vitamina K3: 500mg, vitamina B1: 1.900 mg, vitamina B2: 2.000 mg, vitamina B6: 2.400 mg, vitamina B12: 3.500 mg, niacina: 5.000 mg, ácido pantotênico: 4.000 mg, ácido fólico: 200 mg, biotina: 40 mg, vitamina C: 25g, colina: 100.000 mg, selênio: 70 mg, ferro: 12,5 g, cobre: 2.000 mg, manganês: 7.500 mg, zinco: 25 g, iodo: 200 mg, BHT: 300 mg.

**Tabela 3. Composição proximal analisada.**

<b>Nutriente</b>	<b>Dieta</b>
Proteína (%)	39,36±0,3872
Extrato Etéreo (%)	7,33±0,3663
Energia Bruta (kcal/kg)	3539,01±3,44
Fibra bruta (%)	2,42±0,6746
Extrato não nitrogenado (%)	42,28±0,33
Matéria Mineral (%)	8,23±0,0780
Matéria seca (%)	91,45±0,3159

Fonte: **Autoria própria (2022).**

### **4.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos**

Após o fim de cada período experimental, 3 animais de cada repetição (12 peixes por tratamento) foram sedados em solução alcoólica de benzocaína (1:10.000) e retirado sangue de através da punção do vaso caudal com auxílio de seringas plásticas descartáveis de 3 ml umedecidas com heparina. Foram avaliados os seguintes indicadores: estimativa da concentração da hemoglobina (Hb), valor do hematócrito (Ht), contagem total dos eritrócitos (CTE), contagem total dos leucócitos (CTL) e trombócitos (CTT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e glicose sanguínea.

#### **4.3.1 Determinação da concentração de hemoglobina**

Para avaliação da concentração de hemoglobina, foi adotado o método da cianometa-hemoglobina (BLAXHALL; DAISLEY, 1973), que consiste na oxidação do átomo de ferro da molécula de hemoglobina pelo ferricianeto de potássio, formando a metahemoglobina que é convertida em cianometa-hemoglobina após a reação com cianeto de potássio, onde 20 µL de sangue foram diluídos em 5 mL em reagente de cor de hemoglobina, após 10 minutos a amostra foi centrifugada (10000 rpm por 15 minutos) para sedimentação do núcleo dos eritrócitos, e recolhido o sobrenadante para leitura de absorbância em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 540 nm e os resultados expressos em (g/100 mL).

#### **4.3.2 Contagem total de eritrócitos**

Para determinação de total de eritrócitos, alíquotas de sangue foram diluídas em um tubo de ensaio na proporção 20 µL para 4 mL de solução formol citrato (3,8 g citrato de sódio; 2,0

mL de formol 40% e água destilada 100 mL), após foi feita a contagem em uma câmara de Neubauer nos 25 quadrados centrais dos dois lados da câmara, o resultado foi expresso em número de eritrócitos/ mm<sup>3</sup>.

#### 4.3.3 Valor do hematócrito

Para calcular o hematócrito, amostras de sangue homogeneizadas foram introduzidas em capilares para o microhematócrito com uma das extremidades selada, centrifugados por 5 minutos a (10000 rpm) em uma centrifuga microhematócrito (GOLDEFARB et al., 1971) e após realizado a avaliação com auxílio de uma tabela de microhematócrito expressa como volume de eritrócitos/100 cm<sup>3</sup>.

#### 4.3.4 Variáveis hematimétricas

As variáveis hematimétricas foram determinadas a partir dos cálculos propostos por Windrobe (1934):

$$\text{Volume corpuscular médio (fL)} = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{n}^\circ \text{ total de eritrócitos}}$$

$$\text{Hemoglobina corpuscular média} = \frac{\text{Concentração de hemoglobina}}{\text{n}^\circ \text{ total de eritrócitos}}$$

$$\text{Concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL)} = \frac{\text{Concentração de hemoglobina} \times 100}{\text{hematócrito}}$$

#### 4.3.5 Determinação da concentração de leucócitos e trombócitos

A contagem de leucócitos e trombócitos foi realizada através da confecção de 3 extensões sanguíneas de cada animal em lâminas de vidro com extremidade fosca, secas ao ar e submetidas a coloração pelo método de Rosenfeld (1947), a leitura foi realizada em microscópio óptico de luz em maior aumento, com óleo de imersão e a contagem total de leucócitos e trombócitos foi realizada pelo método indireto (MARTINS et al., 2004) pela seguintes fórmulas:

$$\text{Leucócito } (\mu\text{L}) = \frac{\text{n}^\circ \text{ leucócitos} \times \text{n}^\circ \text{ eritrócitos (por } \mu\text{L)}}{\text{n}^\circ \text{ eritrócitos contados na extensão sanguínea}}$$

$$\text{Trombócitos } (\mu\text{L}) = \frac{\text{n}^\circ \text{ trombócitos} \times \text{n}^\circ \text{ eritrócitos (por } \mu\text{L)}}{2000 \text{ eritrócitos contados na extensão sanguínea}}$$

#### 4.3.6 Contagem diferencial de leucócitos

Para contagem diferencial das células de defesa (leucócitos) foram realizadas duas extensões sanguíneas de cada animal em lâminas com extremidade fosca. As lâminas foram então secas ao ar e submetidas à coloração pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em microscópio óptico de luz em maior aumento, com óleo de imersão. Foram contadas 100 células em cada lâmina, e o resultado expresso em % de cada tipo celular (linfócito, neutrófilo, monócito e eosinófilo) e depois, calculados o número absoluto de cada um com relação ao número total de leucócitos observados na câmara de Neubauer (MARTINS et al., 2004)

### 4.4 Avaliação dos parâmetros imunológicos

#### 4.4.1 Atividade respiratória dos leucócitos (*burst oxidativo*)

Para dosagem, 0,1 mL do sangue coletado foram adicionados a 0,1 de *nitroblue tretazolium*, homogeneizada e incubada por 30 minutos a 25°C. Após a incubação, 50 µL da solução suspensa homogeneizada foram colocados em um tubo de vidro com 1,0 mL de N, N-dimetil formamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugado (3000 rpm por 5 minutos). Logo após foi realizada a leitura em absorbância, da solução e espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm.

#### 4.4.2 Concentração de lisozima sérica

Utilizando o plasma dos peixes e por ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1990) e adaptado por Abreu et al. (2009), foi realizada a concentração de lisozima plasmática.

Antes da determinação da concentração de lisozima das amostras de soro dos peixes, foi realizada a curva padrão de calibração pela quantificação das diferenças de densidade ópticas iniciais e finais ( $\Delta DO$ ) de diferentes concentrações de lisozima padrão (Sigma L 6876). Para determinação da curva padrão foram utilizadas diferentes concentrações de tampão padrão 250, 220, 200, 140, 100 µL para as diferentes concentrações de tampão fosfato de sódio ( $NaH_2PO_4$ ; 0,05M; pH 7,4) 50, 80, 100, 160, 200, 300 µL em suspensão de 300 µL de *Micrococcus lisodeikticus* (37,5 mg bactéria diluída em 50 mL de tampão fosfato de sódio), mensurados em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. Um branco foi realizado contendo apenas tampão fosfato (600 µL). A partir da curva determinada (figura 3) foram quantificadas as concentrações de lisozima nas diversas amostras utilizando a equação

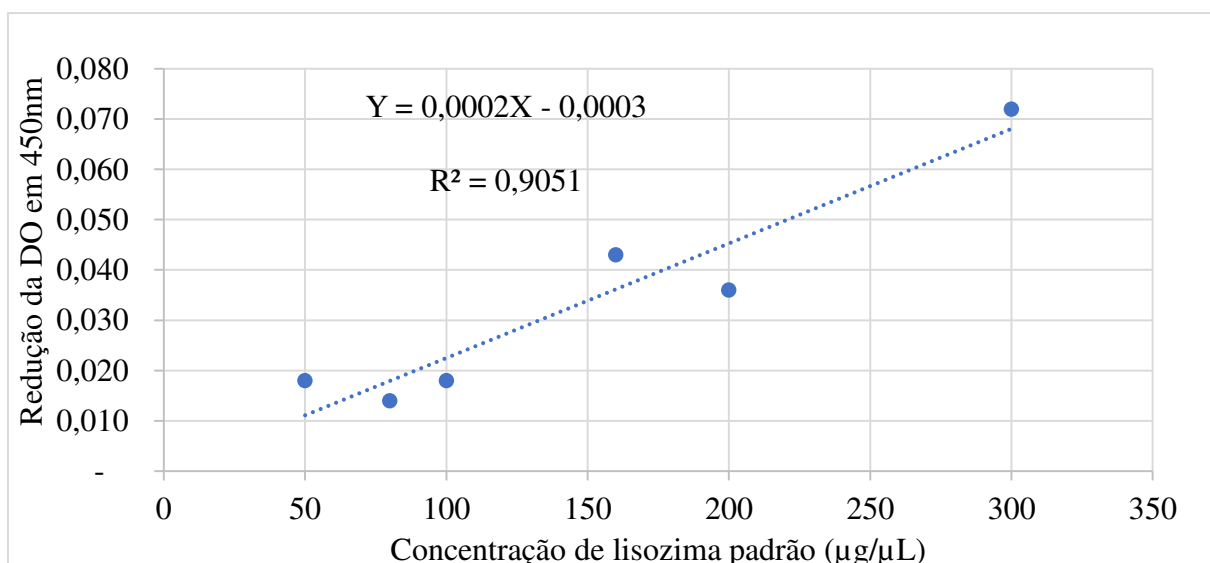
da reta e as respectivas  $\Delta DO$ . Para tal, as amostras sanguíneas foram centrifugadas (3000 rpm por 10 minutos) para obtenção do plasma e armazenadas a (-20°C) para posterior análise.

As amostras de plasma foram submetidas ao tratamento térmico (banho maria a 56°C por 30 minutos) para desnaturação e inativação das proteínas do sistema complemento, em seguida foram adicionadas em uma cubeta de 1,0 mL e pipetado 150  $\mu\text{L}$  de plasma ao qual foi adicionado 150  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio e em seguida incubada a 26°C por dois minutos. Após esse período, foi adicionado mais 300  $\mu\text{L}$  da suspensão de *M. lysodeikticus* totalizando um volume final de 600  $\mu\text{L}$ . A redução da densidade óptica ( $\Delta DO$ ) em 450 nm foi avaliada entre 0,5 e 5,0 minutos a 26°C. Os resultados expressos em  $\mu\text{g/mL}$  de plasma.

#### 4.4.3 Determinação de lisozima no muco

Para o procedimento de coleta do muco foi utilizado o protocolo proposto por Ross e Moldeus (1991). Os peixes foram sedados em solução alcoólica de benzocaína (1:10.000), transferidos para embalagens plásticas contendo 5 mL de solução contendo 100 mM de bicarbonato de amônia ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), pH 7,8 e massageados durante um minuto. O extrato com muco foi transferido para tubos tipo Falcon, e centrifugado (2730 rpm) durante 15 minutos para a remoção de escamas e outros materiais insolúveis, congelados a -20°C e então liofilizados para posterior análise da concentração de lisozima do muco. Para a determinação da concentração de lisozima no muco, o extrato do muco foi liofilizado e ressuspensão em igual volume de tampão fosfato seguindo o mesmo procedimento da análise realizada no plasma.

**Figura 3 - Curva de calibração lisozima plasmática e no muco**



Fonte: Autoria própria (2022).

#### 4.4.4 Determinação da glicose plasmática.

Para determinação da concentração de glicose, uma alíquota de plasma (10  $\mu$ L) por peixe foi adicionado a 1 mL de reagente enzimático K082 (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brazil). A solução foi homogeneizada e incubada a 37°C por 10 minutos, após incubação, a densidade óptica (OD) da solução final foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 512 nm.

#### 4.5 Análise estatística

Para avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros de hematologia e imunidade os dados obtidos serão submetidos a análise de variância ANOVA, e quando significativas comparadas as médias pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).



## 5 Resultados.

### 5.1 Análise hematológicas e imunológicas

A análise de variância para os parâmetros hematológicos e imunológicos em relação aos tratamentos, tempos de coleta e a interação tempo e tratamento estão representados na tabela 4.

**Tabela 4. Análise de variância ANOVA dos parâmetros hematológicos de juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) para os tratamentos, tempos experimentais e interação entre tempos e tratamentos experimentais de coleta ( $\alpha = 0,05$ )**

Variáveis	Valor de P		
	Tratamentos	Tempo	Interação (Tratamento X Tempo)
Eritrócitos	0,4593	0,1699	0,0943
HTC (%)	<0,0004	<0,0001	0,4189
Hemoglobina (g/dL)	<0,0113	<0,0001	0,0591
Proteína total (g/dL)	0,3302	<0,0001	0,3486
VCM (f-L)	0,0564	<0,0001	0,1455
HCM (pg/cel)	<0,0018	<0,0001	0,1594
CHCM (g/dL)	<0,0006	<0,0001	<0,0038
Leucócitos (uL)	<0,0451	<0,0001	0,0512
Trombócitos (uL)	0,3594	0,3388	0,2724
Monócitos (uL)	0,1219	0,2132	0,0822
Neutrófilos (uL)	0,6169	<0,0001	0,4508
Linfócitos (uL)	<0,0124	<0,0001	0,0609
Burst oxidativo (abs)	0,1248	<0,0001	0,5851
Glicose (mg/dL)	0,5057	<0,0033	0,8339
Lisozima sérica ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,48	<0,009	0,6067
Lisozima no muco ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,3792	<0,0216	0,4576

Fonte: A autoria própria (2022).

A variável do hematócrito HTC (%) com a suplementação de FOS e associação de FOS + ácido cítrico foi superior significativamente ( $P < 0,05$ ) a suplementação de ácido cítrico, entretanto quando comparada com a dieta controle não se observou efeito ( $P > 0,05$ ). Já o volume corpuscular médio obteve maior valor na dieta com suplementação de FOS em comparação a dieta controle ( $P < 0,05$ ). Apesar da hemoglobina corpuscular média (HCM) apresentar maior valor na dieta suplementada com FOS em relação a dieta somente com ácido cítrico, não diferiu significativamente da dieta controle e dieta de ácido cítrico associado com FOS  $P < 0,05$ ). A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), apesar da

suplementação com FOS não ter diferido da dieta controle, apresentou maiores valores quando se comparada aos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Na contagem total de leucócitos, apesar de não apresentar valores significativamente diferentes ( $P > 0,05$ ) da dieta controle e dieta com ácido cítrico, a associação de ácido cítrico + FOS apresentou-se maior quando comparado com a suplementação dietética de FOS. Já a contagem de monócitos apresentou maiores valores na dieta suplementada com ácido cítrico + FOS ( $P < 0,05$ ), contudo não houve diferença sobre os demais tratamentos. Apesar dos tratamentos não diferirem da dieta controle ( $P > 0,05$ ), na associação de ácido cítrico + FOS, a contagem total de linfócitos apresentou maiores valores sobre a dieta suplementada de ácido cítrico e dieta suplementada com FOS (tabela 5).

**Tabela 5 – Média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e imunológicos de Juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) suplementadas por 48 dias com os diferentes tratamentos.**

Parâmetros	Tratamentos tempo 0			
	Ácido cítrico	Ácido cítrico + FOS	FOS	Controle
Eritrócitos ( $10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	458277,78 $\pm$ 68010	484764,71 $\pm$ 57788,97	462722,22 $\pm$ 69390,46	495000,00 $\pm$ 52422,49
HTC (%)	26,06 $\pm$ 3,67 b	30,03 $\pm$ 4,41 a	29,72 $\pm$ 3,12 a	27,08 $\pm$ 3,37 ab
Hemoglobina (g/dL)	13,92 $\pm$ 8,74	13,78 $\pm$ 2,13	21,38 $\pm$ 10,67	19,00 $\pm$ 11,42
Proteína total (g/dL)	5,14 $\pm$ 0,21	5,06 $\pm$ 0,26	5,19 $\pm$ 0,32	5,10 $\pm$ 0,26
VCM (f-L)	583,68 $\pm$ 129,48 ab	633,24 $\pm$ 119,72 ab	656,57 $\pm$ 127,16 a	552,16 $\pm$ 83,69 b
HCM (pg/cel)	274,78 $\pm$ 151,48 b	305,85 $\pm$ 98,28 ab	490,81 $\pm$ 287,62 a	367,78 $\pm$ 243,09 ab
CHCM (g/dL)	43,01 $\pm$ 11,83 b	46,23 $\pm$ 6,44 b	71,37 $\pm$ 32,75 a	59,77 $\pm$ 30,94 ab
Leucócitos (uL)	5921,80 $\pm$ 2304,58 ab	7459,19 $\pm$ 2307,25 a	5347,02 $\pm$ 2032,23 b	5643,39 $\pm$ 2609,69 ab
Trombócitos (uL)	15393,28 $\pm$ 4939,39	16175,12 $\pm$ 5862,99	15153,88 $\pm$ 5515,20	12078,16 $\pm$ 3999,80
Monócitos (uL)	981,58 $\pm$ 627,24 ab	1479,06 $\pm$ 757,58 a	1110,66 $\pm$ 664,51 ab	806,82 $\pm$ 511,34 b
Neutrófilos (uL)	489,72 $\pm$ 396,99	677,45 $\pm$ 403,64	540,45 $\pm$ 354,52	634,94 $\pm$ 354,68
Linfócitos (uL)	4450,48 $\pm$ 1737,71 ab	5210,59 $\pm$ 1505,70 a	3690,48 $\pm$ 1503,10 b	4051,28 $\pm$ 2042,02 ab
Burst oxidativo (abs)	0,48 $\pm$ 0,15	0,54 $\pm$ 0,08	0,56 $\pm$ 0,11	0,49 $\pm$ 0,05
Glicose (mg/dL)	51,63 $\pm$ 11,03	55,64 $\pm$ 12,49	46,96 $\pm$ 16,58	49,19 $\pm$ 14,71
Lisozima sérica ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,86 $\pm$ 0,43	0,80 $\pm$ 0,78	1,01 $\pm$ 0,32	1,02 $\pm$ 0,37
Lisozima no muco ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,69 $\pm$ 0,53	0,73 $\pm$ 0,36	0,76 $\pm$ 0,45	0,82 $\pm$ 0,24

**Fonte: Autoria própria (2022). Dieta com 1,5 % de ácido cítrico, dieta com 1,5% de ácido cítrico + 0,2 % de FOS, dieta com 0,2% de FOS e dieta controle. Diferentes letras ao lado de cada linha/coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).**

Após o período de estresse com cortisol, a dieta suplementada com FOS foi superior significativamente a dieta controle na variável porcentagem de hematócrito, no entanto não diferiu dos demais tratamentos. Já na dieta suplementada com FOS a contagem total de

linfócitos apresentou menor valor comparada a dieta controle, no entanto não diferiu dos demais tratamentos ( $P>0,05$ ) (tabela 6).

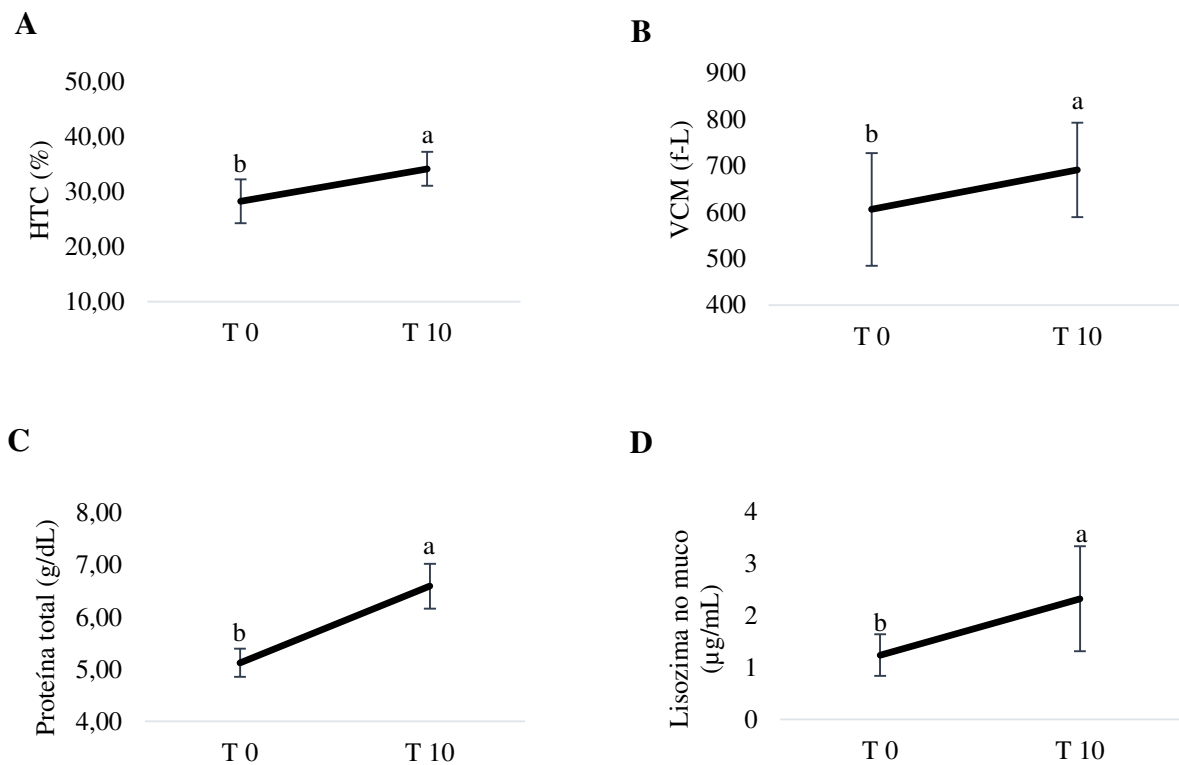
**Tabela 6– Média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e imunológicos de Juvenis de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) suplementadas com os diferentes tratamentos após 10 dias de período de estresse com cortisol.**

Parâmetros	Tratamentos tempo 10			
	Ácido cítrico	Ácido cítrico + FOS	FOS	Controle
Eritrócitos	478125,00 ± 58310,52	484777,78 ± 42798,51	516125,00 ± 62245,61	478125,00 ± 62542,65
HTC (%)	32,89 ± 3,68	34,89 ± 3,20	34,78 ± 2,31	33,94 ± 2,75
Hemoglobina (g/dL)	10,38 ± 1,93 ab	10,04 ± 1,37 ab	11,48 ± 1,89 a	9,71 ± 1,61 b
Proteína total (g/dL)	6,46 ± 0,39	6,67 ± 0,52	6,71 ± 0,31	6,55 ± 0,47
VCM (f-L)	674,65 ± 103,73	721,74 ± 57,89	685,06 ± 82,45	704,68 ± 121,88
HCM (pg/cel)	204,82 ± 41,81	207,69 ± 29,64	226,13 ± 21,48	223,54 ± 111,01
CHCM (g/dL)	31,66 ± 5,45	28,99 ± 4,71	33,04 ± 5,85	28,92 ± 5,77
Leucócitos (uL)	3623,59 ± 1788,91	3013,49 ± 1323,03	2458,09 ± 1340,00	3663,49 ± 1785,05
Trombócitos (uL)	13716,67 ± 5003,14	14478,27 ± 4378,33	13034,15 ± 5586,07	14226,64 ± 5739,65
Monócitos (uL)	928,31 ± 405,09	1004,37 ± 537,17	877,91 ± 568,33	1060,69 ± 669,84
Neutrófilos (uL)	310,33 ± 197,03	227,06 ± 149,84	248,56 ± 162,92	325,09 ± 185,90
Linfócitos (uL)	2394,31 ± 1376,46 a	1669,07 ± 995,42 ab	1205,31 ± 650,36 b	2247,40 ± 1121,96 a
Burst oxidativo (abs)	0,28 ± 0,17	0,25 ± 0,06	0,37 ± 0,22	0,24 ± 0,11
Glicose (mg/dL)	44,53 ± 17,75	40,34 ± 15,18	36,60 ± 12,14	40,88 ± 13,09
Lisozima sérica (µg/mL)	2,49 ± 1,10	1,99 ± 1,20	2,83 ± 1,05	2,14 ± 1,14
Lisozima no muco (µg/mL)	0,94 ± 0,51	1,03 ± 0,59	1,27 ± 0,80	1,10 ± 0,96

**Fonte: Autoria própria (2022). Dieta com 1,5 % de ácido cítrico, dieta com 1,5% de ácido cítrico + 0,2 % de FOS, dieta com 0,2% de FOS e dieta controle. Diferentes letras ao lado de cada linha indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).**

Após o período de estresse com cortisol, a porcentagem do hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) (f-L), proteína total (g/dL) e lisozima no muco ( $\mu\text{g/mL}$ ) tiveram aumento significativo ( $P < 0,05$ ) (figura 4).

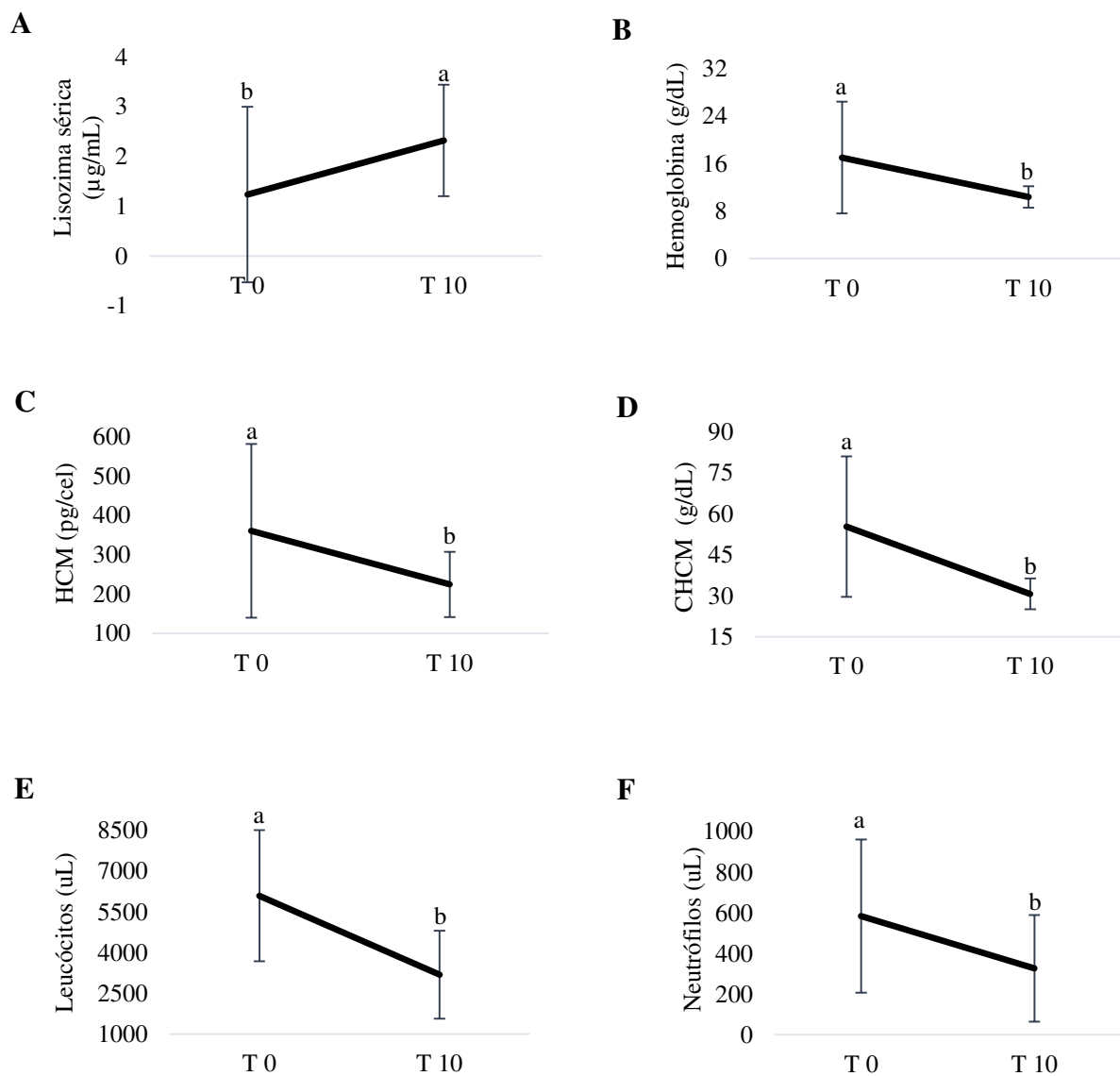
**Figura 4: Porcentagem do hematócrito (A), volume corpuscular médio (B), proteína sérica total (C) e Lisozima no muco (D) de Juvenis de Tilápia do Nilo antes e depois do estresse com cortisol.**



**Fonte: Autoria própria (2022). Tempo 0 (T 0), tempo 10 (T 10). Diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).**

A lisozima sérica também apresentou aumento significativo, entretanto, para a concentração de hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), número total de leucócitos e a contagem diferencial de neutrófilos o comportamento dos dados foi observado o oposto, ou seja, apresentaram queda significativa ( $P < 0,05$ ) após o estresse com cortisol (figura 5).

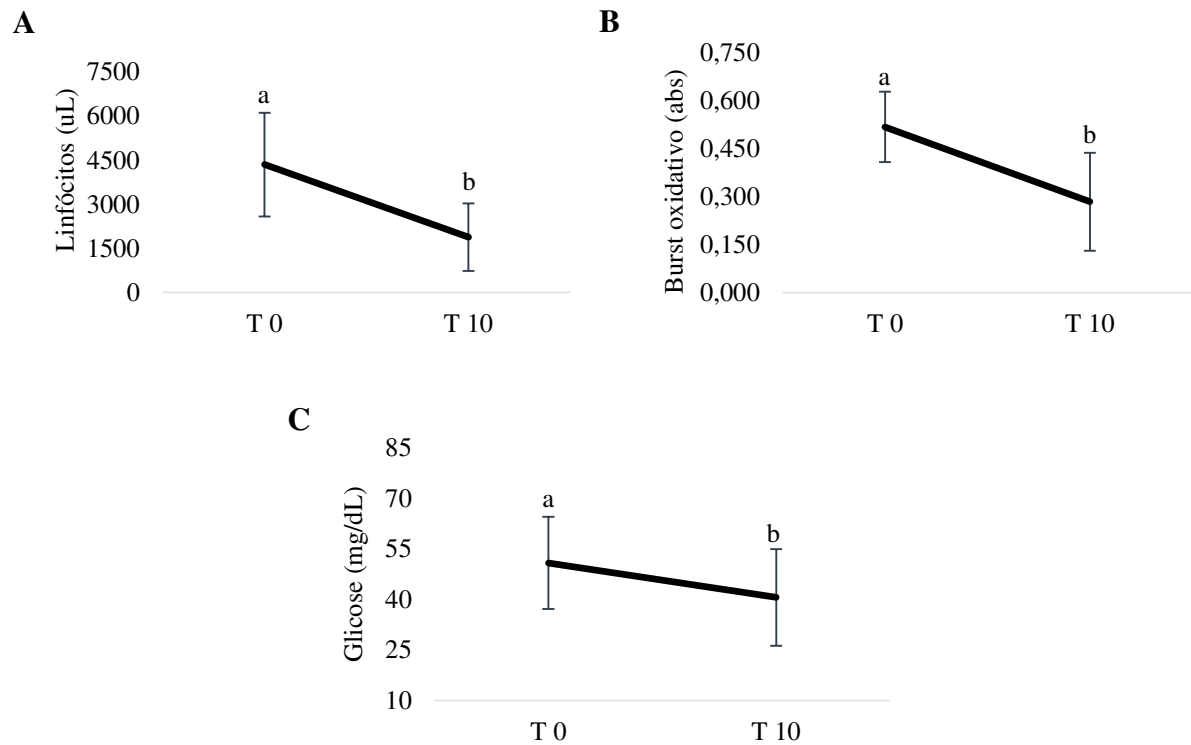
**Figura 5: Lisozima sérica (A), concentração de hemoglobina (B), hemoglobina corpuscular média (C), concentração de hemoglobina corpuscular médio (D), total de leucócitos (E) e diferencial de neutrófilo de juvenis de Tilápia do Nilo antes e depois do estresse com cortisol.**



Fonte: Autoria própria (2022). Tempo 0 (T 0), tempo 10 (T 10). Diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

A contagem diferencial de linfócitos, glicose sanguínea e atividade respiratória dos leucócitos (burst oxidativo) também obtiveram queda significativa ( $P < 0,05$ ), após o estresse com cortisol (figura 6).

**Figura 6: Contagem diferencial de linfócitos (A), burst oxidativo (B) e glicose sanguínea (C) de juvenis de Tilápia do Nilo antes e depois do estresse com cortisol.**



Fonte: Autoria própria (2022). Tempo 0 (T 0), tempo 10 (T 10). Diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

As variáveis hematológicas e imunológicas são parâmetros imprescindíveis para avaliar as condições de saúde e estresse nos peixes (MARTINS et al., 2009; KHAKPOUR, 2011; ROBERTS; RODGER, 2012; FIROUZBAKHSI et al., 2014; SOLTAN et al., 2017; AHMED, 2020).

Apesar de os tratamentos diferirem entre si no presente estudo, não tiveram capacidade imunomodulatória sobre o sistema hematológico e imunológico dos peixes em condições normais ou quando expostos a estresse quando comparados com o tratamento controle. Semelhante a (HOSEINAFAR, 2016; BUENTELLO et al., 2010;) quando avaliados os parâmetros imunológicos de carpa comum e tambor vermelho com dieta suplementada de FOS, também de acordo com os resultados dos estudos realizados com camarão branco (*L. vannamei*), corvina juvenil (*Argyrosomus regius*) e salmão do atlântico (*Salmo salar*) (1% FOS) (LI et al., 2007; AI et al., 2011; GRISDALE HELLAND et al., 2008).

No entanto os tratamentos com a inclusão de FOS e associação com ácido cítrico apresentaram resultados superiores significativamente a dieta suplementada com ácido cítrico para as análises de hematócrito, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média. Já para volume corpuscular médio a suplementação de FOS apresentou resultados maiores significativamente quando comparada com a dieta controle. Essa leve superioridade ao ácido cítrico se deve aos efeitos benéficos que o FOS proporciona, melhorando os parâmetros hematológicos, respostas imunes inatas dos peixes e resistências a doenças, relatados nos estudos com carpa capim (*Ctenophar yngodon idellus*) (0,2% FOS) (Lu et al., 2010) e carpa prateada (*Cyprinus carpio*) (0,1 e 0,2% FOS) (Wang et al., 2008).

O número total de leucócitos e seu diferencial pode estar associado ao estímulo do sistema imune ou quando expostos a estresse agudo, (HRUBEC et al., 1997; ZARAGOZA et al., 2008). No presente estudo, observou-se maior valor no número total de leucócitos na dieta com associação de ácido cítrico + FOS apesar de não diferir da dieta controle e dieta com ácido cítrico. Já os monócitos são células fagocitárias e seu aumento no presente estudo corrobora com a melhoria da imunidade e tentativa do organismo eliminar possíveis patógenos presentes (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; MARTINS et al, 2004). Apesar de não diferir da dieta controle e dieta de ácido cítrico, o número total de linfócitos foi superior significativamente nas dieta associada ácido cítrico + FOS. No entanto os dados obtidos são muito semelhantes a parâmetros normais de tilápia do Nilo (SADO; BICUDO; CYRINO, 2008; LAICE et al., 2021).

Apesar da diferença significativa em relação as dietas com FOS, a inclusão de ácido cítrico não influenciou os parâmetros hematológicos e imunológicos do presente estudo, mostrando que a acidificação na dieta não causa nenhum estresse, e os organismos conseguiram se adaptar aos efeitos da inclusão do ácido orgânico, sem alterar o metabolismo. Em concordância ao experimento de Khajepour et al., (2011), Cardoso (2016) e Nascimento et al. (2020) respectivamente, em beluga (*Delphinapterus leucas*), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*) suplementados com diferentes porcentagens de ácido cítrico, onde não foram observadas mudanças significativas nos parâmetros hematológicos e sistema imune em comparação a dieta controle.

A reação de resposta do organismo quando submetido ao estresse se divide em cascatas de reações fisiológicas, divididas nas seguintes fases; reações primárias, secundárias e terciárias. As reações primárias atuam na elevação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticosteroides (cortisol) no plasma sanguíneo. Dentre as secundárias o aumento da glicose sanguínea, ácido láctico e alterações nos parâmetros hematológicos e imunológicos. E se mantidos os efeitos por longos períodos de estresse, levam aos efeitos terciários que afetam no desempenho, reprodução e baixa resistência a doenças (BOON, 1991; BONGA, 1997). No presente estudo as variáveis hematológicas e imunológicas foram afetadas após o período de estresse com cortisol.

Os valores do hematócrito determinam a proporção de glóbulos vermelhos em relação aos brancos e parte líquida do sangue, e sua elevação é característica quando o organismo sofre exposição ao estresse (BARTON, 2000; WOJTASZEK et al., 2002; BRANDÃO; GOMES; CHAGAS, 2006). Neste estudo, maiores valores do hematócrito foram constatados após o período de estresse com cortisol. Em estudo realizado com adultos e juvenis de Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) quando expostos a diferentes estressores, obtiveram maiores valores do hematócrito quando maior prolongamento do estresse (WEDEMEYER; MCLAAY, 1981; MORAES; BIDINOTTO, 2020; FAGUNDES, 2005).

Fatores estressantes aumentam o metabolismo e a busca por maior aporte de oxigênio, conseqüentemente elevam a concentração de hemoglobina, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média (ZARAGOZA, 2008). No entanto, o presente estudo demonstrou que essas variáveis tiveram queda significativamente após o período com cortisol, semelhante aos resultados com garoupa juvenis (*Epinephelus guaza*) e carpa cruciana (*Carassius carassius*) (KIM, 2020; YANG et al., 2010) explicando que a resposta hematológica



é variável e depende da intensidade do estímulo e espécie estudada (IWAMA et al., 2004; FAGUNDES, 2005).

A Proteína sérica total é um indicador da alta resposta imune inata nos organismos aquáticos (ANDREWS et al., 2011) e seu aumento é um indício de que o animal está resistente imunologicamente (NAYAK et al.,2004). No presente estudo constatou-se o aumento de proteína sérica total após o período estressante. O estresse pode causar o aumento da proteína sérica nos peixes, devido a tentativa do organismo manter a osmorregulação (PANKHURST; DEDUAL,1994; RANZANI-PAIVA et al.,2004) semelhante ao encontrado nos estudos de Leamaster et al. (1990) e Pereira (2015), onde ambos constataram o seu aumento em Tilápia do Nilo expostas a situação de estresse em águas salinas. Melo et al. (2009) ao pesquisarem estresse por hipóxia também relatou maiores níveis da concentração de proteína total em machos de Tilápia do Nilo, diferentemente das fêmeas que sob as mesmas condições diminuiu os níveis dessa variável. Essa queda também foi observada em carpa comum submetida a estresse com piretroide cypermethrina (DOBSIKOVÁ et al.,2006).

As células brancas do sangue denominadas de leucócitos são responsáveis pela defesa dos organismos, atuando no sistema inespecífico e específico através da liberação do antígeno e fagocitose para eliminação do agente patogênico (VERLHAC; GABAUDAN, 1997; RANZANI-PAIVA et al., 2013; URBINATI et al., 2014; WANG et al., 2017) e sua quantidade é influenciada por fatores ambientais como o estresse (FIGUEREDO et al., 2014). Em estudos com *Oncorhynchus mykiss* e *Salvelinus fontinalis* submetidos a estresse de confinamento obtiveram queda no número de leucócitos (BENFEY; BIRON (2000). Jatobá et al. (2011) obteve redução no número de leucócitos devido as condições estressantes de águas de maior salinidade em estudo com Tilápia do Nilo cultivadas em conjunto com camarão. O mesmo foi observado por Martins et al. (2004) com Tilápia do Nilo submetidas a estresse por captura, difere dos resultados obtidos com Martins et al. (2002) em estudo com *Tambacus* submetidos ao mesmo tipo de estresse, que observou um aumento no número de leucócitos.

No presente estudo observou-se uma redução no número total de leucócitos e na contagem diferencial, essa redução se deve a imunossupressão causada pelo estresse prolongado (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Os leucócitos denominados de monócitos e neutrófilos são responsáveis por realizar a fagocitose de organismos estranhos (THRALL et al., 2007). A ação do hormônio cortisol reflete na redução do número de leucócitos e diminuição da atividade fagocitária (RIJNBEEK & MOL, 1997), isso se prova com a neutrofilia e

monocitofilia observada após o período de estresse no presente estudo. Os neutrófilos e monócitos liberam no decorrer da fagocitose espécies reativas a oxigênio (EROs) com objetivo de eliminar os patógenos, essa variável é quantificada na análise de atividade respiratória de leucócitos (*Burst oxidativo*) (BILLER-TAKAHASHI et al., 2013), no presente estudo também se observou redução após o período estressante.

Os linfócitos estão diretamente ligados a produção de anticorpos e resposta celular humoral, no entanto em situação de estresse a sua quantidade diminui (ELLIS, 1981; SILVA et al, 2012). No presente estudo se observou queda nos valores de porcentagem de linfócitos após o estímulo estressante. Semelhante aos resultados dos estudos de Sopinska (1984) em carpas (*Cyprinus carpio*) de Barton e Zitzow (1995) em picão verde (*Sander vitreus*) e Martins et al. (2002) submetidos a situações estressantes.

A Lisozima é uma proteína originária dos leucócitos, atua na lise da membrana celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo a primeira barreira do organismo contra patógeno e sua concentração está relacionada a maior atividade dos leucócitos (WATTS; MUNDAY, 2001; SURABH; SAHOO, 2008). No presente trabalho, apesar do número total de leucócitos ter queda, a concentração de lisozima sérica e no muco apresentaram aumento significativo após o período estressante, em concordância com estudos realizados com Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a estresse com *Aeromonas hydrophila* que apresentaram queda do número de leucócitos e elevação da lisozima, que coincide com a elevação das proteínas do sistema complemento e atuação de ambos em resposta ao antígeno (SABIONE, 2009).

O organismo animal sob condição de estresse acarreta em uma cascata de reações e liberação de hormônios para a manutenção da homeostase (BONGA, 1997). O Cortisol afeta o metabolismo de carboidrato, proteína e lipídeos. A liberação de catecolaminas gera uma hiperglicemia através da gliconeogênese hepática (WEENDELAR BONGA, 1997, REID et al., 1998; MOMMSEN et al., 1999), e maior quantidade de ácidos graxos livres e de glicerol para a gliconeogênese (VAN DER BOON et al., 1991). O aumento da glicose sanguínea está relacionada a condições estressantes por diversos autores, Vijayan et al. (1991) em *Salvelinus fontinalis* durante estresse agudo, Kubokawa et al. (1999) em machos e fêmeas de salmão, Martins et al. (2002) com híbrido de Pacu expostos a estresse por captura, Silva (2010) em Tilápia sobre estresse de hipóxia. Já Mazeaud e Mazeaud (1981) e Wendelaar Bonga (1997)

atribui a sua elevação devido a ação das catecolaminas que atuam no fígado para quebra do glicogênio e é mantida pelo cortisol por efeito gliconeogênico (MOMMSEN et al., 1999).

No presente estudo observou-se queda nos níveis de glicose sanguínea, o que também foi observado nos estudos de Matte (2013) e Becker et al. (2009) em (*Rhamdia quelen*) expostos a agroquímico como agente estressor, autores que correlacionam a sua queda a um alto consumo de glicose no processo metabólico quando o animal exposto a longo período de estresse. Melo (2008) observou queda e elevação nos níveis de glicose, respectivamente em machos e fêmeas de Tilápia do Nilo submetidos a estresse por hipóxia e explica que as alterações nos níveis de glicose é variável a espécie, sexo e tempo de estresse. A tentativa de manutenção da homeostase causa uma alta demanda energética diminuindo as concentrações de glicose em estresse agudo, outra possível relação a sua diminuição é atribuída ao *feedback* negativo na liberação de catecolaminas devido ao longo período de estresse (MELO,2008). As análises hematológicas e imunológicas são excelentes parâmetros para a avaliação estressante dos animais (BARTON, 2000; WOJTASZEK et al., 2002; CHAGAS, 2006; SOLTAN et al., 2017), os resultados do presente estudo mostram que os animais foram expostos a condições estressantes devido ao cortisol.

## **7 CONCLUSÃO**

A utilização de ácido cítrico e FOS não foi capaz de modular o sistema imune de tilápia do Nilo, no entanto sua associação pode trazer efeitos imunomodulatórios como o aumento da quantidade de células brancas. Os peixes submetidos a cortisol sofreram imunodepressão sendo que, os devidos tratamentos não conseguiram mitigar os efeitos estressantes causados pelo cortisol. É preciso que mais trabalhos sejam feitos para determinar o efeito dos aditivos e mitigação do estresse.

## 8 REFERÊNCIAS

ABREU, J. et al. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 4, p. 1133–1139, nov. 2009.

ACOPE (Associação dos Comerciantes de Pescado). **Feira Internacional SIAL**. 2018. Disponível em: <https://www.acope.pt/noticias/1138-feira-internacional-sial-2018-paris.html>> Acesso em: 29 set. 2019.

ADITIVOS E INGREDIENTES, **As propriedades do ácido cítrico e sua aplicação industrial**. 2018. Disponível em: [https://aditivosingredientes.com.br/upload\\_arquivos/201804/2018040954743001522680264.pdf](https://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201804/2018040954743001522680264.pdf)> Acesso em: 30 set. 2019.

ADITIVOS E INGREDIENTES. Aplicações industriais do ácido cítrico. **Revista Aditivos e Ingredientes**. Disponível em: <https://aditivosingredientes.com.br/artigos/ingredientes-funcionais/aplicacoes-industriais-do-acido-citrico>> Acesso em: 14 out. 2012.

AHMED1, I; RESHI, M. Q. The influence of the endogenous and exogenous factors on hematological parameters in different fish species: a review. **Aquaculture International**. V. 28, p 869–899, 2020.

AI, Q. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. **Aquaculture**. v. 317, p. 155-161. Jul. 2011.

Ai, Q., et al. Efeitos do suplemento dietético sobre a fermentação de *Bacillus subtilis* e fructooligossacarídeo no desempenho de crescimento, sobrevivência, resposta imune inespecífica e resistência a doenças de corvina juvenil, *Larimichthys crocea*. **Aquicultura**. 317, 155-16, 2011.

AMORIM, D.B. **Interações de níveis de ácidos orgânicos e de proteína digestível das dietas no desempenho e eficiência de utilização de nutrientes para tilápia do Nilo**. Dissertação de mestrado em aquicultura. Universidade Estadual Paulista- UNESP Centro de Aquicultura da UNESP. Jaboticabal, 2018.

ANDRADE, M.L.D.; TAKAHASHI, L.S.; SANTOS, G.L.S.; BILLER-TAKAHASHI, J.D.; SANTOS, L.R. **A adição de ácidos orgânicos em dietas para juvenis de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, melhora a taxa de eficiência protéica**. 1º Encontro Internacional de Ciências Agrárias e Tecnológicas Crise: tecnologias para a superação de desafios no setor agrário, 2016. Disponível em: <https://www.dracena.unesp.br/Home/Eventos/imast/001-res.pdf>> Acesso em: 10 out. 2019.

ANDREWS, S. R. et al. Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for *labeo rohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v.91. p. 103-109, 2011.

AOAC (Association Of Official Analytical Chemists). Official methods of analysis of AOAC International. 17th ed. Arlington: **AOAC International**, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. **Anuário peixe br**, 2022. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario2022/>> Acesso em: 30 maio. 2022.

ASSOCIAÇÃO DOS COMERCIANTES DE PESCADO. **Portugal é o país da União Europeia com maior consumo de peixe**. Lisboa, 2018. Disponível em: <<https://www.acope.pt/noticias/1115-portugal-e-o-pais-da-uniao-europeia-com-maior-consumo-de-peixe.html>> Acesso em: 10 out, 2019.

BARCELLOS, G. J. L.; FERREIRA, D. **Enfoque combinado entre as boas práticas de manejo e as medidas mitigadoras de estresse na piscicultura**. Instituto de Pesca de São Paulo. 2008. Disponível em: <[https://www.pesca.sp.gov.br/34\\_4\\_601-611.pdf](https://www.pesca.sp.gov.br/34_4_601-611.pdf)> Acesso em: 06 out, 2019.

BARROS, M. M., PEZZATO L. E., KLEEMANN G. K., HISANO H.; ROSA G.J.M. 2002. Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revta Bras. Zootec.** 31:2149-2156.

BARTON BA & IWAMA GK. Alterações fisiológicas em peixes decorrentes do estresse na aquicultura com ênfase na resposta e efeitos dos corticosteróides. **Anu. Rev. Fish Dis.** v. 1 p. 3-26. 1995.

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v.42, p.517- 525, 2002.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Ann. Rev. Fish Dis.**, v.1, p.3-26, 1991.

BARUAH, K.; PAL, A.K.; JAIN, K.K.; MUKHERJEE, S.C.; DEBNATH, D. Dietary protein level, microbial phytase, citric acid and their interactions on bone mineralization of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. **Aquaculture research**. v. 36, n.8, p.803-812, 2005.

BENFEY, T. J.; BIRON, M. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Aquaculture**, v. 184, p. 167-176, 2000.

BERTO, S. R. **Extrato de leveduras no crescimento, utilização dos nutrientes e respostas hemato-imunológicas em tilápia do Nilo**. 2013. Dissertação de mestrado em aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

BILLER-TAKAHASHI, J. D., TAKAHASHI, L. S., MARZOCCHI MACHADO, C. M., ZANUZZO, FS. e URBINATI, E. C. Atividade hemolítica do sistema complemento alternativo como indicador de imunidade inata em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 41, nº. 2, pág. 237-241

BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine haematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, v. 5, n. 6, p. 771–781, 1973.

BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine hematological methods for use with fish blood. **Journal of fish Biology**, v. 5, p. 771-781, 1973.

BOSCOLO, W.R.; MEURER, F.; RODRIGUES, R. Aditivos na Nutrição de Peixes. **Revista Colombiana de Ciência Animal**. v.7, n.2, p. 228-236, 2015.

- BOYD, C. E.; QUEIROZ, J. F. Manejo das condições do sedimento do fundo e da qualidade da água e dos efluentes de viveiros. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Org.). Tópicos especiais em piscicultura tropical intensiva. Jaboticabal, **Associação Brasileira de Aquicultura e Biologia**, v. 1, p. 25-43. 2004.
- BRANDÃO, F.; GOMES, L.C. & CHAGAS, E.C. 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica** 36: 349–356. 2006
- BUENTELLO, J. A.; NEILL W.H.; GATLIN D.M. Efeitos de prebióticos dietéticos no crescimento, eficiência alimentar e imunidade não específica de juvenis de tambor vermelho (*Sciaenops ocellatus*) alimentados com dietas à base de soja. **Pesquisa de Aquicultura** 41, 411-418. 2010.
- 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(7), p. 1137-1144, 2006.
- CARVALHO, C.T.; JUNIOR, R.M.; PINHEIRO, J.H. O uso indiscriminado de antibióticos e os impactos nos ambientes aquáticos. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**. v. 12, n. 2, 2016.
- DEON, M. P.; BICUDO, Á. J. A.; SADO, R, Y. **Desempenho, hematologia e imunologia do pacu em resposta à suplementação dietética com frutooligossacarídeos**. *Pesq. agropec. bras.* [online]. 2021.
- ELLIS, A. E. Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. In: PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and Fish**. London: Academic Press. p.147-165. 1981.
- ELLIS, A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental e Comparative Immunology**. v. 25, n. 8-9, p. 827-839. 12 out. 2001.
- EMBRAPA, **Antibióticos**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br>> Acesso em: 14 out. 2019.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations - Fisheries and Aquaculture Department, 2020. **The state of world fisheries and aquaculture**, Disponível em: <<https://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en/>> Acesso em: 05 mar.2022
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations - Fisheries and Aquaculture Department, 2016. **The state of world fisheries and aquaculture**, Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>> Acesso em: 08 out. 2019.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations - Fisheries and Aquaculture Department, 2018. **The state of world fisheries and aquaculture**, Disponível em: <<http://www.fao.org/3/i9540es/I9540ES.pdf>> Acesso em: 03 out, 2019.
- FILHO, R.L.; SAMPAIO, H.M. Probióticos e prebióticos. **Revista de educação continuada**. 1999. Disponível em: <<https://revistamvezcrmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/3362/2566>> acesso em 07 out. 2019.
- FIROUZBAKHS F, NOORI F, KHALESI MK, JANG-KHALILI K (2011) Effects of probiotic, protexin on growth performance and hematological parameters in the oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. **Fish Physiol Biochem** 37. P. 833–842, 2011.

FIROUZBAKHS, F., MEHRABI, Z., HEYDARI, M., KHALES, MK, TAJICK, MA, 2014. Efeitos protetores de um simbiótico contra infecção experimental por *Saprolegnia* parasítica em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquac. Res.** 45, 609-618. 2014

FLORUCI, A.R.; SOARES, M.H.F.B.; CAVALHEIRO, E.T.G.; **Ácidos orgânicos: Dos Primórdios da Química Experimental à Sua Presença em Nosso Cotidiano.** 2002. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc15/v15a02.pdf>> Acesso em: 10 out. 2019.

FOODS INGREDIENTS BRASIL. **Aplicações do ácido cítrico na indústria de alimentos.** Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/402.pdf>> Acesso em: 16 out. 2019.

FOODS INGREDIENTS BRASIL. **Conservação de alimentos por aditivos químicos.** 2012. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/247.pdf>> Acesso em: 11 out. 2019.

GALÍCIO, G.S.; SILVA, L.E.S. Alimentação de peixes em piscicultura extensiva. **Centro Científico Conhecer.** v. 8, n. 15, p. 49, 2012.

GASTALHO, S.; SILVA, J.G.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa.** v. 3, n. 1, p. 29-45, 2011.

GOLDEFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology,** v. 56, p.35-39, 1971.

GOLDENFARB, P. B. et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American journal of clinical pathology,** v. 56, n. 1, p. 35–39, 1971.

GRISDALE-HELLAND, B., HELLAND, S.J, I, DMG, 2008. Os efeitos da suplementação dietética com mananoligossacarídeo, frutooligossacarídeo ou galactooligossacarídeo no crescimento e utilização alimentar do salmão do Atlântico (*Salmo salar*). **Aquicultura.** 283, 163-167, 2008.

HOSEINIFAR, H. S. et al. Estudo Comparativo Sobre Imunomodulação e Crescimento aumentando os efeitos de três prebióticos (galactooligossacarídeo, frutooligossacarídeo e Inulina) na Carpa Comum (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture Research.** p. 1- 10. 2016.

HOSSAIN, M.A.; PANDEY, A.; SATOH, S. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries Science.** v. 73, n. 6, p. 1309-1317, nov. 2007.

HOSSAIN, M.A; PANDEY, A.; SATOH, S. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream *Pagrus major*. **Fisheries Science.** v. 73, n. 6, p.1309-1317, nov, 2007.

Hrubecet A. L., Effects of ammonia and nitrate concentration on hematologic and serum biochemical profiles of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). **Am. J. Vet. Res.,** 58 p. 131-135. 1997.

IWAMA, G. K. et al. **Are hsps suitable for indicating stressed states in fish.** **Journal of Experimental Biology.** Am. Zool. v. 207. P. 15-19. 2004.



KHAJEPOUR, F. et al. Estudo sobre alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos de juvenis de beluga alimentados com dieta suplementada com ácido cítrico. **Globo. Vet.**, 7: 361-364. 2011.

KUBITZA, F. **Panorama da aquicultura: aquicultura no Brasil, conquistas e desafios.** v.25, n. 150, Jul / Ago. 2015.

LAICE, L. M. et al. Use of symbiotics in biofloc (BFT)-based Nile tilapia culture: Production performance, intestinal morphometry and hematological parameters. **Aquaculture.** v. 530. p. 735715. Jan. 2021.

LEAMASTER, B. R.; BROCK, J. A.; FUJIOKA, R. S.; NAKAMURA, R. M. Hemato-logic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology.** v. 97. P. 525-529. 1990.

LI, JQ, TAN, BP, MAI, KS, 2009. Dieta probiótica Bacillus OJ e isomaltooligosaccharídes influenciam as populações microbianas do intestino, respostas imunes e resistência ao vírus da síndrome da mancha branca em camarão (*Litopenaeus vannamei*). **Aquicultura.** 291, 35-40, 2009.

LU, MM, CHEN, XX, WU, ZX, YI, CL, LI, XZ, 2010. Efeitos de frutooligossacarídeos na imunidade não específica de *Ctenopharyngodon idellus*. **J. Huazhong Agric. Univ.** 29 (2), 213–216, 2010.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Aditivos.** 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/aditivos>> Acesso em: 07 out. 2019.

MARTINS M. L., MORAES F. R., FUJIMOTO R. Y., NOMURA D.T. & FENERICK J. J. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus*) Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples e consecutivos de captura. **Bolm Inst. Pesca.** v. 28. p. 195-204. 2002.

MARTINS, L., VIEIRA, FN, JERÔNIMO, GT, MOURIÑO, JLP, DOTTA, G., SPECK, GM, BEZERRA AJM, PEDROTTI, F.S, BUGLIONE-NETO, CC, PG Jr, 2009. Resposta leucocitária e atividade fagocitária em tilápias do Nilo experimentalmente infectadas com *Enterococcus sp.* **Peixe Fisiol. Bioquímica.** 35, p 219-222. 2009.

MARTINS, M. L. et al. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (*Osteichthyes : Cichlidae*) Submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Inst.Pesca,** v. 30, n. 1, p. 71–80, 2004.

MARTINS, M. L.; TAVARES-DIAS, M.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T. Hematological alterations of *Leporinus microcephalus* (*Osteichthyes: Anostomidae*) naturally infected by *Goezia leporine* (*Nematoda: Anisakidae*) in fish pond. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 56, n. 5, p. 640-645, 2004.

MARTINS, M. L.; TAVARES-DIAS, M.; FUJIMOTO, R. Y; ONAKA, E. M; NOMURA, DT Hematológicaalterações de *Leporinus macrocephalus* (*Osteichthyes: Anostomidae*) naturalmente infectados por *Goezia leporini* (*Nematoda: Anisakidae*) em tanque de peixes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia,** dentro. 56, n. 5, pág. 640-646, 2004.

- MATTE, Vanessa Lague. **Efeito de ação de agroquímicos e do estresse sobre o metabolismo de carboidratos de jundiás (*Rhamdia quelen*)**. 2013. 44 f. Dissertação (Mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais) - Centro Universitário La Salle, Canoas, 2013 Disponível em: <http://hdl.handle.net/11690/559>. Acesso em: 31 mar. 2014.
- MELO, D. C. Perfil proteico de tilápia nilótica chitralada (*Oreochromis niloticus*), submetida ao estresse crônico por hipóxia. Zootecnia e Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 61. p 5. out 2009.
- MINISTÉRIO DAS RELAÇÕES EXTERIORES. **Recursos hídricos**. Disponível em: <<http://www.itamaraty.gov.br/pt-BR/politica-externa/desenvolvimento-sustentavel-e-meio-ambiente/176-recursos-hidricos>> Acesso em: 15 out. 2019.
- MOMMSEN T. P.; VIJAYAN M. M.; MOOM, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries.** v. 9. p. 211–268. 1999.
- MROZ, Z. Organic acids as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs. **Advances in Pork Production**, v. 16, p. 169-182, 2005.
- NASCIMENTO. M. S. et al. Suplementação de ácido cítrico em dietas à base de proteína vegetal para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). **World Aquaculture Society.** v. 52. p. 231-243. 2020.
- NAYAK, A.K.; SWAIN, P.; MUKHERJEE, S.C. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.) **Fish e Shellfish Immunology.** Oxford, v. 23. p. 892-896, 2007.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, **População Mundial**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/acao/populacao-mundial/>> Acesso em: 15 out. 2019.
- PANKHURST, N.W.; DEDUAL, M. Effects of capture and recovery on plasma levels of cortisol, lactate, gonadal steroids in a natural population of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, London, v. 45, p. 1013-1025. 1994.
- PANORAMA DA AQUICULTURA. **Aquicultura: Evolução histórica**. 1995. Disponível em: <<https://panoramadaaquicultura.com.br/aquicultura-evolucao-historica>> acesso em: 17 set, 2019.
- PARK, L.M.L.; PARK, Y.K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural.** v. 33, n.2, p. 385- 390, 2003.
- PASSOS, L.M.L.; PARK. Y.K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural.** v. 33, n.2, p. 385-390, 2003.
- PEREIRA, D. S. P. et al. Parâmetros hematológicos e histológicos de tilápia do Nilo em resposta ao desafio de diferentes níveis de salinidade. **Intituto de Pesca.**
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S.B. D.E.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. **Métodos para análise hematológica em peixes**. 1ª Ed., Maringá: Edum, 2013.
- ROBERTS, R. J.; RODGER, H. D. The Pathophysiology and Systematic Pathology of Teleost. In ROBERTS, R. J. (Ed.) **Fish Pathology**, Fourth Edition, John Wiley e Sons Ltd, Hoboken, p. 100 -105, 2012.

ROSENFELD, G. Corante pancreático para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só 37 Pacu hematology fed dietary MOS 9 corante de emprego rápido. **Memórias Instituto Butantã**, v. 20. p. 329-334, 1947.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: VIGO-PELFREY, C. (Ed.). **Membrane lipid oxidation**. 1 ed. Boca Raton, CRC Press, p. 151-70. 1991.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, São Paulo Jan / mar, 2006.

SABIONI, R.S. Estresse e imunomodulação por beta-glucano em Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). 2014. vi, 90 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, **Centro de Aquicultura de Jaboticabal**, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/108914>>.

SABOYA, J.P.S. ARAUJO, G.S.; SILVA, J.W.A.; SOUSA, J.J.; MACIEL, R.L.; FARIAS, W.R.L. 2012. Efeito dos polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Kappaphycus alvarezii* em pós-larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a situações de estresse. **Acta Scientiarum, Animal Science**. Maringá, v.34(3). p. 215-221. 2012.

SADO, R. Y.; BICUDO, Á. J. D. A.; CYRINO, J. E. P. Feeding dietary mannan oligosaccharides to juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect on hematological parameters and showed decreased feed consumption. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 39, n. 6, p. 821–826, 2008.

SADO, R.Y.; BICUDO, A.J.A.; CYRINO, J.E. P. Dietary levamisole influenced hematological parameters of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 41(S1), p. 66-75, 2010.

SANTOS, C. **Manejo e Sanidade de peixes em cultivo**. Aquicultura e pesca: a mudança do modelo exploratório. Embrapa. Macapá, 2009.

SAURABH, S., SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquac. Res**. v. 39. p. 223–239. 2008.

SCHULTER. P.E.; FILHO. V.R.E.J. Evolução da Piscicultura no Brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. **IPEA**. Rio de Janeiro. ago, 2017.

SCHWARZ, K.K.; NASCIMENTO, J.C.; GOMES, V.A.A.; SILVA, C.H.; SALVADOR, J.G.; FERNANDES, M.R.; NUNES, R.M. Desempenho zootécnico de alevinos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com levedura de *Saccharomyces cerevisiae*. **Holos**. n. 32, 2016.

SENAR. **Piscicultura: reprodução, larvicultura e alevinagem de tilápia**. Coleção. 197. 2017. Disponível em: <<https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/197-TILAPIAS-NOVO.pdf>> Acesso em: 01 out. 2019.

SERRA, M. et al. **O estresse na criação de peixes**. Piscicultura: Aspectos Relevantes. 1 ed. V. 12, p. 271-316. Jan 2016.

- SILVA, K.A.G. **Mistura de ácidos orgânicos e óleo essencial para *Oreochromis niloticus***. Dissertação de mestrado em aquicultura. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2018.
- SILVA, R. D. Parâmetros hematológicos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sob estresse de exposição ao ar. **Morfofisiologia. Pesq. Vet. Bras.** V. 32 (suppl 1). Dez 2012.
- SILVA, R.F.; LANNA, E.A.T.; BOMFIM, M.A.D.; RIBEIRO, F.B.; JÚNIOR, F.I.A.; NAVARRO, R.D. Uso de ácidos orgânicos em dietas para Tilápia do Nilo. **Revista Ceres.** Vol. 55, n.4, p. 352-355, 2008.
- SOLEIMANI, N.; ROSEINIFAR, S.H.; MERRIFIELD, D.L.; BARATI, M.; ABADI, Z.H. Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. **Fish e Shellfish Immunology.** v. 32, n. 2, p. 316-321. Fev. 2012.
- SOLTAN, M. A.; FOUAD, I. M.; EL-ZYAT, A. M.; ZEAD, M.A. 2017. Possibility of using fermented fish silage as feed ingredient in the diets of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Global Veterinaria.** 18(1) p. 59-67. 2017
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematotogia de peixes teleósteos.** 1. ed. Ribeirão Preto: Villimpress, 2004.
- THRALL, M. A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária.** São Paulo: Roca. p. 582. 2007.
- TROMBETA, D.; TROMBETA, D.R.; MATTOS, O. B. **Criação de Tilápias em viveiros escavados.** Sebrae. Brasília. 2016. Disponível em: [https://bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS\\_CHRONUS/bds/bds.nsf/3fdeb1a972e85108b5b8a2ee264063b/\\$File/7703.pdf](https://bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/3fdeb1a972e85108b5b8a2ee264063b/$File/7703.pdf)> acesso em: 30 set. 2019.
- URBINATI, E. C.; ZANUZZO, F. S.; BILLER-TAKAHASHI, J. D. Estresse e sistema imune em peixes. In: Bernardo Baldisserotto, José Eurico Possebon Cyrino, Elisabeth Criscuolo Urbinati. (Org.). **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce.** 1ed. Jaboticabal: Fundação de Apoio à Pesquisa, Ensino e Extensão (Funep), v.1, p.87-105, 2014
- URIBE, C.; FOLCH, H.; ENRIQUEZ, R.; MORAN, G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina.** v. 56, N. 10, p. 486-503, 2011.
- VERLHAC, V.; OBACH, A.; GABAUDAN, J. SCHUEP, W.; HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology,** v. 8, p. 409-424, 1998.
- VIDAL, L.V.O.; ABINATI, R.C.B.; ALBINATI, C.L.; LIRA, A.D.; ALMEIDA, T.R.; SANTOS, G.B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo. **Revista Agropecuária Brasileira.** v. 43, n. 8, Brasília, ago. 2008.
- WANG, YB, LI, JR, LIN, J., 2008 b. Probióticos na aquicultura: desafios e perspectivas. **Aquicultura.** 281, p 1-4.
- WATANABE, A.L.; VIEGAS, E.M.M.; GONÇALVES, L.U. Níveis de levedura e derivados na dieta de juvenis de pacu. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v. 39, n. 3, p. 447-453, 2010.

- WATTS, M; MUNDAY, B. L; BURKE, C. M. cDNA sequences and organization of IgM heavy chain genes in two holostean fish. **Developmental and Comparative Immunology**. v. 19, p. 153-164. 2001
- WENDEELAR BONGA, S. E. W. The stress response in fish. **Physiological Reviews**. v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.
- WINTROBE, M. M. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**. v. 51, p. 32–49, 1934.
- WINTROBE, M. M. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**. v. 51, p. 32–49, 1934.
- ZARAGOZA O. D. R. et al. Thermal stress effect on tilapia *Oreochromis mossambicus* (*Pisces: Cichlidae*) blood parameters. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 41:2. p. 79-89. 2008.
- Zhang, X. et al. **A consensus linkage map provides insights on genome character and evolution in common carp (*Cyprinus carpio* L.)**. Mar. Biotechnol. (NY) **15**, 275–312 (2013).