

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**NOVOS PREBIÓTICOS NA NUTRIÇÃO
DE TILÁPIA DO NILO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Patrícia Inês Mombach

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2015

NOVOS PREBIÓTICOS NA NUTRIÇÃO DE TILÁPIA DO NILO

Patrícia Inês Mombach

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia**.

Orientadora: Prof^ª. Leila Picolli da Silva

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Mombach, Patrícia Inês
Novos prebióticos na nutrição de tilápia do Nilo /
Patrícia Inês Mombach.-2015.
79 p.; 30cm

Orientadora: Leila Picolli da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, RS, 2015

1. Aquicultura 2. Nutrição 3. Aditivos 4. Prebióticos
5. Tilápia do Nilo I. Picolli da Silva, Leila II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

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

**NOVOS PREBIÓTICOS NA NUTRIÇÃO
DE TILÁPIA DO NILO**

elaborada por
Patrícia Inês Mombach

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Leila Picolli da Silva, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Nilton Garcia Marengoni, PhD. (Unioeste)

Rafael Lazzari, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 10 de fevereiro de 2015

Aos que de alguma forma contribuíram para o alcance deste objetivo
Aqueles aos quais as informações contidas neste documento possam contribuir

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida. Também pela coragem para continuar superando as dificuldades do caminho e pela paciência, para não me entregar ao desânimo diante das minhas fraquezas.

Aos meus pais Edênio e Roseli, que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu noivo Felipe, companheiro inseparável, que sempre está ao meu lado me apoiando e ajudando, obrigada por seu amor e carinho.

À Prof^a. Dra. Leila Picolli da Silva, pela orientação, confiança, estímulo, críticas, auxílio, paciência e amizade demonstrada durante a realização deste trabalho.

Ao professor João Radünz Neto, pelos ensinamentos repassados ao longo deste período.

Aos integrantes e amigos do Laboratório de Piscicultura, principalmente Naglezi, Suzi, Ana Betine, Carol, Daniel, Suzete, Marina, Glauco, Isadora, Silvano, Júnior, Joziane e Maria por todo o auxílio e conhecimentos repassados. Agradecimento mais que especial à Taida, Fernanda, Dirleise e Bruno por toda ajuda, desde a extração dos ingredientes, preparo das instalações experimentais, ajudas diárias e auxílio nas análises.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade concedida, aos professores e secretária Olirta, pelos ensinamentos e auxílios prestados.

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

Aos membros da banca, por se disponibilizarem a contribuir para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Alltech®, Agropecuária Giruá e Giovelli & Cia Ltda pela doação de ingredientes.

Enfim, minha gratidão sincera a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Ontem passado.
Amanhã futuro.
Hoje agora.
Ontem foi.
Amanhã será.
Hoje é.
Ontem experiência adquirida.
Amanhã lutas novas.
Hoje, porém, é a nossa hora de fazer e de construir!”*

Chico Xavier

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

NOVOS PREBIÓTICOS NA NUTRIÇÃO DE TILÁPIA DO NILO

AUTORA: PATRÍCIA INÊS MOMBACH

ORIENTADORA: LEILA PICOLLI DA SILVA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de fevereiro de 2015.

O estudo foi conduzido com o objetivo de desenvolver novos prebióticos obtidos a partir do bagaço de laranja e do grão de linhaça, e avaliar os efeitos de sua suplementação na dieta de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Durante 60 dias, 720 tilápias do Nilo (peso médio inicial: $3,4 \pm 0,60$ g) foram mantidas em 24 caixas de polipropileno com volume útil de 280 litros (30 peixes/caixa), dispostas em um sistema de recirculação de água. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia com as dietas experimentais, com adição de 2,5 e 5 g kg⁻¹ de ORANPre, LINPre e Actigen® (prebiótico comercial). O delineamento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x2, totalizando seis tratamentos com quatro repetições. A qualidade da água foi monitorada regularmente, mantendo-se dentro do ideal para o desenvolvimento da espécie. No final do período experimental, foram avaliados os parâmetros de crescimento, parâmetros de carcaça, índices digestivos, parâmetros hematológicos e metabólicos. O rendimento de extração dos novos prebióticos foi de 16,8% para o ORANPre e 7,8% para o LINPre, ambos extraídos em meio termo-aquoso. A capacidade de hidratação (CH) e a capacidade de ligação a gordura (CLG) foram superiores para o LINPre, mas os níveis adicionados não alteraram a CH e a CLG das dietas. Foi observado maior peso final das tilápias alimentadas com as dietas contendo os prebióticos não comerciais (ORANPre e LINPre) e independente do prebiótico, os melhores resultados em peso final e comprimento total foram observados para 2,5 g kg⁻¹ de inclusão. Os prebióticos mostraram equivalência quanto a sua ação sobre a taxa de crescimento específico, rendimento de carcaça, biomassa total, ganho de peso relativo, conversão alimentar aparente, sobrevivência, índice hepatossomático e índice de gordura visceral. O índice digestivossomático foi superior para a dieta com inclusão de ORANPre, não diferindo da dieta com inclusão de Actigen®. Houve maior deposição de proteína corporal nas tilápias alimentadas com as dietas contendo ORANPre, não diferindo daquelas com inclusão de LINPre. A gordura total depositada foi superior para o menor nível de inclusão (2,5 g kg⁻¹). Os parâmetros hematológicos não foram influenciados pelos prebióticos e níveis de inclusão. Nos parâmetros metabólicos foram observadas maiores concentrações de glicogênio hepático nas dietas com inclusão de ORANPre e Actigen®, sem diferença entre os níveis testados. Para a umidade corporal foi observada interação ($P < 0,05$), onde os animais alimentados com as dietas adicionadas de 5 g kg⁻¹ de Actigen® apresentaram maior retenção de umidade. Os resultados demonstram que os prebióticos não comerciais ORANPre e LINPre são equivalentes ou superiores ao prebiótico comercial (Actigen®), indicando a possibilidade de utilização desses novos prebióticos nas dietas de tilápia do Nilo.

Palavras-chave: Aditivos *ecofriendly*. Nutrição. *Oreochromis niloticus*. Peixe.

ABSTRACT

Animal Science Master Dissertation
Post-Graduate Program in Animal Science
Federal University of Santa Maria

NEW PREBIOTICS IN NUTRITION OF NILE TILAPIA

AUTHOR: PATRÍCIA INÊS MOMBACH

ADVISER: LEILA PICOLLI DA SILVA

Date and Defense Place: Santa Maria, February 10th, 2015.

The study was conducted in order to develop new prebiotic obtained from the orange peel and linseed grain, and evaluate the effects of supplementation in the diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). During 60 days, 720 Nile tilapia (average weight: 3.4 ± 0.60 g) were maintained in 24 polypropylene boxes with a volume of 280 liters (30 fish / tank) arranged in a water recirculation system. Fish were fed three times a day with the experimental diets with addition 2.5 and 5 g kg⁻¹ of ORANPre, LINPre and Actigen® (commercial prebiotic). The design was completely randomized in a 3x2 factorial arrangement, a total of six treatments with four replications. The water quality was monitored regularly, keeping within the ideal for the development of species. At the end of the trial period, were evaluated the growth parameters, carcass parameters, digestive indices, hematological and metabolic parameters. The extraction yield of new prebiotics was 16.8% for ORANPre and 7.8% for LINPre, both extracted in middle-aqueous. The hydration capacity (HC) and fat binding capacity (FBC) were higher to LINPre, but the added levels did not change the HC and the FBC of the diets. It was observed a higher final weight of the tilapias fed diets containing non-commercial prebiotics (ORANPre and LINPre) and independent of the prebiotic, the best results in the final weight and length were observed for 2.5 g kg⁻¹ of inclusion. Prebiotics showed equivalence as its action on the specific growth rate, carcass yield, total biomass, relative weight gain, feed conversion, survival, hepatossomatic index and visceral fat index. The digestive somatic index was higher for the diet with inclusion of ORANPre did not differ from diet with inclusion of Actigen®. There was a higher body protein deposition in tilapia fed with diets containing ORANPre, not differing from those with inclusion of LINPre. The total fat deposited was higher for the lowest level of inclusion (2.5 g kg⁻¹). Hematological parameters were not influenced by prebiotics and inclusion levels. In the metabolic parameters were observed higher concentrations of liver glycogen in the diets with inclusion of ORANPre and Actigen®, with no difference between the levels tested. For body moisture was observed interaction ($P < 0.05$), where the animals fed diets added 5 g kg⁻¹ of Actigen® showed higher moisture retention. The results demonstrate that the non-commercial prebiotics ORANPre and LINPre are equivalent or superior to commercial prebiotic (Actigen®), indicating the possibility of using these new prebiotics in the Nile tilapia diets.

Key words: Ecofriendly Additives. Nutrition. *Oreochromis niloticus*. Fish.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1 – Ingredientes e composição proximal das dietas experimentais fornecidas às tilápias do Nilo	37
Tabela 2 – Capacidade de hidratação (CH) e capacidade de ligação à gordura (CLG) dos prebióticos e das dietas experimentais	38
Tabela 3 – Parâmetros sanguíneos e plasmáticos de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo ORANPre, LINPre ou Actigen®	39
Tabela 4 – Desempenho, eficiência alimentar e sobrevivência de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo ORANPre, LINPre ou Actigen®	40
Tabela 5 – Composição centesimal (%) de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo ORANPre, LINPre ou Actigen®	41

ARTIGO II

Tabela 1 – Ingredientes e composição proximal das dietas experimentais fornecidas às tilápias do Nilo	58
Tabela 2 – Parâmetros de crescimento de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo ORANPre, LINPre ou Actigen®	59
Tabela 3 – Rendimento de carcaça e deposição de nutrientes de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo ORANPre, LINPre ou Actigen®	60
Tabela 4 – Índices digestivos de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo ORANPre, LINPre ou Actigen®	61
Tabela 5 – Respostas metabólicas de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo ORANPre, LINPre ou Actigen®	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ALB: Albumina
BHT: Butil Hidróxi Tolueno
BT: Biomassa Total
CAA: Conversão Alimentar Aparente
CH: Capacidade de Hidratação
CLG: Capacidade de Ligação à Gordura
COL: Colesterol
CPS: Concentrado Proteico de Soja
CT: Comprimento Total
ED: Energia Digestível
GLI: Glicose
GPR: Ganho em Peso Relativo
GTD: Gordura Total Depositada
HMG: Hemoglobina
IDS: Índice Digestivossomático
IGV: Índice de Gordura Visceral
IHS: Índice Hepatossomático
MM: Matéria Mineral
NS: Não Significativo ($p > 0,05$)
PB: Proteína Bruta
PBDT: Proteína Bruta Total Depositada
PF: Peso Final
PRT: Proteínas Totais
RC: Rendimento de Carcaça
S: Sobrevivência
TCE: Taxa de Crescimento Específico

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1 - Sistema de recirculação de água onde foi conduzido o ensaio biológico 72**
- Anexo 2 - Exemplares de tilápia do Nilo durante a biometria final (A: Fase de sedação;
B: Coleta de sangue; C: Medição; D: Pesagem)..... 72**
- Anexo 3 - Normas para a submissão de trabalhos na Revista Aquaculture Nutrition 73**

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	13
Objetivo geral	14
Objetivos específicos	14
ARTIGO I – PROMOTORES DE CRESCIMENTO <i>ECOFRIENDLY</i> PARA TILÁPIA DO NILO	15
Resumo	15
Abstract	16
Introdução.....	17
Material e métodos	19
Resultados	23
Discussão	24
Agradecimentos	29
Referências	29
ARTIGO II – NOVOS PREBIÓTICOS NO DESEMPENHO E METABOLISMO DE TILÁPIAS DO NILO	42
Resumo	42
Abstract	43
Introdução.....	44
Material e métodos	46
Resultados	50
Discussão	51
Agradecimentos	54
Referências	54
DISCUSSÃO GERAL	63
CONCLUSÃO GERAL	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	71

INTRODUÇÃO GERAL

A produção mundial de pescado tem crescido em média 3,2% ao ano nas últimas cinco décadas (FAO, 2014). No Brasil, em 2013 foram produzidas 478.622 toneladas de pescado, sendo que entre as espécies produzidas a tilápia é a mais representativa, responsável por 35% do total de pescado produzido no país (IBGE, 2013). Do mesmo modo, o consumo per capita mundial de pescado passou de 9,9 kg em 1960 para 19,2 kg em 2012, impulsionado pela combinação entre crescimento populacional, aumento da renda e canais de distribuição mais eficientes (FAO, 2014). Neste cenário, os consumidores vêm se tornando cada vez mais exigentes e preocupados com alimentos saudáveis, que sejam produzidos sem a utilização de antibióticos como promotores de crescimento, sendo que o uso destes aditivos pode propiciar o aparecimento de cepas bacterianas resistentes aos mesmos. Assim, tem-se preconizado o uso de promotores de crescimento alternativos, como os prebióticos, os quais auxiliam no equilíbrio benéfico da microbiota do trato gastrintestinal (SILVA; NÖRNBERG, 2003).

Embora existam várias marcas de prebióticos comerciais, a sua formulação se baseia principalmente em três grandes grupos de oligossacarídeos (frutooligossacarídeos, mananoligossacarídeos e galactooligossacarídeos), o que limita as opções de escolha de melhor ingrediente ativo, visto que os resultados serão influenciados pelo tipo do prebiótico, níveis de adição, tempo de uso, características do animal, composição da dieta e ambiente criatório (GRISDALE-HELLAND et al., 2008). Estudos têm indicado que os prebióticos melhoram o aproveitamento dos nutrientes e o desempenho de crescimento de várias espécies de peixes (MAHIOUS et al., 2006; STAYKOV et al., 2007; TORRECILLAS et al., 2007; BURR et al., 2008; GRISDALE-HELLAND et al., 2008). Porém, os resultados científicos ainda demonstram instabilidade nas respostas imunológicas, metabólicas e de desempenho quando estas poucas moléculas prebióticas são adicionadas a dieta dos organismos aquáticos (GANGULY et al., 2013). Diante disso, faz-se necessária a diversificação de moléculas de ação prebiótica objetivando ampliar as opções de aditivos *ecofriendly*, os quais podem ser obtidos a partir de fontes vegetais e até mesmo a partir de resíduos agroindustriais, o que torna a sua obtenção industrialmente factível, economicamente viável e ambientalmente correta.

Entre as inúmeras opções de resíduos agroindustriais disponíveis, o bagaço de laranja apresenta-se como alternativa promissora para a extração de substâncias pécicas, as quais

* Após tradução para a língua inglesa, será submetido à revista *Aquaculture Nutrition*

possuem composição química estrutural formada majoritariamente de ácido galacturônico (MOHNEN, 2008). Naturalmente, essas substâncias encontram-se localizadas na parede celular de vegetais, conferindo-lhes rigidez (CANTERI et al., 2012; MÜLLER; PRADO, 2005). Na indústria, a cadeia pectínica pode ser transformada em ácidos graxos de cadeia curta e estimular o desenvolvimento da microbiota no cólon, atuando como prebiótico (CANTERI, et al., 2012). Estudos reportam sua promoção no desenvolvimento de bactérias acidolíticas, inibição de microrganismos nocivos, redução da absorção de toxinas no trato digestório e quelação de metais pesados (TAMURA et al., 2013).

Considerando a obtenção de aditivos *ecofriendly* a partir de fontes vegetais, a mucilagem extraída de grãos de linhaça desperta grande interesse pela sua composição, sendo formada de polissacarídeos neutros e ácidos, compostos de arabinose, xilose, ácido urônico, rhamnose, galactose e ácido galacturônico (CUI et al., 1994). O uso do grão in natura ou níveis elevados de mucilagem podem levar a efeitos antinutricionais nos peixes e outros animais, devido à elevação considerável de viscosidade da digesta, dificultando a digestão e a absorção, o que refletirá negativamente sobre o desempenho (REBOLÉ et al., 2002; LEENHOUWERS et al., 2006). No entanto, a mucilagem concentrada extraída do grão de linhaça pode ser aplicada em níveis racionais, promovendo efeitos benéficos e ampliando o leque de moléculas prebióticas na aquicultura intensiva.

Objetivo geral

Desenvolver novos prebióticos a partir de bagaço de laranja e de grãos de linhaça e avaliar as respostas de sua adição na dieta de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Objetivos específicos

- Estudar os efeitos de novos prebióticos não comerciais (ORANPre e LINPre) sobre o desempenho e metabolismo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*);
- Avaliar os efeitos de novos prebióticos não comerciais (ORANPre e LINPre) sobre a composição corporal, parâmetros sanguíneos e plasmáticos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

1 **ARTIGO I**

2

3 **PROMOTORES DE CRESCIMENTO *ECOFRIENDLY* PARA**
4 **TILÁPIA DO NILO***

5

6 Novos prebióticos na nutrição de peixes

7 **PALAVRAS-CHAVE:** *Oreochromis niloticus*, aditivos, substâncias pécticas, mucilagem,
8 desempenho, aquicultura

9

10 **Resumo**

11 O estudo foi desenvolvido para avaliar os resultados de dietas suplementadas com
12 novos prebióticos não comerciais (ORANPre e LINPre) sobre os parâmetros
13 hematológicos, desempenho e composição corporal de tilápias do Nilo (*Oreochromis*
14 *niloticus*). Durante 60 dias, 720 tilápias do Nilo (peso médio inicial: $3,4 \pm 0,60$ g) foram
15 mantidas em 24 caixas de polipropileno com volume útil de 280 litros (30 peixes/caixa),
16 dispostas em um sistema de recirculação de água. Os peixes foram alimentados três
17 vezes ao dia com as dietas experimentais, suplementadas com 2,5 e 5 g kg⁻¹ de
18 ORANPre, LINPre e Actigen® (prebiótico comercial). O delineamento foi inteiramente
19 casualizado em arranjo fatorial 3x2, totalizando seis tratamentos com quatro repetições.
20 O rendimento de extração dos novos prebióticos foi de 16,8% para o ORANPre e 7,8%
21 para o LINPre, ambos extraídos em meio termo-aquoso. A capacidade de hidratação
22 (CH) e a capacidade de ligação a gordura (CLG) foram superiores para o LINPre, mas
23 os níveis adicionados não alteraram a CH e a CLG das dietas. Os parâmetros
24 hematológicos não foram influenciados pelos prebióticos e níveis de inclusão. Os

* Após tradução para a língua inglesa, será submetido à revista Aquaculture Nutrition

25 prebióticos também mostraram equivalência quanto a sua ação sobre a biomassa total,
26 ganho de peso relativo, conversão alimentar aparente e sobrevivência. Para a umidade
27 corporal foi observada interação ($P < 0,05$), onde os animais alimentados com as dietas
28 adicionadas de 5 g kg^{-1} de Actigen® apresentaram maior retenção de umidade. Frente à
29 busca por promotores de crescimento alternativos, esse estudo confirma a possibilidade
30 de utilização dos novos prebióticos (ORANPre e LINPre) na nutrição de tilápias do
31 Nilo, pois apresentaram eficiência equivalente ao prebiótico comercial testado
32 (Actigen®).

33

34

35 **Ecofriendly growth promoters for Nile tilapia**

36

37 New prebiotics in fish nutrition

38 **KEY WORDS:** *Oreochromis niloticus*, additive, pectic substances, mucilage,
39 performance, aquaculture

40

41 **Abstract**

42 The study was developed to evaluate the results of diets supplemented with new non-
43 commercial prebiotics (ORANPre and LINPre) on hematological parameters,
44 performance and body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). During 60
45 days, 720 Nile tilapia (average weight: $3.4 \pm 0.60 \text{ g}$) were maintained in 24
46 polypropylene boxes with a volume of 280 liters (30 fish/tank) arranged in a water
47 recirculation system. Fish were fed three times a day with the experimental diets
48 supplemented with 2.5 and 5 g kg^{-1} of ORANPre, LINPre and Actigen® (commercial

49 prebiotic). The design was completely randomized in a 3x2 factorial arrangement, a
50 total of six treatments with four replications. The extraction yield of new prebiotics was
51 16.8% for ORANPre and 7.8% for LINPre, both extracted in middle-aqueous. The
52 hydration capacity (HC) and fat binding capacity (FBC) were higher to LINPre, but the
53 added levels did not change the HC and the FBC of the diets. Hematological parameters
54 were not influenced by prebiotics and inclusion levels. Prebiotics also showed
55 equivalence as its action on the total biomass, relative weight gain, feed conversion and
56 survival. For body moisture was observed interaction ($P < 0.05$), where the animals fed
57 diets added 5 g kg^{-1} of Actigen® showed higher moisture retention. Faced with the
58 search for alternative growth promoters, this study confirms the possibility of using the
59 new prebiotics (ORANPre and LINPre) in nutrition of Nile tilapia, because they showed
60 equivalent efficiency to commercial prebiotic tested (Actigen®).

61

62

63 **Introdução**

64

65 Durante a última década, alguns ingredientes com efeitos prebióticos (FOS e MOS,
66 majoritariamente) vêm sendo estudados como alternativa ao uso de antibióticos na
67 aquicultura, por promoverem o crescimento e/ou atividade das bactérias intestinais
68 benéficas (Mahious *et al.* 2006; Ringo *et al.* 2006; Merrifield *et al.* 2010; Ringo *et al.*
69 2010). Porém, os resultados científicos têm demonstrado instabilidade nas respostas
70 imunológicas, metabólicas e de desempenho quando estas poucas moléculas prebióticas
71 são adicionadas a dieta dos organismos aquáticos (Ganguly *et al.*, 2013). A dificuldade
72 de consolidação destes aditivos está vinculada a vários fatores, como a baixa

73 diversidade de composição química e estrutura molecular, o nível de inclusão, a forma e
74 composição da dieta, a espécie animal e as condições de estresse ambiental (Patterson &
75 Burkholder 2003; Verdonk *et al.* 2005).

76 Acreditamos que a maior diversidade de moléculas prebióticas possa contribuir
77 significativamente para alavancar o uso deste aditivo na nutrição animal. Sabe-se, por
78 exemplo, que entre as substâncias prebióticas os oligossacarídeos não digestíveis de
79 cadeia linear são fermentados mais extensivamente e por um maior número de espécies
80 bacterianas do que os de cadeia ramificada (Van Laere *et al.* 1997), o que influencia
81 diretamente na proporção entre os AGVs produzidos. Esta constatação pode ser
82 explicada pela variabilidade e seletividade fermentativa das populações microbianas do
83 trato digestório, que poderá ser potencializada com o uso direcionado de substratos de
84 distintas ações prebióticas. A dose de prebiótico adicionada nas dietas também deve ser
85 tratada com cautela, pois subdosagens podem limitar os resultados obtidos e
86 superdosagens podem provocar desequilíbrio sobre as populações microbianas (Silva &
87 Nönberg, 2003).

88 Neste cenário, substâncias pécticas que compõem a fibra alimentar solúvel de
89 vários alimentos surgem como alternativa promissora por apresentarem composição
90 químico estrutural diferenciada, formadas de α -D-(1,4)-galacturonic acid com uma
91 pequena fração de rhamnose e pequenas quantidades de outros açúcares (Mohnen,
92 2008). Estudos reportam sua promoção no desenvolvimento de bactérias acidolíticas,
93 inibição de microrganismos nocivos, redução da absorção de toxinas no trato digestório
94 e quelação de metais pesados (Tamura *et al.*, 2013). As substâncias pécticas para uso
95 como agente prebiótico podem ser extraídas de bagaço de frutas resultante da extração
96 de suco, tornando-se uma alternativa economicamente viável e ambientalmente correta.

97 A mucilagem de grãos de linhaça, formada de polissacarídeos ácidos e neutros,
98 compostos de seis monossacarídeos (arabinose, xilose, ácido urônico, rhamnose,
99 galactose e ácido galacturônico) (Cui *et al*, 1994), também desperta interesse como
100 substância solúvel e indigestível de alto potencial prebiótico. In natura, o uso do grão da
101 linhaça pode levar a efeitos antinutricionais nos peixes e outros animais, devido à
102 elevação considerável de viscosidade da digesta, dificultando a digestão e a absorção de
103 nutrientes (Rebolé *et al*, 2002). No entanto, a mucilagem pode ser extraída do grão e
104 aplicada em níveis racionais na dieta, promovendo efeitos benéficos e ampliando a
105 diversidade de moléculas prebióticas na aquicultura intensiva.

106 Com o objetivo de ampliar as opções de aditivos *ecofriendly* para a nutrição de
107 peixes, o corrente estudo foi desenvolvido para avaliar os efeitos de novos prebióticos
108 não comerciais (ORANPre and LINPre) extraídos de bagaço de laranja e de grãos de
109 linhaça, sobre o desempenho, composição corporal e parâmetros hematológicos de
110 tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

111

112 **Material e métodos**

113

114 *Obtenção dos novos prebióticos*

115 O resíduo resultante da extração de suco de laranja foi lavado em água fria e prensado
116 manualmente, triturado em multiprocessador, seco em estufa (55°C por 24 horas) e
117 moído a 0,3 mm em micro moinho (Marconi, model MA-630/1, 27000 rpm). Usando a
118 metodologia descrita por Calliari (2004), os constituintes pécnicos e de potencial
119 prebiótico foram extraídos do resíduo seco em meio aquoso, na concentração de 8%
120 (p/v), sob temperatura de 100°C, durante 1 hora. Após esfriar, a solução foi centrifugada

121 (3500 rpm/10 min) e ao sobrenadante adicionou-se etanol 93% na proporção de 1:1. A
122 solução permaneceu em repouso durante 24h a 5°C, para precipitação e separação dos
123 constituintes pécnicos. Após recuperação, o precipitado foi seco a 55° C durante 48
124 horas em estufa de circulação e moído a 0,3mm. O material resultante dessa extração foi
125 denominado de ORANPre.

126 Seguindo metodologia proposta por Goulart *et al.* (2013), a mucilagem foi
127 extraída do grão inteiro da linhaça (variedade Normandy) em meio aquoso, na
128 concentração 10% (p/v), sob temperatura entre 60-80° C e agitação constante, por 150
129 minutos. O sobrenadante foi separado das sementes e acrescido de etanol 93% até
130 concentração alcoólica final de 75%. Após recuperação, o precipitado foi seco a 55° C
131 durante 48 horas em estufa de circulação e moído a 0,3mm. O material resultante dessa
132 extração foi denominado LINPre.

133

134 *Caracterização dos novos prebióticos*

135 Após a extração e secagem, foi calculado o rendimento obtido para o ORANPre e o
136 LINPre. As frações de fibra alimentar total (FT), fibra insolúvel (FI) e fibra solúvel (FS)
137 foram determinadas conforme o método enzimático gravimétrico número 991.43 da
138 AOAC (1995). A capacidade de hidratação e capacidade de ligação à gordura foram
139 analisadas seguindo metodologias sugeridas por Wang & Kinsella (1976).

140

141 *Dietas*

142 Todas as dietas foram isonutritivas e formuladas de acordo com as exigências
143 nutricionais para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os seis
144 tratamentos consistiram de dietas experimentais suplementadas com ORANPre, LINPre

145 ou Actigen® (produto comercial à base de mananligossacarídeos), em dois níveis de
146 inclusão (2,5 ou 5 g kg⁻¹).

147 Todos os ingredientes das dietas foram pesados, misturados e peletizados. Os
148 pellets foram secos em estufa de circulação (50°C) por 24h, e o tamanho para consumo
149 foi ajustado de acordo com o desenvolvimento dos peixes. Os ingredientes e a
150 composição proximal das dietas experimentais são apresentados na Tabela 1.

151

152 *Ensaio biológico*

153 O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal da Universidade
154 Federal de Santa Maria (nº 23081.009051/2014-53) e conduzido no Laboratório de
155 Piscicultura desta instituição.

156 Foram utilizadas 24 unidades experimentais (seis tratamentos com quatro
157 repetições) com volume útil de 280 L, com entrada e saída individual de água,
158 dispostas em sistema de recirculação com filtragem mecânica e biológica. Na estrutura
159 foram distribuídos 720 alevinos de tilápia do Nilo com peso médio inicial de 3,4±0,60 g
160 (30 animais/tanque), adaptados por sete dias antes de iniciar o experimento. Durante os
161 60 dias experimentais, os peixes foram alimentados três vezes ao dia (8h, 12h30min e
162 17h) até a saciedade aparente.

163

164 *Qualidade da água*

165 O controle da qualidade da água do sistema de criação foi realizado por limpezas
166 periódicas dos encanamentos, sifonagem dos resíduos de cada tanque duas vezes ao dia,
167 uma hora antes das alimentações (7h e 16h) e renovação diária de 10% da água do
168 sistema. Diariamente foi mensurada a temperatura com termômetro de bulbo de

169 mercúrio ($26,7 \pm 1,46^\circ\text{C}$ pela manhã e $27,05 \pm 1,34^\circ\text{C}$ pela tarde). Semanalmente foram
170 mensurados por kits colorimétricos (Alfa-Tecnoquímica) o oxigênio dissolvido
171 ($7,24 \pm 0,73\text{mg L}^{-1}$), o pH ($7,63 \pm 0,35$), a alcalinidade ($46 \pm 12,47\text{ mg CaCO}_3/\text{L}^{-1}$), a
172 dureza ($31,5 \pm 23,46\text{mg CaCO}_3/\text{L}^{-1}$), a amônia ($0,27 \pm 0,18\text{mg L}^{-1}$) e o nitrito
173 ($0,14 \pm 0,20\text{mg L}^{-1}$). A água para as análises foi coletada na entrada do filtro biológico.

174

175 *Coleta de dados e variáveis avaliadas*

176 Aos 60 dias experimentais foi realizada coleta de dados a fim de avaliar o desempenho
177 dos peixes.

178 Parâmetros hematológicos: Foi coletado sangue de dois peixes por unidade
179 experimental, por meio de seringas com anticoagulante universal Doles®, através de
180 punção na veia caudal, para realização da análise de hemoglobina através de kit
181 colorimétrico Doles®. Além destes, amostras de sangue de dois peixes por unidade
182 experimental foram coletadas com a utilização de seringas heparinizadas, através de
183 punção na veia caudal. A partir do plasma, obtido após a centrifugação do sangue
184 ($3000\text{rpm}/10\text{ min.}$), foi determinado o nível de proteínas totais, albumina, glicose e
185 colesterol total utilizando kits colorimétricos comerciais.

186 Parâmetros zootécnicos: Foi realizada biometria com peixes em jejum de 12 h e
187 sedados com benzocaína (Henrifarma® Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA;
188 Cambuci, SP, Brazil) na concentração de 100 mg L^{-1} . A partir dos dados biométricos
189 dos animais e análise do consumo da dieta foram obtidos: biomassa total: BT= (peso de
190 todos os animais dentro da repetição); conversão alimentar aparente: CAA= (consumo
191 total)/(biomassa final – biomassa inicial); ganho em peso relativo (%): GPR= (peso
192 final – peso inicial)/(peso inicial) * 100 e sobrevivência (%).

193 Parâmetros bromatológicos: As amostras de peixe inteiro foram analisadas
194 quanto à umidade, cinzas e proteína bruta seguindo metodologias recomendadas pela
195 AOAC (1995). A gordura foi extraída e quantificada pelo método de Bligh & Dyer
196 (1959).

197

198 *Delineamento experimental e análise estatística*

199 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x2. Os
200 resultados foram submetidos à teste de normalidade e análise de variância (2 vias:
201 prebióticos x níveis). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan (prebióticos) e
202 “t” de Student (níveis) ao nível de 5% de significância.

203

204 **Resultados**

205

206 *Caracterização dos novos prebióticos*

207 O rendimento de extração do prebiótico ORANPre foi de 16,8%, sendo retirados
208 aproximadamente 75% dos constituintes indigestíveis solúveis da matéria prima,
209 inicialmente com 22,2% de fibra alimentar solúvel em sua composição. Nos grãos de
210 linhaça, a extração do prebiótico LINPre rendeu 7,8%, o que corresponde a 53% dos
211 constituintes indigestíveis solúveis desta fonte, inicialmente com 14,9% de fibra solúvel
212 em sua composição.

213 Os resultados de capacidade de hidratação (CH) e de capacidade de ligação a
214 gordura (CLG) foram superiores para o LINPre, seguido do Actigen® e do ORANPre
215 (Tabela 2). A CH e a CLG não foram alteradas pela inclusão dos prebióticos nas dietas
216 experimentais (Tabela 2).

217

218 *Parâmetros hematológicos*

219 A hemoglobina do sangue das tilápias não foi influenciada significativamente pelos
220 prebióticos e seus respectivos níveis de inclusão (Tabela 3). Da mesma forma, os
221 indicadores plasmáticos também não foram alterados entre as dietas testadas (Tabela 3),
222 indicando atuação semelhante dos prebióticos sobre estes parâmetros.

223

224 *Parâmetros zootécnicos*

225 Os resultados de desempenho, eficiência alimentar e sobrevivência de alevinos de
226 tilápia do Nilo não foram alterados pela suplementação com os prebióticos em
227 diferentes níveis de inclusão (Tabela 4).

228

229 *Parâmetros bromatológicos*

230 Não foram encontradas diferenças entre os prebióticos ou entre seus níveis de inclusão
231 na dieta para a proteína bruta, gordura e matéria mineral no peixe inteiro (Tabela 5).
232 Para a umidade foi observada interação ($P < 0,05$) entre os prebióticos e o maior nível
233 inclusão (Tabela 5), onde os animais suplementados com 5 g kg^{-1} de Actigen®
234 apresentaram maior retenção de umidade corporal.

235

236 **Discussão**

237

238 O rendimento de extração dos novos prebióticos foi dependente da fonte utilizada como
239 base extrativa. Para o LINPre extraído a partir do grão de linhaça obtivemos rendimento
240 de 7,8%, mas dependendo da forma de extração, esses valores podem variar de 3,5-

241 9,4% (Mazza & Biliaderis, 1989; Fedeniuk & Biliaderis, 1994; Oomah *et al.*, 1995).
242 Semelhante ao nosso estudo e com a mesma matéria prima, Cui *et al.* (1994) também
243 obteve rendimento de 7,9% utilizando processo de extração em meio aquoso e
244 precipitação com três volumes de etanol a 95%. A extração de ORANPre a partir do
245 bagaço de laranja apresentou rendimento de 16,8%, o que é baixo comparado a
246 trabalhos que relatam rendimentos maiores que 30% com extração em meio ácido.
247 Porém, a maior eficiência do processo ácido é questionável, uma vez que gera resíduos
248 tóxicos de alto grau de poluente (Arthey & Ashurst, 1997). Em nosso estudo optamos
249 pela extração dos dois prebióticos em meio termo-aquoso, que embora menos eficiente,
250 apresenta as vantagens de baixo custo e garantia de seguridade ambiental.

251 Entre os prebióticos estudados, as características físico químicas de CH e de
252 CLG foram superiores para o LINPre que possui estrutura altamente ramificada e
253 diversificada quanto aos monômeros (Qian *et al.*, 2012), conferindo alta retenção de
254 água e gordura por unidade molecular. Já o Actigen® e o ORANPre apresentam
255 estruturas menos ramificadas e de menor peso molecular quando comparados ao
256 LINPre, o que explica seus menores valores de CH e CLG.

257 A maior capacidade de hidratação do LINPre (Tabela 2) pode resultar em
258 aumento da viscosidade da digesta quando níveis elevados forem suplementados
259 (Alzueta *et al.*, 2003), o que se reflete também no tempo de trânsito do conteúdo
260 intestinal, influenciando negativamente a quantidade de glicose absorvida pelo
261 organismo (Fabek *et al.*, 2014).

262 Apesar da diferenciação físico química entre os prebióticos, os níveis
263 adicionados não alteraram a CH e a CLG das dietas e não causaram efeitos expressivos
264 na digestão e absorção de nutrientes a ponto de causar variações na glicemia plasmática

265 (Tabela 3). Esse resultado já era esperado, considerando que os prebióticos foram
266 suplementados em níveis relativamente baixos e que o teor de glicose sanguínea tem
267 poucas variações em função da dieta, devido à eficiência dos mecanismos
268 homeostáticos do organismo.

269 A capacidade de ligação à gordura do LINPre foi maior quando comparado aos
270 outros prebióticos testados (Tabela 2), o que pode levar ao aumento na excreção de
271 ácidos biliares e consequente redução na absorção destes no intestino, reduzindo os
272 níveis de colesterol (Denis *et al.*, 2007; Theuwissen & Mensink, 2008). Contudo,
273 devido às semelhanças físico químicas entre as dietas (Tabela 2), o colesterol sanguíneo
274 das tilápias não foi alterado (Tabela 3). Hoseinifar *et al.* (2010) observaram que a
275 suplementação com oligofrutose reduziu os níveis de colesterol quando comparado ao
276 tratamento controle, enquanto os níveis séricos de glicose permaneceram inalterados.
277 Em contraste com este resultado, outros estudos relatam que a inulina dietética não teve
278 efeito sobre os níveis de colesterol no soro de trutas arco-íris (Akrami *et al.*, 2007).

279 A igualdade de resultados entre os tratamentos para os parâmetros
280 hematológicos avaliados em nosso estudo (Tabela 3) indica que os alevinos de tilápias
281 do Nilo responderam de forma semelhante aos prebióticos não comerciais quando
282 comparados ao prebiótico comercial, em diferentes níveis de inclusão. Os parâmetros
283 hematológicos são considerados valiosas ferramentas para avaliar a saúde dos peixes
284 (Houston 1997; Asadi *et al.* 2006) e podem ser afetados por diversos fatores que
285 incluem espécie, tamanho, idade, estado fisiológico, condições ambientais e regime
286 alimentar (Lim *et al.* 2000; Irianto & Austin, 2002; Osuigwe *et al.* 2005).

287 Em nosso estudo, os níveis de hemoglobina do sangue mantiveram-se
288 semelhantes entre os tratamentos testados, indicando igual eficiência no transporte de

289 oxigênio para os tecidos. Além de transportar oxigênio, a hemoglobina também
290 participa do processo de transporte de nutrientes e recolhe as substâncias secretadas
291 pelas células, conduzindo-as para vias de eliminação branquial e renal, principalmente
292 (Baldisserotto 2009). Possíveis alterações nos níveis de hemoglobina podem indicar
293 situação de estresse e afetar o desenvolvimento dos peixes (Talpur *et al.* 2014).

294 A adição dos prebióticos nas dietas de tilápia do Nilo não causou alterações
295 significativas nos resultados de albumina e proteínas totais do sangue, o que indica
296 efeito imunomodulador equivalente entre os tratamentos. A albumina é a fração mais
297 abundante entre as proteínas totais do sangue, responsável pelo transporte e
298 armazenamento de grande variedade de íons e moléculas orgânicas (Bruschi *et al.*
299 2013). As proteínas totais do sangue são indicadoras da resistência imunológica
300 (Andrews *et al.* 2011), pois suas frações são importantes na avaliação da condição de
301 saúde dos animais, atuando na regulação da resposta inflamatória e resposta a infecções
302 (Ballow 2011). Confirmando esta informação, Dügenci *et al.* (2003) relatam aumento
303 de proteínas totais em truta arco-íris alimentadas com dietas contendo
304 imunoestimulantes.

305 Welker *et al.* (2007) relataram que os níveis de proteína plasmática de *Ictalurus*
306 *punctatus* não foram afetados quando adicionado 0,2% de MOS na dieta. Em trabalho
307 realizado com tilápia do Nilo, Sado *et al.* (2008) relataram que 0,2-1,0% MOS não teve
308 efeito sobre a proteína total do plasma.

309 A equivalência de resultados zootécnicos e bromatológicos entre prebióticos não
310 comerciais e comercial são satisfatórios, demonstrando que o ORANPre e o LINPre
311 agem de maneira tão eficiente quanto o Actigen®. Em trabalhos realizados com a
312 adição de inulina, o desempenho crescimento de tilápias (*Oreochromis niloticus*)

313 (Ibrahim *et al.* 2010) e de pregado (*Psetta maxima*) (Mahious *et al.*, 2006) aumentou
314 significativamente quando comparado à dieta controle. A suplementação dietética de
315 Previda™ exerceu efeito positivo sobre o desempenho do red drum (*Sciaenops*
316 *ocellatus*), refletindo-se diretamente no ganho de peso (Zhou *et al.* 2010). Efeitos
317 positivos dos prebióticos também foram relatados para robalo híbrido (Li & Gatlin
318 2004), truta arco-íris (Staykov *et al.* 2007; Yilmaz *et al.* 2007), robalo europeu
319 (Torrecillas *et al.* 2007) e camarão (Zhou *et al.* 2007). Concordando com os nossos
320 resultados, numerosos trabalhos indicam efeitos positivos dos prebióticos sobre as taxas
321 de sobrevivência de organismos cultivados (Mahious *et al.* 2006; Sheikholeslami *et al.*
322 2007; Salze *et al.* 2008; Hoseinifar *et al.* 2010; Ibrahim *et al.* 2010; Soleimani *et al.*
323 2012). A elevada taxa de sobrevivência pela suplementação com prebióticos nos
324 estágios de larvas e alevinos, pode ser atribuída à melhorias da microbiota intestinal, da
325 morfologia intestinal e da imunidade (Talpur *et al.* 2014).

326 A semelhança de resultados entre os dois níveis de inclusão (2,5 e 5g kg⁻¹) dos
327 prebióticos testados em nosso estudo (ORANPre, LINPre e Actigen®) indicam que as
328 menores doses resultam em efeitos desejáveis, com menor custo. Estes resultados
329 enfatizam a importância de estabelecer níveis adequados de inclusão dos prebióticos nas
330 dietas, pois as subdosagens podem causar efeitos limitados ou nulos e as superdosagens
331 podem resultar em desequilíbrio da microbiota do trato gastrintestinal, com efeitos
332 indesejáveis para o desempenho dos animais.

333 Em conclusão, nossos resultados demonstram que na nutrição de tilápia do Nilo
334 os prebióticos não comerciais ORANPre e LINPre apresentaram eficiência equivalente
335 ao prebiótico comercial testado (Actigen®). Frente à busca por promotores de
336 crescimento alternativos na aquicultura, esse estudo confirma a possibilidade de

337 utilização desses novos prebióticos, ampliando as opções de aditivos *ecofriendly*,
338 permitindo melhores respostas no desempenho dos peixes.

339

340 **Agradecimentos**

341

342 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
343 Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de Produtividade em Pesquisa (Leila
344 Picolli da Silva), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
345 (CAPES) pela bolsa de Mestrado (Patrícia Inês Mombach), e às empresas Alltech®,
346 Agropecuária Giruá e Giovelli & Cia Ltda pela doação de ingredientes.

347

348 **Referências**

349

- 350 Akrami, R., Ghelichi, A. & Ebrahimi, A. (2007) The effects of inulin as prebiotic on
351 growth, survival and intestinal microflora of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
352 In: Proceeding of first national conference on fisheries sciences, p 20, 21–24 Jan,
353 Lahidjan, Iran.
- 354 Alzueta, C., Rodriguez, M. L., Cutuli, M. T., Rebole, A., Ortiz, L. T., Centeno, C. &
355 Treviño, J. (2003) Effect of whole and demucilaged linseed in broiler chicken diets
356 on digesta viscosity, nutrient utilisation and intestinal microflora. *Br. Poultry Sci.*,
357 **44**, 67-74.

- 358 Andrews, S.R., Sahu, N.P., Pal, A.K., Mukherjee, S.C. & Kumar, S. (2011) Yeast
359 extract, brewer's yeast and spirulina in diets for Labeorohita fingerling affect
360 haemato-immunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila*
361 challenge. *Rese. Vet. Sci.*, **91**, 103-109.
- 362 AOAC (1995) Official Methods of Analyses of the Association of Official Analytical
363 Chemists International, 16th edn. In: Association of official analytical chemists,
364 Supplement 1998. Washington.
- 365 Arthey, D. & Ashurst, P. (1997) *Procesado de frutas*. 273 p., Ed. Acribia, Zaragoza, ES.
- 366 Asadi, F., Rostami, A., Pourkibir, M. & Shahriari, A. (2006) Serum lipid and
367 lipoprotein profile of Asian tortoise (*Agrionemys horsfieldi*) in prehibernation state.
368 *Comp. Clin. Pathol.*, **16**, 193–195.
- 369 Baldisserotto, B. (2009) *Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura*. 2ª ed., 352p., Ed.
370 da UFSM, Santa Maria, BR.
- 371 Ballow, M. (2011) The IgG molecule as a biological immune response modifier:
372 mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and
373 inflammatory disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **127**, 315–23.
- 374 Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959) Rapid method of total lipid extraction and purification.
375 *Canadian. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.
- 376 Bruschi, M., Candiano, G., Santucci, L. & Ghiggeri, G.M. (2013) Oxidized albumin.
377 The long way of a protein of uncertain function. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**,
378 5473–5479.
- 379 Calliari, C. M. (2004) *Extração térmica, química e enzimática de pectina de bagaço de*
380 *laranja*. 96 f. Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos, Universidade
381 Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

- 382 Cui, W., Mama. G. & Biliaderis, C.G. (1994) Chemical structure, molecular size
383 distributions, and rheological properties of flaxseed gum. *J. Agric. Food Chem.*, **42**,
384 1891-1895.
- 385 Denis, L., Barbara, P. & Dominique, J. R. (2007) Digestible and indigestible
386 carbohydrates: interactions with postprandial lipid metabolism. *J. Nutr. Biochem.*,
387 **18**, 217-227.
- 388 Dügenci, K.S., Arda, N. & Candan, A. (2003) Some medicinal plants as
389 immunostimulant for fish. *J. Ethnopharmacol.*, **88**, 99-106.
- 390 Fabek , H., Messerschmidt, S., Brulport, V. & Goff, H.D. (2014) The effect of in vitro
391 digestive processes on the viscosity of dietary fibres and their influence on glucose
392 diffusion. *Food Hydrocolloids*, **35**, 718-26.
- 393 Fedeniuk, R.W. & Biliaderis, C.G. (1994) Composition and physicochemical properties
394 of linseed (*Linum usitatissimum L.*) mucilage. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 240-247.
- 395 Ganguly, S., Dora, K.C., Sarkar, S., Chowdhury, S. (2013) Supplementation of
396 prebiotics in fish feed: a review. *Rev Fish Biol Fisheries*, **23**, 195–199.
- 397 Goulart, F.R., Speroni, C. S., Lovatto, N.M., Loureiro, B. B., Corrêia, V., Radünz Neto,
398 J. & Silva, L. P. (2013) Atividade de enzimas digestivas e parâmetros de crescimento
399 de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com farelo de linhaça *in natura* e
400 demucilada. *Semina: Cien. Agrar.*, **34**, 3069-3080.
- 401 Hoseinifar, S.H., Zare, P. & Merrifield, D.L. (2010) The effects of inulin on growth
402 factors and survival of the Indian white shrimp larvae and postlarvae
403 (*Fenneropenaeus indicus*). *Aquacult. Res.*, **41**, 348–352.
- 404 Houston, H. (1997) Are the classical hematological variables acceptable indicators of
405 fish health? *Trans. Am. Fish Soc.*, **126**, 879–894.

- 406 Ibrahim, M.D., Fathi, M., Mesalhy, S. & Abd El-Aty, A.M. (2010) Effect of dietary
407 supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate
408 immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish*
409 *Immunol.*, **29**, 241-246.
- 410 Irianto, A. & Austin, B. (2002) Use of probiotics to control furunculosis in rainbow
411 trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **25**, 333–342.
- 412 Li, P. & Gatlin, D.M .III (2004) Evaluation of the prebiotic GroBiotic®-A and brewers
413 yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Morone chrysops* x
414 *M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. *Aquacult.* **248**, 197–
415 205.
- 416 Lim, C., Klesius, P.H., Li, M.H. & Robinson, E.H. (2000) Interaction between dietary
417 levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance
418 of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge.
419 *Aquacult.*, **185**, 313–327.
- 420 Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R. & Ollevier, F. (2006) Effect of
421 dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta máxima*
422 (Linnaeus, C. 1758). *Aquac. Int.*, **14**, 219–229.
- 423 Mazza, G. & Biliaderis, C.G. (1989). Functional properties of flaxseed mucilage. *I.*
424 *Food Sci.*, **54**, 1302.
- 425 Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.R., Bogwald, J.,
426 Castex, M. & Ringo, E. (2010) The current status and future focus of probiotic and
427 prebiotic applications for salmonids. *Aquacult.*, **302**, 1-18.
- 428 Meyer, G., Fracalossi, D.M. & Borba, M.R. (2004) A importância da quantidade de
429 energia na ração de peixes. *Pan. Aquicult.*, **14**, 53-57.

- 430 Mohnen, D. (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **11**, 266–
431 277.
- 432 Oomah, B.D., Kenaschuk, E.O., Cui, W. & Mazza, G. (1995) Variation in the
433 composition of water-soluble polysaccharides in flaxseed. *J. Agric. Food Chem.*, **43**,
434 1484-1488.
- 435 Osuigwe, D.I., Obiekezie, A.I., Onuoha, G.C. (2005) Some haematological changes in
436 hybrid catfish (*Heterobranchus longifilis x Clarias gariepinus*) fed different dietary
437 levels of raw and boiled jackbean (*Canavalia ensiformis*) seed meal. *Afr. J. Biotech.*,
438 **4**, 1017–1021.
- 439 Patterson, J.A. & Burkholder, K.M. (2003) Prebiotic feed additives: rationale and use in
440 pigs. In: Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in
441 Pigs, vol. 1, pp. 319–331 [RA Ball, editor]. Banff, Canada: University of Alberta.
- 442 Qian, K.Y., Cui, S.W., Wu, Y., & Goff, H.D. (2012) Flaxseed gum from flaxseed hulls:
443 Extraction, fractionation, and characterization. *Food Hydrocol.*, **28**, 275-83.
- 444 Rebolé, A., Rodríguez, M.L., Ortiz, L.T., Alzueta, C., Centeno, C. & Treviño, J. (2002)
445 Mucilage in linseed: effects on the intestinal viscosity and nutrient digestion in
446 broiler chicks. *J. Sci. Food Agric.*, **82**, 1171–1176.
- 447 Ringo, E., Olsen, R.E., Gifstad, T.O., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemre, G.-I. &
448 Bakke, A.M. (2010) Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquacult. Nutr.*, **16**, 117–
449 136.
- 450 Ringo, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Mayhew, T. & Olsen, R.E. (2006) The effect of
451 dietary inulin on bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Savelinus alpinus*
452 *L.*). *Aquacult. Res.*, **37**, 891–897.

- 453 Sado, R.Y. & Bicudo, A.J.A. (2008) Feeding dietary mannan oligosaccharides to
454 juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has no effect on hematological
455 parameters and showed decreased feed consumption. *J. World Aquacult. Soc.*, **39**,
456 821-826.
- 457 Salze, G., McLean, E., Schwarz, M.H. & Craig, S.R. (2008) Dietary mannan
458 oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia.
459 *Aquaculture*, **274**, 148–152.
- 460 Sheikholeslami, M., Yusefian, M., Yavari, V., Mohamadian, T., Abhari, H. & Goran, H.
461 (2007) Modulation of rainbow trout immune system and enhance resistance against
462 streptococosis using dietary inulin. In: The first national conference on Caspian Sea
463 fisheries resources, pp. 1–12. Gorgan University, Gorgan, Iran.
- 464 Silva, L.P. & Nörnberg, J.L. (2003) Prebióticos na nutrição de não ruminantes. *Ciênc.*
465 *Rural*, **33**, 983-990.
- 466 Soleimani, N., Hoseinifar, S.H., Merrifield, D.L., Barati, M. & Abadi, Z.H. (2012)
467 Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate
468 immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth
469 performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish Shellfish Immunol.*, **32**, 316-
470 321.
- 471 Staykov, Y., Spring, P., Denev, S. & Sweetman, J. (2007) Effect of a mannan
472 oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout
473 (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Int.*, **15**, 153-161.
- 474 Talpur, A.D., Munir, M.B., Mary, A. & Hashim, R. (2014) Dietary probiotics and
475 prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and

- 476 immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in
477 snakehead (*Channa striata*) fingerlings. *Aquacult.*, **426–427**, 14–20.
- 478 Tamura C., Nakauma M., Furusawa H., Kadota T., Kamata Y., Nishijima M., Itoh S. &
479 Sugita-Konishi Y. (2013) Formulation of a pectin gel that efficiently traps mycotoxin
480 deoxynivalenol and reduces its bioavailability. *Carbohydr. Polym.*, **93**, 747–752.
- 481 Theuwissen, E. & Mensink, R.P. (2008) Water-soluble dietary fibers and cardiovascular
482 disease. *Physiol. Behav.*, **94**, 285-292.
- 483 Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J.; Montero, D., Robaina, L., Real, F., J.
484 Sweetman, J., Tort, L. & Izquierdo, M.S. (2007) Immune stimulation and improved
485 infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan
486 oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol.*, **23**, 969 – 981.
- 487 Van Laere, K.M.J., Bosveld, M., Schols, H.A., Beldman, G. & Voragen, A.G.J. (1997)
488 Fermentative degradation of plant cell wall derived oligosaccharides by intestinal
489 bacteria. In: Hartemink R. ed. Proceedings of the International Symposium ‘Non-
490 digestible oligosaccharides: healthy food for the colon?’, Wageningen: Graduate
491 Schools VLAG and WIAS. pp. 37–46.
- 492 Verdonk, J. M. A. J., Shim, S. B., Leeuwen. P. & Verstegen, M. W. A. (2005)
493 Application of inulin-type fructans in animal feed and pet food. *Br. J. Nutr.*, **93**, 125–
494 138.
- 495 Wang, J. C. & Kinsella, J. E. (1976) Functional properties of novel proteins: alfalfa leaf
496 proteins. *J. Food Sci.*, **41**, 286-292.
- 497 Welker, T.L., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Shelby, R. & Klesius, P.H. (2007) Immune
498 response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel

- 499 catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or
500 yeast subcomponents. *J. World Aquacult. Soc.* **38**, 24–35.
- 501 Yilmaz, E., Genc, M.A. & Gene, E. (2007) Effects of dietary mannanoligosaccharides
502 on growth body composition and intestinal and liver histology of rainbow trout,
503 *Oncorhynchus mykiss*. *Isr. J. Aquac.-Bamid.*, **59**, 182–188.
- 504 Zhou, Q.C., Buentello, J.A. & Gatlin D.M. III (2010) Effects of dietary prebiotics on
505 growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum
506 (*Sciaenops ocellatus*). *Aquacult.*, **309**, 253-257.
- 507 Zhou, Z., Ding, Z. & Huiyuan, L.V. (2007) Effects of dietary short-chain
508 fructooligosaccharides on intestinal microflora, survival, and growth performance of
509 juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.*, **38**, 296–301.

Tabela 1 – Ingredientes e composição proximal das dietas experimentais fornecidas às tilápias do Nilo

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Dietas					
	ORANPre		LINPre		Actigen®	
	2,5	5	2,5	5	2,5	5
Farinha de peixe ¹	300	300	300	300	300	300
Amido de milho	300	300	300	300	300	300
Celulose	57,5	55	57,5	55	57,5	55
CPS 60% ²	200	200	200	200	200	200
ORANPre	2,5	5	0	0	0	0
LINPre	0	0	2,5	5	0	0
Actigen®	0	0	0	0	2,5	5
Melbond® ³	25	25	25	25	25	25
Óleo de soja	30	30	30	30	30	30
Mistura vitamínica e mineral ⁴	30	30	30	30	30	30
Cloreto de sódio iodado	5	5	5	5	5	5
Inerte	50	50	50	50	50	50
BHT ⁵	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Composição das dietas (g kg ⁻¹)						
Umidade ⁶	46,8	44,4	40,8	44,6	44,5	43,8
Proteína bruta ⁶	292,6	303,1	300	298,7	295,3	300,9
Energia digestível (MJ kg ⁻¹) ⁷	12,96	12,96	12,96	12,96	12,96	12,96
Gordura ⁶	73	74,9	76,5	73,5	73,8	75,3
Matéria mineral ⁶	161,1	160,2	162,8	161,2	159,3	160,2
Ca ⁸	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9
P ⁸	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
Fibra alimentar total ⁶	187,2	200,2	185,7	185,6	201,1	200

¹Farinha de peixe oriunda da empresa Copisces, Paraná, RS.

²Concentrado proteico de soja 60%PB;

³Aglutinante Lignosulfonato de Cálcio e Magnésio;

⁴Mistura vitamínica e mineral - composição/Kg de produto: Ác.Fólico: 299,88 mg; Ác. Ascórbico: 15.000,12 mg; Ác. Pantotênico: 3.000,10 mg; Biotina: 0,06 mg; Niacina (B3): 9.000,32 mg; Colina (B4): 103.500,00 mg; Vitamina A: 1.000.000,00 UI; Vitamina B1: 1.500,38 mg; Vitamina B2: 1.500,00 mg; Vitamina B6: 1.500,38 mg; Vitamina D3: 240.000,00 UI; Vitamina E: 10.000,00 mg; Vitamina K3: 400,00 mg; Inositol: 9.999,92 mg; Ferro: 6.416,80 mg; Manganês: 8.000,40 mg; Cobre: 1.000,00 mg; Zinco: 13.999,50 mg; Iodo: 45,36 mg; Cobalto: 60,06 mg; Selênio: 60,30 mg; Magnésio: 5,10 mg; Cloro: 2,30%; Enxofre: 0,01%;

⁵Antioxidante Butil Hidróxi Tolueno;

⁶Composição analisada (Laboratório de Piscicultura/UFSM);

⁷Energia digestível calculada: [(Proteína bruta * 5,65 * 0,85) + (Gordura * 9,4 * 0,9) + (Carboidratos * 4,15 * 0,7)] (adaptado de Meyer *et al.*, 2004);

⁸Valores calculados com base na composição dos ingredientes.

Tabela 2 – Capacidade de hidratação (CH) e capacidade de ligação à gordura (CLG) dos prebióticos e das dietas experimentais ¹

Prebióticos						
Variáveis	ORANPre		LINPre		Actigen®	
CH	0,63±0,15 ^c		31,7±0,69 ^a		2,16±0,04 ^b	
CLG	0,88±0,01 ^c		2,06±0,01 ^a		0,99±0,01 ^b	
Dietas experimentais						
	ORANPre		LINPre		Actigen®	
	2,5	5	2,5	5	2,5	5
CH	1,77±0,03	1,62±0,01	1,75±0,18	1,68±0,04	1,84±0,27	1,61±0,05
CLG	1,24±0,23	1,04±0,01	1,08±0,00	1,13±0,20	1,07±0,03	1,02±0,02

¹Valores expressos como média±desvio padrão.

Tabela 3 – Parâmetros sanguíneos e plasmáticos de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo ORANPre, LINPre ou Actigen®¹

Fator/Variáveis ²	GLI (mmol)	COL (mmol)	HMG (mmol)	PRT (g)	ALB (mmol)
Prebiótico ³					
ORANPre	65,47±12,60	50,16±8,88	7,14±1,05	3,11±0,21	0,45±0,18
LINPre	62,37±15,17	48,32±14,16	7,49±0,63	3,04±0,46	0,42±0,19
Actigen®	67,74±16,50	45,13±9,83	7,26±1,24	3,01±0,32	0,48±0,19
Nível (g kg ⁻¹) ⁴					
2,5	61,46±13,66	47,00±12,70	7,11±0,98	3,03±0,24	0,47±0,13
5	68,76±15,12	48,60±9,75	7,48±0,99	3,07±0,43	0,43±0,23
Fonte x Nível	NS	NS	NS	NS	NS

¹ Valores expressos como média±desvio padrão. ² Variáveis - HMG: hemoglobina; PRT: proteínas totais; ALB: albumina; GLI: glicose; COL: colesterol. ³ Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (p<0,05). ⁴ Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste “t” de Student (p<0,05). NS: não significativo (p>0,05).

Tabela 4 – Desempenho, eficiência alimentar e sobrevivência de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo ORANPre, LINPre ou Actigen®¹

Fator/Variáveis ²	BT (g)	GPR (%)	CAA	S (%)
Prebiótico ³				
ORANPre	1593,80±85,22	1752,07±78,67	1,10±0,03	98,33±1,78
LINPre	1595,92±40,52	1749,03±75,06	1,10±0,02	98,33±1,78
Actigen®	1542,20±104,79	1677,54±116,52	1,14±0,05	99,16±1,55
Nível (g kg ⁻¹) ⁴				
2,5	1601,17±84,66	1753,28±103,62	1,10±0,04	98,61±1,72
5	1553,44±74,77	1699,15±80,10	1,12±0,03	98,61±1,72
Fonte x Nível	NS	NS	NS	NS

¹ Valores expressos como média±desvio padrão. ² Variáveis - BT: biomassa total; GPR: ganho em peso relativo CAA: conversão alimentar aparente; S: sobrevivência. ³ Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (p<0,05). ⁴ Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste “t” de Student (p<0,05). NS: não significativo (p>0,05).

Tabela 5 – Composição centesimal (%) de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo ORANPre, LINPre ou Actigen®¹

Fator/Variáveis ²	Umidade	PB	Gordura	MM
Prebiótico ³				
ORANPre	71,26±1,02	14,56±0,55	8,75±0,68	3,90±0,48
LINPre	71,48±1,13	14,39±0,80	8,51±1,01	4,12±0,43
Actigen®	70,96±0,68	13,95±0,64	9,04±0,36	4,07±0,40
Nível (g kg ⁻¹) ⁴				
2,5	71,14±1,06	14,25±0,86	8,97±0,70	3,94±0,43
5	71,33±0,86	14,35±0,51	8,57±0,74	4,11±0,43
Fonte x Nível	0,046	NS	NS	NS

¹ Valores expressos como média±desvio padrão. ² Variáveis - PB: proteína bruta; MM: matéria mineral; PBTD: proteína bruta total depositada; GTD: gordura total depositada. ³ Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (p<0,05). ⁴ Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste “t” de Student (p<0,05). NS: não significativo (p>0,05).

1 **ARTIGO II**

2

3 **NOVOS PREBIÓTICOS NO DESEMPENHO E METABOLISMO**
4 **DE TILÁPIA DO NILO***

5

6 Efeito prebiótico de aditivos *ecofriendly*

7 **PALAVRAS-CHAVE:** peixe, *Oreochromis niloticus*, nutrição, aditivo, pectina de polpa
8 cítrica, mucilagem de linhaça

9

10 **Resumo**

11 O estudo foi conduzido para avaliar a inclusão de novos prebióticos na dieta de
12 alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Durante 60 dias, 720 tilápias do
13 Nilo (peso médio inicial: $3,4 \pm 0,60$ g) foram mantidas em 24 caixas de polipropileno com
14 volume útil de 280 litros. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia com as dietas
15 experimentais, com adição de 2,5 e 5 g kg⁻¹ de ORANPre, LINPre e Actigen®
16 (prebiótico comercial). O delineamento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial
17 3x2. No final do período, foi observado maior peso final das tilápias alimentadas com as
18 dietas contendo os prebióticos não comerciais (ORANPre e LINPre) e independente do
19 prebiótico, os melhores resultados em peso final e comprimento total foram observados
20 para 2,5 g kg⁻¹ de inclusão. Houve maior deposição de proteína corporal nas tilápias
21 alimentadas com as dietas contendo ORANPre, não diferindo daquelas com inclusão de
22 LINPre. A gordura total depositada foi superior para o menor nível de inclusão (2,5 g
23 kg⁻¹). O índice digestivossomático foi superior para a dieta com inclusão de ORANPre,

* Após tradução para a língua inglesa, será submetido à revista Aquaculture Nutrition

24 não diferindo da dieta com inclusão do prebiótico comercial (Actigen®). Observamos
25 maiores concentrações de glicogênio hepático nas dietas contendo ORANPre e
26 Actigen®, sem diferença entre os níveis suplementados. Nossos resultados demonstram
27 a possibilidade de utilização dos novos prebióticos (ORANPre e LINPre) nas dietas de
28 tilápia do Nilo.

29

30

31 **New prebiotics on performance and metabolism of Nile tilapia**

32

33 Prebiotic effect of ecofriendly additives

34 **KEY-WORDS:** fish, *Oreochromis niloticus*, nutrition, additive, citrus pulp pectin, linseed
35 mucilage

36

37 **Abstract**

38 The study was conducted to evaluate the inclusion of new prebiotics in the diet
39 fingerlings of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). During 60 days, 720 Nile tilapia
40 (average weight: 3.4 ± 0.60 g) were maintained in 24 polypropylene boxes with a
41 volume of 280 liters. Fish were fed three times a day with the experimental diets with
42 addition 2.5 and 5 g kg⁻¹ of ORANPre, LINPre and Actigen® (commercial prebiotic).
43 The design was completely randomized in a 3x2 factorial arrangement. At the end of the
44 period, it was observed a higher final weight of the tilapias fed diets containing non-
45 commercial prebiotics (ORANPre and LINPre) and independent of the prebiotic, the
46 best results in the final weight and length were observed for 2.5 g kg⁻¹ of inclusion.
47 There was a higher body protein deposition in tilapia fed with diets containing

48 ORANPre, not differing from those with inclusion of LINPre. The total fat deposited
49 was higher for the lowest level of inclusion (2.5 g kg^{-1}). The digestive somatic index
50 was higher for the diet with inclusion of ORANPre did not differ from diet with
51 inclusion of Actigen®. We observed higher concentrations of liver glycogen in the diets
52 containing ORANPre and Actigen®, with no difference between the supplemented
53 levels. Our results demonstrate the possibility of using the new prebiotics (ORANPre
54 and LINPre) in the diet of Nile tilapia.

55

56

57 **Introdução**

58

59 O consumo per capita de pescado aumentou expressivamente nas últimas décadas,
60 passando de 9,9 kg em 1960 para 19,2 kg em 2012, o que foi impulsionado pela
61 combinação de crescimento populacional, aumento da renda, urbanização e canais de
62 distribuição mais eficientes (FAO 2014). A consequente intensificação na produção
63 levou à maior suscetibilidade dos peixes a doenças infecciosas, normalmente
64 controladas pelo uso de antibióticos como promotores de crescimento, o que atualmente
65 é prática questionável por apresentar riscos iminentes à saúde de animais e humanos
66 (Regulamento (EC) No 1831/2003). Neste cenário, os prebióticos são apontados como
67 alternativa ambientalmente amigável para prevenir doenças e promover o crescimento
68 dos animais (Ringo *et al.* 2010; Dimitroglou *et al.* 2011).

69 Prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que promovem o
70 crescimento e/ou atividade fermentativa de bactérias benéficas no trato gastrintestinal
71 do hospedeiro (Gibson & Roberfroid 1995), gerando ácidos graxos voláteis que podem

72 ser usados como fonte de energia e promotores de alterações benéficas no metabolismo,
73 fisiologia e anatomia do trato digestório dos animais. Estudos têm indicado que os
74 prebióticos melhoram o aproveitamento dos nutrientes e o desempenho de crescimento
75 de várias espécies de peixes (Mahious *et al.* 2006; Staykov *et al.* 2007; Torrecillas *et al.*
76 2007; Burr *et al.* 2008; Grisdale-Helland *et al.* 2008).

77 Normalmente a formulação dos prebióticos comerciais se baseia em três grandes
78 grupos de oligossacarídeos (frutooligossacarídeos, mananoligossacarídeos e
79 galactooligossacarídeos), o que limita as opções de escolha de melhor ingrediente ativo,
80 visto que os resultados serão influenciados pelo tipo do prebiótico, níveis de adição,
81 tempo de uso, características do animal, composição da dieta e ambiente criatório
82 (Grisdale-Helland *et al.* 2008). Acredita-se que uma maior diversidade de moléculas
83 prebióticas amplie as opções de aditivos *ecofriendly*, permitindo melhores respostas no
84 desempenho dos peixes.

85 Neste cenário, substâncias pécticas surgem como alternativa promissora por
86 apresentarem composição química estrutural diferenciada, formadas majoritariamente
87 de α -D-(1,4)-galacturonic acid com uma fração de rhamnose e pequenas quantidades de
88 outros açúcares (Mohnen 2008). Estudos reportam sua promoção no desenvolvimento
89 de bactérias acidolíticas, inibição de microrganismos nocivos, redução da absorção de
90 toxinas no trato digestório e quelação de metais pesados (Tamura *et al.* 2013).
91 Adicionalmente, a obtenção das substâncias pécticas para uso como agente prebiótico é
92 industrialmente factível, economicamente viável e ambientalmente correta, uma vez que
93 pode ser usado bagaço de frutas resultante da extração de suco como matéria prima.

94 Da mesma forma, a mucilagem de grãos de linhaça, formada de dois tipos de
95 polissacarídeos (neutral arabinoxylan e acidic pectic-like material) compostos de

96 arabinose, xilose, ácido urônico, rhamnose, galactose e ácido galacturônico (Cui *et al*
97 1994), também desperta interesse como promotor *ecofriendly*. In natura, o uso do grão
98 pode levar a efeitos antinutricionais nos peixes e outros animais, devido à elevação
99 considerável de viscosidade da digesta, dificultando a digestão e a absorção de
100 nutrientes, o que refletirá negativamente sobre o desempenho (Rebolé *et al* 2002). No
101 entanto, a mucilagem pode ser extraída do grão de linhaça, concentrada e aplicada em
102 níveis racionais, promovendo efeitos benéficos e ampliando a disponibilidade de
103 moléculas prebióticas na nutrição animal.

104 Com objetivo de ampliar as opções de produtos *ecofriendly* para piscicultura,
105 nós estudamos os efeitos de novos prebióticos não comerciais (ORANPre e LINPre)
106 extraídos de bagaço de laranja e de grãos de linhaça, sobre o desempenho e
107 metabolismo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

108

109 **Material e métodos**

110

111 *Obtenção dos novos prebióticos*

112 O resíduo resultante da extração de suco de laranja foi lavado em água fria e prensado
113 manualmente, triturado em multiprocessador, seco em estufa (55°C por 24 horas) e
114 moído a 0,3mm em micro moinho (Marconi, model MA-630/1, 27000rpm). Usando a
115 metodologia descrita por Calliari (2004), os constituintes pécnicos e de potencial
116 prebiótico foram extraídos do resíduo em meio aquoso, na concentração de 8% (p/v),
117 sob temperatura de 100°C, durante 1 hora. Após esfriar, a solução foi centrifugada
118 (3500rpm/10min) e ao sobrenadante adicionou-se etanol 93% na proporção de 1:1. A
119 solução permaneceu em repouso durante 24h a 5°C, para precipitação e separação dos

120 constituintes pécnicos. Após recuperação, o precipitado foi seco a 55°C durante 48 horas
121 em estufa de circulação e moído a 0,3mm. O material resultante dessa extração foi
122 denominado de ORANPre.

123 Seguindo metodologia proposta por Goulart *et al.* (2013), a mucilagem foi
124 extraída do grão inteiro da linhaça (variedade Normandy) em meio aquoso, na
125 concentração de 10% (p/v), sob temperatura entre 60 a 80°C e agitação constante, por
126 150 minutos. O sobrenadante foi separado das sementes e acrescido de etanol 93% até
127 concentração alcoólica final de 75%. Após recuperação, o precipitado foi seco a 55°C
128 durante 48 horas em estufa de circulação e moído a 0,3mm. O material resultante foi
129 denominado de LINPre.

130

131 *Dietas*

132 As dietas foram isonutritivas e formuladas de acordo com as exigências nutricionais
133 para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os seis tratamentos
134 consistiram de dietas suplementadas com ORANPre, LINPre ou Actigen® (produto
135 comercial à base de mananoligossacarídeos), em dois níveis (2,5 ou 5 g kg⁻¹).

136 Todos os ingredientes das dietas foram pesados, misturados e peletizados. Os
137 pellets foram secos em estufa de circulação (50°C) por 24h, e o tamanho para consumo
138 foi ajustado de acordo com o desenvolvimento dos peixes. Ingredientes e composição
139 proximal das dietas experimentais são apresentados na Tabela 1.

140

141 *Ensaio biológico*

142 O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da
143 Universidade Federal de Santa Maria (nº 23081.009051/2014-53) e conduzido no
144 Laboratório de Piscicultura desta instituição.

145 Foram utilizadas 24 unidades experimentais (seis tratamentos com quatro
146 repetições) com volume útil de 280L, dispostas em sistema de recirculação de água,
147 com filtragem mecânica e biológica. Na estrutura foram distribuídos 720 alevinos de
148 tilápia do Nilo com peso médio inicial de $3,4 \pm 0,60$ g (30 animais/tanque), adaptados por
149 sete dias antes de iniciar o experimento. Durante os 60 dias experimentais, os peixes
150 foram alimentados três vezes ao dia (8h, 12h30min e 17h) até a saciedade aparente.

151

152 *Qualidade da água*

153 O controle da qualidade da água do sistema de criação foi realizado por limpezas
154 periódicas dos encanamentos, sifonagem dos resíduos de cada tanque duas vezes ao dia,
155 uma hora antes das alimentações (7h e 16h) e renovação diária de 10% da água do
156 sistema. Diariamente foi mensurada a temperatura com termômetro de bulbo de
157 mercúrio ($26,7 \pm 1,46^\circ\text{C}$ pela manhã e $27,05 \pm 1,34^\circ\text{C}$ pela tarde). Semanalmente foram
158 mensurados por kits colorimétricos (Alfa-Tecnoquímica) o oxigênio dissolvido
159 ($7,24 \pm 0,73$ mg L⁻¹), o pH ($7,63 \pm 0,35$), a alcalinidade ($46 \pm 12,47$ mg CaCO₃/L⁻¹), a
160 dureza ($31,5 \pm 23,46$ mg CaCO₃/L⁻¹), a amônia ($0,27 \pm 0,18$ mg L⁻¹) e o nitrito
161 ($0,14 \pm 0,20$ mg L⁻¹). A água para as análises foi coletada na entrada do filtro biológico.

162

163 *Coleta de dados e variáveis avaliadas*

164 Aos 60 dias experimentais foi realizada coleta de dados a fim de avaliar o desempenho
165 dos peixes. Foi realizada biometria com peixes em jejum de 12 h e sedados com

166 benzocaína (Henrifarma[®] Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA; Cambuci, SP,
167 Brazil) na concentração de 100mg L⁻¹. Oito peixes/tratamento foram eutanasiados por
168 overdose de benzocaína (250mg L⁻¹) para a análise da composição do peixe inteiro. Oito
169 peixes/tratamento foram eutanasiados por overdose de benzocaína (250mg L⁻¹) para o
170 cálculo de rendimento de carcaça e índices digestivos, sendo também coletado o fígado
171 para a realização de análises metabólicas.

172 Parâmetros zootécnicos: A partir das medidas de peso e comprimento foram
173 obtidos os seguintes dados: peso final: PF (g); comprimento total: CT (cm); taxa de
174 crescimento específico (%/dia): $TCE = (\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial})) / \text{dias} * 100$.

175 Com os dados coletados na biometria de 60 dias de experimento foram
176 calculados: rendimento de carcaça (%): $RC = (\text{peso do peixe eviscerado} / \text{peso do peixe}$
177 $\text{inteiro}) * 100$; índice digestivosomático (%): $IDS = (\text{peso do trato digestório} / \text{peso do}$
178 $\text{peixe inteiro}) * 100$; índice hepatossomático (%): $IHS = (\text{peso do fígado} / \text{peso do peixe}$
179 $\text{inteiro}) * 100$; índice de gordura visceral (%): $IGV = (\text{peso da gordura visceral} / \text{peso do}$
180 $\text{peixe inteiro}) * 100$.

181 Retenção corporal de nutrientes: As amostras de peixe inteiro foram analisadas
182 quanto à proteína bruta (AOAC 1995) e gordura (Bligh & Dyer 1959) para posterior
183 cálculo de retenção corporal destes nutrientes a partir das equações:

184 - Proteína bruta total depositada (PBDT): $[Pf * (\%PBCf/100)] - [Pi *$
185 $(\%PBCi/100)]$;

186 - Gordura total depositada (GTD): $[Pf * (\%GCf/100)] - [Pi * (\%GCI/100)]$;

187 Onde: Pf = peso final; Pi = peso inicial; PBCf = proteína bruta corporal final;
188 PBCi = proteína bruta corporal inicial; GCf = gordura corporal final; GCI = gordura
189 corporal inicial.

190 Parâmetros metabólicos: No fígado foram quantificados teores de proteínas
191 totais (Bradford 1976), glicose e glicogênio (Park & Johnson 1949).

192

193 *Delineamento experimental e análise estatística*

194 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x2. Os
195 resultados foram submetidos à teste de normalidade e análise de variância (2 vias:
196 prebióticos x níveis). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan (prebióticos) e
197 “t” de Student (níveis) ao nível de 5% de significância.

198

199 **Resultados**

200

201 *Parâmetros zootécnicos e retenção corporal de nutrientes*

202 Foi observado maior peso final (PF) das tilápias alimentadas com as dietas contendo os
203 prebióticos não comerciais (ORANPre e LINPre) quando comparados ao produto
204 comercial (Tabela 2). Independente do prebiótico, os melhores resultados em PF ($P =$
205 $0,04$) e comprimento total (CT) ($P = 0,03$) foram observados para $2,5\text{g kg}^{-1}$ de inclusão
206 (Tabela 2). Os prebióticos testados mostraram equivalência quanto a sua ação em CT e
207 taxa de crescimento específico (TCE).

208 O rendimento de carcaça das tilápias não foi influenciado pelos tratamentos
209 testados. Houve maior deposição de proteína corporal nas tilápias alimentadas com as
210 dietas com inclusão de ORANPre, não diferindo daquelas com adição de LINPre
211 (Tabela 3). A gordura total depositada não foi afetada pelos prebióticos, mas foi
212 superior para o menor nível de inclusão ($2,5\text{ g kg}^{-1}$).

213 O índice digestivossomático (IDS) foi superior para a dieta com inclusão de
214 ORANPre, não diferindo da dieta com inclusão do prebiótico comercial (Tabela 4). A
215 atuação dos prebióticos sobre o índice hepatossomático (IHS) e índice de gordura
216 visceral (IGV) foi semelhante.

217

218 *Parâmetros metabólicos*

219 Maiores concentrações de glicogênio hepático ($P = 0,036$) foram observadas nas dietas
220 contendo ORANPre e Actigen®, sem diferença entre os níveis testados (Tabela 5). Para
221 glicose e proteína hepática, não houve diferença entre os prebióticos, independente do
222 nível de inclusão.

223

224 **Discussão**

225

226 Nossos resultados demonstraram que os prebióticos não comerciais ORANPre e LINPre
227 atuaram de forma equivalente ou superior ao prebiótico comercial na performance dos
228 peixes. A composição química e organização estrutural das moléculas contidas no
229 ORANPre (predominante de α -D-1,4-galacturonic acid) e no LINPre (neutral
230 arabinoxylan e acidic pectic-like material) são distintas daquelas relatadas para o
231 Actigen® (predominantemente de manose). Este fato leva a crer que a seletividade e
232 grau de fermentabilidade entre estes prebióticos também possa ser diferenciado,
233 refletindo-se diretamente sobre o desempenho animal.

234 O efeito promissor do menor nível ($2,5\text{g kg}^{-1}$) de inclusão demonstra que o apelo
235 de produto natural e sem riscos de bioacumulação na cadeia alimentar não pode ser
236 vinculado ao uso excessivo desses ingredientes nas suplementações dietéticas. Dessa

237 forma, pode-se afirmar que a popularização do uso de prebióticos somente será possível
238 a partir de estudos que estabeleçam níveis confiáveis de inclusão nas dietas. As
239 sobredoses podem levar a efeitos adversos, como distúrbios gastrintestinais, com
240 consequente desequilíbrio da população microbiana e redução da absorção de
241 nutrientes, refletindo diretamente no ganho de peso e saúde animal (Medeiros *et al*
242 2006). Já a dose ideal, que demonstra ser a menor neste estudo, promove efeitos
243 benéficos aliados ao menor custo de inclusão.

244 Ibrahem *et al.* (2010) encontraram resultados satisfatórios para a variável peso
245 final com dietas contendo 5 g kg⁻¹ de inclusão de inulina + vitamina C para tilápia do
246 Nilo. Já a inclusão de 20 g kg⁻¹ de inulina não causou efeito sobre o crescimento larvas
247 de *Psetta maxima*, quando comparada a suplementação com 20 g kg⁻¹ de oligofrutose
248 (Mahious *et al.* 2006). Torrecillas *et al.* (2007) relataram que 10 e 20 g kg⁻¹ de MOS
249 não produziu alterações significativas na composição corporal do robalo (*Dicentrarchus*
250 *labrax*). Em trabalho realizado com trutas arco-íris, o crescimento, a eficiência
251 alimentar e a sobrevivência dos animais foram melhores no tratamento contendo 2 g kg⁻¹
252 de MOS em comparação com aqueles alimentados com a dieta basal (Staykov *et al.*
253 2007). Estas informações comprovam que o tipo de prebiótico, o nível de inclusão e a
254 espécie estudada são fatores que influenciam diretamente nos resultados.

255 Como estratégia adaptativa, a estrutura do trato gastrintestinal dos peixes pode
256 ser alterada em resposta à composição da dieta, ampliando a área de contato com o
257 alimento, aumentando a digestibilidade e maximizando a absorção de nutrientes
258 (Leenhouders *et al.* 2006). Em nosso estudo, o índice digestivossomático (IDS) foi
259 maior nas dietas com inclusão de ORANPre e Actigen®, indicando a possibilidade de
260 aumento da espessura do tratogastrintestinal. Em trabalho realizado com larvas de

261 bijupirá (*Rachycentron canadum*), os prebióticos melhoraram a ultra-estrutura da
262 mucosa do intestino delgado, interferindo positivamente na absorção de nutrientes
263 (Salze *et al.* 2008).

264 Entre os efeitos metabólicos dos prebióticos está a geração de energia por meio
265 da fermentação, servindo de substrato para a formação de ácidos graxos de cadeia curta
266 (AGCC). A quantidade de energia gerada neste processo é variável em função da
267 estrutura e grau de fermentação da fibra. Em nosso estudo, os níveis de glicogênio
268 hepático foram maiores nas dietas contendo ORANPre e Actigen® (Tabela 3), o que
269 pode ser explicado pela estrutura química menos complexa destas fibras quando
270 comparado à estrutura do LINPre. Neste caso, as dietas contendo LINPre são de
271 fermentabilidade mais lenta, disponibilizando a energia aos poucos, havendo menor
272 armazenamento de excedentes na forma de glicogênio.

273 Embora com menor reserva de glicogênio, os peixes alimentados com as dietas
274 contendo LINPre não diferiram daqueles alimentados com inclusão de ORANPre
275 quanto ao peso final, deposição de proteína e deposição de gordura corporal. Estudos
276 relatam que produtos da fermentabilidade de alguns tipos de prebióticos podem
277 interferir na produção de hormônios relacionados ao crescimento e reprodução
278 (Cordeiro *et al.* 2009). Acreditamos que o LINPre possa ter interferido na resposta
279 hormonal, uma vez que o grão de linhaça possui compostos como as lignanas, que
280 quando fermentados podem interferir no metabolismo hormonal do hospedeiro
281 (Cupersmid *et al.* 2012).

282 Nossos resultados permitem concluir que os prebióticos não comerciais
283 ORANPre e LINPre apresentam ação equivalente ou superior ao prebiótico comercial
284 (Actigen®) no crescimento de tilápia do Nilo. Essa constatação confirma a

285 possibilidade de obtenção e uso de novos prebióticos, ampliando as opções de aditivos
286 *ecofriendly* na nutrição de peixes.

287

288 **Agradecimentos**

289

290 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
291 Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de Produtividade em Pesquisa (Leila
292 Picolli da Silva), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
293 (CAPES) pela bolsa de Mestrado (Patrícia Inês Mombach), e às empresas Alltech®,
294 Agropecuária Giruá e Giovelli & Cia Ltda pela doação de ingredientes.

295

296 **Referências**

297

298 AOAC (1995) Official Methods of Analyses of the Association of Official Analytical
299 Chemists International, 16th edn. In: Association of official analytical chemists,
300 Supplement 1998. Washington.

301 Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959) Rapid method of total lipid extraction and purification.
302 *Canadian. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.

303 Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
304 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*,
305 **72**, 248–254.

306 Burr, G., Hume, M., Neill, W.H., & Gatlin, D.M. III (2008) Effects of prebiotics on
307 nutrient digestibility of soybean-meal-based diets by red drum (*Sciaenops ocellatus*).
308 *Aquac. Res.*, **39**, 1680–1686.

- 309 Calliari, C. M. (2004) Extração térmica, química e enzimática de pectina de bagaço de
310 laranja. 96 f. Master's Dissertation Food Science and Technology, Universidade
311 Estadual de Londrina, Londrina, 2004.
- 312 Cordeiro, R., Fernandes P.L. & Barbosa, L.A. (2009) Semente de linhaça e o efeito de
313 seus compostos sobre as células mamárias. *Braz. J. Pharmacog.*, **19**, 727-732.
- 314 Cui, W., Mama. G. & Biliaderis, C.G. (1994) Chemical structure, molecular size
315 distributions, and rheological properties of flaxseed gum. *J. Agric. Food Chem.*, **42**,
316 1891-1895.
- 317 Cupersmid, L., Fraga, A.P.R., Abreu, E.S. & Rosier, I.O.P. (2012) Linhaça: composição
318 química e efeitos biológicos. *e-Sci.*, **5**, 33-40.
- 319 Dimitroglou, A., Reynolds, P., Ravnoy, B., Johnsen, F., Sweetman, J. W., Johan
320 Johansen, J. & Davies, S.J. (2011) The effect of mannan oligosaccharide
321 supplementation on atlantic salmon smolts (*Salmo salar l.*) fed diets with high levels
322 of plant proteins. *J. Aquac. Res. Development.*, S1:011.
- 323 FAO (2014) The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and
324 challenges. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture
325 Organization of the United Nations, Rome.
- 326 Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonie
327 microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. nutr.*, **125**, 1401-1412.
- 328 Goulart, F.R., Speroni, C. S., Lovatto, N.M., Loureiro, B. B., Corrêia, V., Radünz Neto,
329 J. & Silva, L. P. (2013) Atividade de enzimas digestivas e parâmetros de crescimento
330 de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com farelo de linhaça *in natura* e
331 demucilada. *Semina: Cien. Agrar.*, **34**, 3069-3080.

- 332 Grisdale-Helland, B., Helland, S.J. & Gatlin, D.M. III (2008) The effects of dietary
333 supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or
334 galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo*
335 *salar*). *Aquaculture*, **283**, 163-167.
- 336 Ibrahim, M.D., Fathi, M., Mesalhy, S. & Abd El-Aty, A.M. (2010) Effect of dietary
337 supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate
338 immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish*
339 *Immunol.*, **29**, 241-246.
- 340 Leenhouders, J.I., Adjei-Boateng, D., Verreth, J.A.J. & Schrama, J.W. (2006) Digesta
341 viscosity, nutrient digestibility and organ weights in african catfish (*Clarias*
342 *gariiepinus*) fed diets supplemented with different levels of a soluble non-starch
343 polysaccharide. *Aquacult. Nutr.*, **12**, 111-116.
- 344 Mahious, A.S., Gatesoupe, F.J., Hervi, M., Metailler, R. & Ollevier, F. (2006) Effect of
345 dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta máxima*
346 (Linnaeus, C. 1758). *Aquac. Int.*, **14**, 219–229.
- 347 Medeiros, L.B., Carrijo, A.S. & Negrini, J.M. (2006) Utilização de prebiótico na
348 alimentação de filhotes de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) em processo de
349 reabilitação. *Arch. Vet. Sci.*, **11**, 62-68.
- 350 Meyer, G., Fracalossi, D.M. & Borba, M.R. (2004) A importância da quantidade de
351 energia na ração de peixes. *Pan. Aquicult.*, **14**, 53-57.
- 352 Mohnen D. (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **11**, 266–
353 277.
- 354 Park, J.T. & Johnson, M.J. (1949) A submicro determination of glucose. *J. Biol. Chem.*,
355 **181**, 149-151.

- 356 Rebolé, A., Rodríguez, M.L., Ortiz, L.T., Alzueta, C., Centeno, C. & Treviño, J. (2002)
357 Mucilage in linseed: effects on the intestinal viscosity and nutrient digestion in
358 broiler chicks. *J. Sci. Food Agric.*, **82**, 1171–1176.
- 359 Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22
360 September 2003 on additives for use in animal nutrition (Text with EEA relevance).
361 <http://irmm.jrc.ec.europa.eu/SiteCollectionDocuments/EC-1831-2003.pdf>
- 362 Ringo, E., Olsen, R.E., Gifstad, T.O., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemre, G.-I. &
363 Bakke, A.M. (2010) Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquacult. Nutr.*, **16**, 117–
364 136.
- 365 Salze, G., McLean, E., Schwarz, M.H. & Craig, S.R. (2008) Dietary mannan
366 oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia.
367 *Aquaculture*, **274**, 148–152.
- 368 Staykov, Y., Spring, P., Denev, S. & Sweetman, J. (2007) Effect of a mannan
369 oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout
370 (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Int.*, **15**, 153-161.
- 371 Tamura C., Nakauma M., Furusawa H., Kadota T., Kamata Y., Nishijima M., Itoh S. &
372 Sugita-Konishi Y. (2013) Formulation of a pectin gel that efficiently traps mycotoxin
373 deoxynivalenol and reduces its bioavailability. *Carbohydr. Polym.*, **93**, 747–752.
- 374 Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J.; Montero, D., Robaina, L., Real, F., J.
375 Sweetman, J., Tort, L. & Izquierdo, M.S. (2007) Immune stimulation and improved
376 infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan
377 oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol.*, **23**, 969 – 981.

Tabela 1 – Ingredientes e composição proximal das dietas experimentais fornecidas às tilápias do Nilo

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Dietas					
	ORANPre		LINPre		Actigen®	
	2,5	5	2,5	5	2,5	5
Farinha de peixe ¹	300	300	300	300	300	300
Amido de milho	300	300	300	300	300	300
Celulose	57,5	55	57,5	55	57,5	55
CPS 60% ²	200	200	200	200	200	200
ORANPre	2,5	5	0	0	0	0
LINPre	0	0	2,5	5	0	0
Actigen®	0	0	0	0	2,5	5
Melbond® ³	25	25	25	25	25	25
Óleo de soja	30	30	30	30	30	30
Mistura vitamínica e mineral ⁴	30	30	30	30	30	30
Cloreto de sódio iodado	5	5	5	5	5	5
Inerte	50	50	50	50	50	50
BHT ⁵	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Composição das dietas (g kg ⁻¹)						
Umidade ⁶	46,8	44,4	40,8	44,6	44,5	43,8
Proteína bruta ⁶	292,6	303,1	300	298,7	295,3	300,9
ED (MJ kg ⁻¹) ⁷	12,96	12,96	12,96	12,96	12,96	12,96
Gordura ⁶	73	74,9	76,5	73,5	73,8	75,3
Matéria mineral ⁶	161,1	160,2	162,8	161,2	159,3	160,2
Ca ⁸	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9
P ⁸	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7
Fibra alimentar total ⁶	187,2	200,2	185,7	185,6	201,1	200

¹Farinha de peixe oriunda da empresa Copisces, Paraná, RS.

²Concentrado proteico de soja 60%PB;

³Aglutinante Lignosulfonato de Cálcio e Magnésio;

⁴Mistura vitamínica e mineral - composição/Kg de produto: Ác.Fólico: 299,88 mg; Ác. Ascórbico: 15.000,12 mg; Ác. Pantotênico: 3.000,10 mg; Biotina: 0,06 mg; Niacina (B3): 9.000,32 mg; Colina (B4): 103.500,00 mg; Vitamina A: 1.000.000,00 UI; Vitamina B1: 1.500,38 mg; Vitamina B2: 1.500,00 mg; Vitamina B6: 1.500,38 mg; Vitamina D3: 240.000,00 UI; Vitamina E: 10.000,00 mg; Vitamina K3: 400,00 mg; Inositol: 9.999,92 mg; Ferro: 6.416,80 mg; Manganês: 8.000,40 mg; Cobre: 1.000,00 mg; Zinco: 13.999,50 mg; Iodo: 45,36 mg; Cobalto: 60,06 mg; Selênio: 60,30 mg; Magnésio: 5,10 mg; Cloro: 2,30%; Enxofre: 0,01%;

⁵Antioxidante Butil Hidróxi Tolueno;

⁶Composição analisada (Laboratório de Piscicultura/UFSM);

⁷ED= energia digestível calculada: [(Proteína bruta * 5,65 * 0,85) + (Gordura * 9,4 * 0,9) + (Carboidratos * 4,15 * 0,7)] (adaptado de Meyer *et al.*, 2004);

⁸Valores calculados com base na composição dos ingredientes.

Tabela 2 – Parâmetros de crescimento de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo ORANPre, LINPre ou Actigen®¹

Fator/Variáveis ²	PF (g)	CT (cm)	TCE (%/dia)
Fonte ³			
ORANPre	62,31±12,7 ^a	14,14±0,99	4,86±0,07
LINPre	62,30±12,6 ^a	14,16±0,97	4,86±0,07
Actigen®	59,73±12,5 ^b	14,00±0,97	4,79±0,10
Nível (g kg ⁻¹) ⁴			
2,5	62,48±11,9 ^a	14,18±0,88 ^a	4,86±0,09
5	60,41±13,2 ^b	14,01±1,06 ^b	4,82±0,08
Fonte x Nível	NS	NS	NS

¹ Valores expressos como média±desvio padrão. ² Variáveis - PF: peso final; CT: comprimento total; TCE: taxa de crescimento específico. ³ Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (p<0,05). ⁴ Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste “t” de Student (p<0,05). NS: não significativo (p>0,05).

Tabela 3 – Rendimento de carcaça e deposição de nutrientes de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo ORANPre, LINPre ou Actigen®¹

Fator/Variáveis ²	RC (%)	PBTD (g)	GTD (g)
Fonte ³			
ORANPre	88,41±0,96	8,68±0,61 ^a	5,31±0,44
LINPre	88,31±1,01	8,54±0,71 ^{ab}	5,16±0,73
Actigen®	88,39±1,12	7,93±0,73 ^b	5,27±0,41
Nível (g kg ⁻¹) ⁴			
2,5	88,34±0,93	8,50±0,90	5,46±0,50 ^a
5	88,39±1,11	8,26±0,53	5,03±0,48 ^b
Fonte x Nível	NS	NS	NS

¹ Valores expressos como média±desvio padrão. ² Variáveis - RC: rendimento de carcaça; PBTD: proteína bruta total depositada; GTD: gordura total depositada. ³ Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (p<0,05). ⁴ Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste “t” de Student (p<0,05). NS: não significativo (p>0,05).

Tabela 4 – Índices digestivos de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo ORANPre, LINPre ou Actigen®¹

Fator/Variáveis ²	IDS (%)	IHS (%)	IGV (%)
Fonte ³			
ORANPre	3,45±0,70 ^a	2,38±0,27	1,88±0,81
LINPre	2,90±0,54 ^b	2,40±0,59	1,74±0,58
Actigen®	3,11±0,82 ^{ab}	2,37±0,24	1,83±0,88
Nível (g kg ⁻¹) ⁴			
2,5	3,25±0,70	2,43±0,35	1,78±0,62
5	3,05±0,74	2,33±0,24	1,85±0,88
Fonte x Nível	NS	NS	NS

¹ Valores expressos como média±desvio padrão. ² Variáveis - IDS: índice digestivosomático; IHS: índice hepatossomático; IGV: índice de gordura visceral. ³ Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (p<0,05). ⁴ Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste “t” de Student (p<0,05). NS: não significativo (p>0,05).

Tabela 5 – Respostas metabólicas de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas contendo ORANPre, LINPre ou Actigen®¹

Fator/Variáveis	Glicogênio (mmol)	Glicose (mmol)	Proteína (mg)
Fonte ²			
ORANPre	4,25±0,51 ^a	55,61±8,16	9,10±1,85
LINPre	3,66±0,76 ^b	48,70±7,44	8,32±1,32
Actigen®	4,31±0,95 ^a	52,42±11,87	8,62±1,58
Nível (g kg ⁻¹) ³			
2,5	4,00±0,74	52,48±10,57	8,86±1,39
5	4,15±0,87	52,00±8,73	8,50±1,80
Fonte x Nível	NS	NS	NS

¹ Valores expressos como média±desvio padrão. ² Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Duncan (p<0,05). ³ Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente pelo teste “t” de Student (p<0,05). NS: não significativo (p>0,05).

DISCUSSÃO GERAL

O rendimento de extração dos novos prebióticos foi dependente da fonte utilizada como base extrativa e está diretamente relacionado ao método de extração. A extração do ORANPre a partir do bagaço de laranja apresentou rendimento de 16,8%, sendo retirados aproximadamente 75% dos constituintes indigestíveis solúveis da matéria prima. Outros trabalhos relatam rendimentos superiores a 30% com extração em meio ácido, porém, a maior eficiência do processo ácido é questionável, uma vez que gera resíduos tóxicos de alto grau de poluente (ARTHEY; ASHURST, 1997). Nos grãos de linhaça, a extração do prebiótico LINPre rendeu 7,8%, o que corresponde a 53% dos constituintes indigestíveis solúveis desta fonte. Dependendo da forma de extração, o rendimento para esta fonte pode variar de 3,5-9,4% (MAZZA; BILIADERIS, 1989; FEDENIUK; BILIADERIS, 1994; OOMAH et al., 1995). Em nosso estudo optamos pela extração dos dois prebióticos em meio termo aquoso, que embora menos eficiente, apresenta as vantagens de baixo custo e garantia de seguridade ambiental.

Entre os prebióticos estudados, as características físico químicas de capacidade de hidratação (CH) e de capacidade de ligação a gordura (CLG) foram superiores para o LINPre que possui estrutura altamente ramificada e diversificada quanto aos monômeros (QIAN et al, 2012), conferindo alta retenção de água e gordura por unidade molecular. Já o Actigen® e o ORANPre apresentam estruturas menos ramificadas e de menor peso molecular quando comparados ao LINPre, o que explica seus menores valores de CH e CLG.

A maior CH do LINPre pode resultar em aumento da viscosidade da digesta quando níveis elevados forem suplementados (ALZUETA et al., 2003), o que se reflete também no tempo de trânsito do conteúdo intestinal, influenciando negativamente a quantidade de glicose absorvida pelo organismo (FABEK et al., 2014). A maior CLG do LINPre pode levar ao aumento na excreção de ácidos biliares e consequente redução na absorção destes no intestino, reduzindo os níveis de colesterol (DENIS et al., 2007; THEUWISSEN; MENSINK, 2008). Apesar da diferenciação físico química entre os prebióticos, os níveis adicionados não alteraram a CH e a CLG das dietas e não causaram efeitos expressivos na digestão e absorção de nutrientes a ponto de causar variações na glicemia e no colesterol sanguíneo das tilápias.

Quanto aos parâmetros zootécnicos, foi observado maior peso final das tilápias alimentadas com as dietas contendo os prebióticos não comerciais (ORANPre e LINPre) quando comparados ao produto comercial. Independente do prebiótico, os melhores resultados em peso final e comprimento total foram observados para 2,5g kg⁻¹ de inclusão. O efeito promissor do menor nível de inclusão (2,5g kg⁻¹) demonstra que a popularização do uso de prebióticos somente será possível a partir de estudos que estabeleçam níveis confiáveis de inclusão nas dietas. O apelo de produto natural e sem riscos de bioacumulação na cadeia alimentar não pode ser vinculado ao uso excessivo desses ingredientes nas suplementações dietéticas. As sobredoses podem levar a efeitos adversos, como distúrbios gastrintestinais, com conseqüente desequilíbrio da população microbiana e redução da absorção de nutrientes, refletindo diretamente no ganho de peso e saúde animal (MEDEIROS et al., 2006). Além disso, as menores doses de inclusão podem resultar em efeitos desejáveis com menor custo.

Os prebióticos testados mostraram equivalência quanto a sua ação sobre a taxa de crescimento específico (TCE), rendimento de carcaça (RC), biomassa total (BT), ganho de peso relativo (GPR), conversão alimentar aparente (CAA), sobrevivência (S), índice hepatossomático (IHS) e índice de gordura visceral (IGV).

O índice digestivossomático foi superior para a dieta com inclusão de ORANPre, não diferindo da dieta com inclusão do prebiótico comercial. A estrutura do trato gastrintestinal dos peixes pode ser alterada em resposta à composição da dieta, como estratégia adaptativa, visando ampliar a área de contato com o alimento e conseqüentemente aumentar a digestibilidade e absorção de nutrientes (LEENHOUWERS et al., 2006). Neste trabalho, o índice digestivossomático (IDS) foi maior nas dietas com inclusão de ORANPre e Actigen®. Considerando que este índice faz relação entre o peso do trato gastrintestinal e o peso do peixe, pode ter ocorrido aumento na espessura do trato gastrintestinal, o que refletiu no maior peso deste.

Para os parâmetros de carcaça, houve maior deposição de proteína corporal nas tilápias suplementadas com ORANPre, não diferindo daquelas suplementadas com LINPre. A gordura total depositada não foi afetada pelos prebióticos, mas foi superior para o menor nível de inclusão (2,5 g kg⁻¹).

Na avaliação dos parâmetros hematológicos, a hemoglobina do sangue das tilápias não foi influenciada significativamente pelos prebióticos e seus respectivos níveis de inclusão. Da mesma forma, os indicadores plasmáticos também não foram alterados entre as dietas

testadas, indicando atuação semelhante dos prebióticos sobre estes parâmetros. A igualdade de resultados entre os tratamentos para os parâmetros hematológicos avaliados em nosso estudo indica que os alevinos de tilápias do Nilo responderam de forma semelhante aos prebióticos não comerciais quando comparados ao prebiótico comercial, em diferentes níveis de inclusão. Os parâmetros hematológicos são considerados valiosas ferramentas para avaliar a saúde dos peixes (HOUSTON 1997; ASADI et al., 2006) e podem ser afetados por diversos fatores que incluem espécie, tamanho, idade, estado fisiológico, condições ambientais e regime alimentar (LIM et al., 2000; IRIANTO; AUSTIN 2002; OSUIGWE et al., 2005).

Nos parâmetros metabólicos foram observadas maiores concentrações de glicogênio hepático nas dietas contendo ORANPre e Actigen®, sem diferença entre os níveis testados. Para glicose e proteína hepática, não houve diferença entre os prebióticos, independente do nível de inclusão. Entre os efeitos metabólicos dos prebióticos está a geração de energia através da fermentação, servindo de substrato para a formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). A quantidade de energia gerada neste processo é variável em função da estrutura e grau de fermentação da fibra. Neste estudo os níveis de glicogênio hepático mostraram-se maiores nas dietas contendo ORANPre e Actigen® (prebiótico comercial a base de mananoligossacarídeos) (Tabela 3), o que pode ser explicado pela estrutura química menos complexa destas fibras quando comparado à estrutura da mucilagem de linhaça. Neste caso, as dietas contendo mucilagem de linhaça são de fermentabilidade mais lenta, disponibilizando a energia aos poucos, havendo menor armazenamento de excedentes na forma de glicogênio.

Na avaliação dos parâmetros bromatológicos não foram encontradas diferenças entre os prebióticos ou entre seus níveis de inclusão na dieta para a proteína bruta, gordura e matéria mineral no peixe inteiro. Para a umidade foi observada interação ($P < 0,05$) entre os prebióticos e o maior nível inclusão, onde os animais suplementados com 5 g kg^{-1} de Actigen® apresentaram maior retenção de umidade corporal.

Nossos resultados demonstraram que os prebióticos não comerciais ORANPre e LINPre atuaram de forma equivalente ou superior ao prebiótico comercial na performance dos peixes. A composição química e organização estrutural das moléculas contidas no ORANPre e no LINPre são diferentes daquelas relatadas para o Actigen®, predominantemente de manose. Este fato leva a crer que a seletividade e grau de fermentabilidade entre estes

prebióticos também possa ser diferenciado, refletindo-se diretamente sobre o desempenho animal.

CONCLUSÃO GERAL

Em conclusão, nossos resultados demonstram que na nutrição de tilápia do Nilo os prebióticos não comerciais ORANPre e LINPre são equivalentes ou superiores ao prebiótico comercial testado (Actigen®). Frente à busca por promotores de crescimento alternativos na aquicultura, esse estudo confirma a possibilidade de utilização desses novos prebióticos, ampliando as opções de aditivos *ecofriendly*, permitindo melhores respostas na promoção do bem estar e crescimento dos peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZUETA, C. et al. Effect of whole and demucilaged linseed in broiler chicken diets on digesta viscosity, nutrient utilisation and intestinal microflora. **British Poultry Science**, v. 44, n. 1, p. 67-74, 2003.

ARTHEY, D.; ASHURST, P. **Procesado de frutas**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1997, 273 p.

ASADI, F. et al. Serum lipid and lipoprotein profile of Asian tortoise (*Agrionemys horsfieldi*) in prehibernation state. **Comparative Clinical Pathology**, v. 16, n. 3, p. 193–195, 2006.

BURR, G. et al. Effects of prebiotics on nutrient digestibility of soybean-meal-based diets by red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture Research**, v. 39, n. 15, p. 1680–1686, 2008.

CANTERI, M. H. G.; WOSIACKI, L. M. G.; SCHEER, A. P. Pectina: da Matéria-Prima ao Produto Final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

CUI, W.; MAMA, G.; BILIADERIS, C. G. Chemical structure, molecular size distributions, and rheological properties of flaxseed gum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 9, p. 1891-1895, 1994.

DENIS, L.; BARBARA, P.; DOMINIQUE, J. R. Digestible and indigestible carbohydrates: interactions with postprandial lipid metabolism. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 18, n. 4, p. 217-227, 2007.

FABEK, H. et al. The effect of in vitro digestive processes on the viscosity of dietary fibres and their influence on glucose diffusion. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 718-726, 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges. Rome, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>>. Acesso em: 10 de out de 2014.

FEDENIUK, R. W.; BILIADERIS, C. G. Composition and Physicochemical Properties of Linseed (*Linum usitatissimum* L.) Mucilage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 240-247, 1994.

GANGULY, S. et al. Supplementation of prebiotics in fish feed: a review. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, n. 2, p. 195–199, 2013.

GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S. J.; GATLIN D. M. III. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 283, n. 1-4, p. 163–167, 2008.

HOUSTON, H. Are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health? **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 126, n. 6, p. 879–894, 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal**, v. 41, Rio de Janeiro, 2013.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Probiotics in aquaculture. **Journal of Fish Diseases**, v. 25, n. 11, p. 633–642, 2002.

LEENHOUWERS, J. I. et al. Digesta viscosity, nutrient digestibility and organ weights in african catfish (*Clarias gariepinus*) fed diets supplemented with different levels of a soluble non-starch polysaccharide. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, n. 2, p. 111-116, 2006.

LIM, C., KLESIOUS, P. H.; LI, M. H.; ROBINSON, E. H. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. **Aquaculture**, v. 185, p. 313–327, 2000.

MAHIOUS, A. S. et al. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta máxima* (Linnaeus, C. 1758). **Aquaculture International**, v. 14, n. 3, p. 219–229, 2006.

MAZZA, G.; BILIADERIS, C. G. Functional properties of flax seed mucilage. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 5, p.1302-1305, 1989.

MEDEIROS, L. B.; CARRIJO, A. S.; NEGRINI, J. M. Utilização de prebiótico na alimentação de filhotes de papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*) em processo de reabilitação. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 3, p. 62-68, 2006.

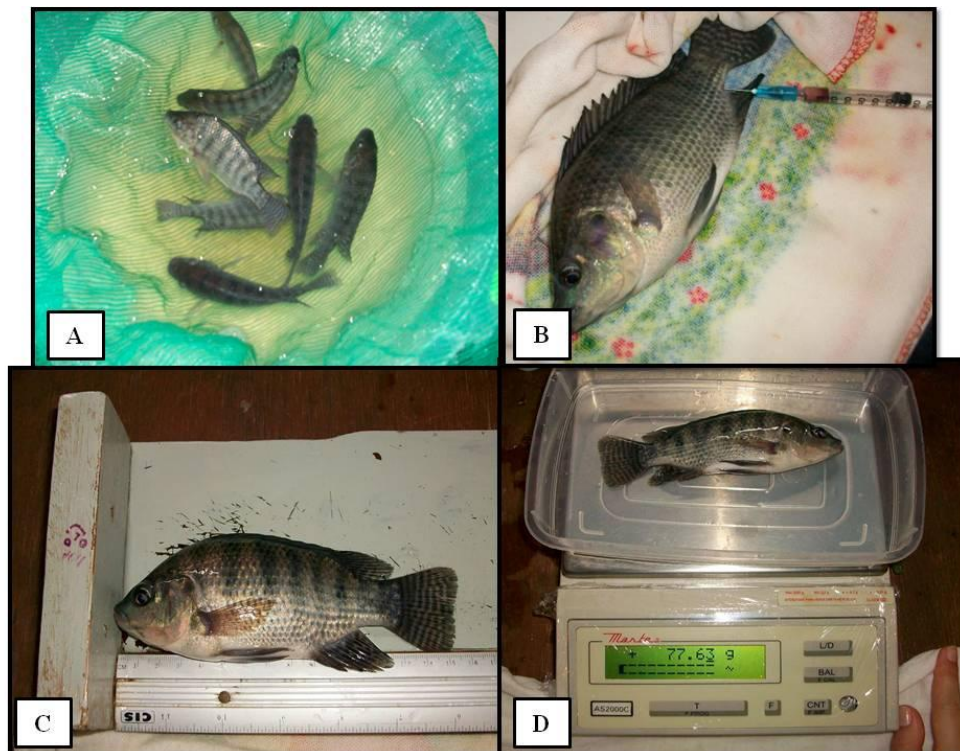
- MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266–277, 2008.
- MÜLLER, M.; PRADO, I. N. Metabolismo da pectina em animais ruminantes. Uma revisão. **Revista Varia Scientia**, v. 4, n. 8, p. 45-56, 2005.
- OOMAH, B. D. et al. Variation in the composition of water-soluble polysaccharides in flaxseed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n. 6, p. 1484-1488, 1995.
- OSUIGWE, D. I.; OBIEKEZIE, A. I.; ONUOHA, G. C. Some haematological changes in hybrid catfish (*Heterobranchus longifilis* x *Clarias gariepinus*) fed different dietary levels of raw and boiled jackbean (*Canavalia ensiformis*) seed meal. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 9, p. 1017–1021, 2005.
- QIAN, K. Y.; CUISW, W. U. Y.; GOFF, H. D. Flaxseed gum from flaxseed hulls: Extraction, fractionation, and characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 2, p. 275-83, 2012.
- REBOLÉ, A. et al. Mucilage in linseed: effects on the intestinal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 10, p.1171–1176, 2002.
- SILVA, L. P.; NÖRNBERG, J. L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 983-990, 2003.
- STAYKOV, Y., SPRING, P., DENEV, S.; SWEETMAN, J. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, v. 15, p. 153-161, 2007.
- TAMURA C. et al. Formulation of a pectin gel that efficiently traps mycotoxin deoxynivalenol and reduces its bioavailability. **Carbohydrate. Polymers**, v. 93, n. 2, p. 747–752, 2013.
- THEUWISSEN, E.; MENSINK, R. P. Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. **Physiology & Behavior**, v. 94, n. 2, p. 285–292, 2008.
- TORRECILLAS, S. et al. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish Shellfish Immunology**, v. 23, n. 5, p. 969–981, 2007.

ANEXOS

Anexo 1 - Sistema de recirculação de água onde foi conduzido o ensaio biológico



Anexo 2 - Exemplos de tilápia do Nilo durante a biometria final (A: Fase de sedação; B: Coleta de sangue; C: Medição; D: Pesagem)



Anexo 3 - Normas para a submissão de trabalhos na Revista Aquaculture Nutrition

Aquaculture Nutrition

© John Wiley & Sons Ltd

Edited By: Dr Rune Waagbø

Impact Factor: 1.665

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2013: 18/50 (Fisheries)

Online ISSN: 13652095

Author Guidelines

Effective with the 2014 volume, this journal will be published in an onlineonly format.

Manuscript Submission

Manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/anu> (<http://mc.manuscriptcentral.com/anu>). Full instructions and support are available on the site and a user ID and password can be obtained on the first visit. Support can be contacted by phone (+1 434 817 2040 ext. 167), email (support@scholarone.com) (<mailto:support@scholarone.com>) or at <http://mcv3support.custhelp.com> (<http://mcv3support.custhelp.com>). If you cannot submit online, please contact Anette Hatland in the Editorial Office by telephone (+47 55905200) or by email (an@nifes.no) (<mailto:an@nifes.no>).

A covering letter must be included, signed by the corresponding author (i.e., the author to whom correspondence should be addressed), and stating on behalf of all the authors that the work has not been published and is not being considered for publication elsewhere. Authors are encouraged to suggest four potential referees for their manuscripts.

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve its grammar, spelling, punctuation, and clarity. Please visit the following website <http://wileyeditingservices.com/en/> (<http://wileyeditingservices.com/en/>) to learn about the options. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp
(http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services

http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

(http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit

<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/CopyrightLicense.html>.

(<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/CopyrightLicense.html>)

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CCBY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant selfarchiving policy please visit:

<http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

(<http://www.wiley.com/go/funderstatement>.)

Authors are responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources.

New: Online-only format

Effective with the 2014 volume, this journal will be published in an onlineonly format.

No printed edition will be published. Your article will therefore appear onlineonly.

All normal author benefits and services remain in place e.g. authors will continue to be able to order print reprints of articles if required. Furthermore, there will be no cost to authors for the publication of colour images in the onlineonly edition.

Page Charges

Original research articles exceeding 8 pages when in proof will be subject to a page charge of GBP 100 per additional page. The first 8 pages will be published free of charge. An average 8page article will have approximately 6200 words in manuscript,

with approximately 5 figures or tables and 50 references. An invoice will be sent to authors for these charges upon print publication of their article. Invited and review articles are excluded from this rule. Download Page Charge Form (ANU_Charge_Form.xls).

Preparation of the Manuscript

All sections of the manuscript should be doublespaced and with 30mm margins. Articles are accepted for publication only at the discretion of the Editor(s). Authors will receive prompt acknowledgement of receipt of their paper and a decision will be reached within 3 months of receipt. A manuscript should consist of the following sections:

Title page

This should include: the full title of the paper; the full names of all the authors; the name(s) and address(es) of the institution(s) at which the work was carried out (the present addresses of the authors, if different from the above, should appear in a footnote); the name, address, and telephone and fax numbers of the author to whom all correspondence and proofs should be sent; a suggested running title of not more than fifty characters, including spaces; and six key words to aid indexing.

Main text

Generally, all papers should be divided into the following sections and appear in the order: (1) Abstract or Summary, not exceeding 150200 words, (2) Introduction, (3) Materials and Methods, (4) Results, (5) Discussion, (6) Acknowledgements, (7) References, (8) Figure legends, (9) Tables, (10) Figures.

The Results and Discussion sections may be combined and may contain subheadings. The Materials and Methods section should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. Trade names should be capitalized and the manufacturer's name and address given.

All pages must be numbered consecutively from the title page, and include the acknowledgements, references and figure legends, which should be submitted on separate sheets following the main text. The preferred position of tables and figures in the text should be indicated in the lefthand margin.

Units and spellings

Système International (SI) units should be used. The salinity of sea water should be given as g L⁻¹. Use the form g mL⁻¹ not g/mL. Avoid the use of g per 100g, for example in food composition, use g kg⁻¹. If other units are used, these should be defined on first appearance in terms of SI units, e.g. mmHg. Spelling should conform to that used in the Concise Oxford Dictionary published by Oxford University Press. Abbreviations of chemical and other names should be defined when first mentioned in the text unless they are commonly used and internationally known and accepted.

Scientific names and statistics

Complete scientific names should be given when organisms are first mentioned in the text and in tables, figures and key words. The generic name may subsequently be

abbreviated to the initial, e.g. *Gadus morhua* L., otherwise *G. morhua*. Carry out and describe all appropriate statistical analyses.

References (Harvard style)

References should be cited in the text by author and date, e.g. Lie & Hemre (1990). Joint authors should be referred to by et al. if there are more than two, e.g. Hemre et al. (1990).

More than one paper from the same author(s) in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. Listings of references in the text should be chronological. At the end of the paper, references should be listed alphabetically according to the first named author. The full titles of papers, chapters and books should be given, with the first and last page numbers; journal titles should be abbreviated according to World List of Scientific Periodicals.

Lie, O., Lied, E. & Lambertsen, G. (1988) Feed optimization in Atlantic cod (*Gadus morhua*): fat versus protein content in the feed. *Aquaculture*, 69, 333341.
Lall, S.P. (1989) The minerals. In: *Fish Nutrition* (Halver, J.E. ed.), 2nd edn, Vol. 1, pp. 219257. Academic Press Inc., San Diego, CA, USA.

Work that has not been accepted for publication and personal communications should not appear in the reference list, but may be referred to in the text (e.g. A. Author, unpubl. observ.; A.N. Other, pers. comm.). It is the authors' responsibility to obtain permission from colleagues to include their work as a personal communication. A letter of permission should accompany the manuscript.

References in Articles

We recommend the use of a tool such as EndNote (<http://www.endnote.com/> (<http://www.endnote.com/>)) or Reference Manager (<http://www.refman.com/> (<http://www.refman.com/>)) for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>
(<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>)

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>
(<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>)

Illustrations and tables

These should be referred to in the text as figures using Arabic numbers, e.g. Fig. 1, Fig. 2, etc., in order of appearance. Three copies of each figure should be submitted and each figure should be marked on the back with its appropriate number, together with the name(s) of the author(s) and the title of the paper. Where there is doubt as to the orientation of an illustration the top should be marked with an arrow.

Photographs and photomicrographs should be unmounted glossy prints and should not be retouched. Labelling should be clearly indicated on an overlay or photocopy. Colour illustrations are acceptable when found necessary by the Editor; however, the author may be asked to contribute towards the cost of printing.

Line drawings should be on separate sheets of white paper in black indelible ink (dot matrix illustrations are not permitted); lettering should be on an overlay or photocopy and should be no less than 4 mm high for a 50% reduction. Please note, each figure should have a separate legend; these should be grouped on a separate page at the end of the manuscript. All symbols and abbreviations should be clearly explained.

Tables should be self-explanatory and include only essential data. Each table must be typewritten on a separate sheet and should be numbered consecutively with Arabic numerals, e.g. Table 1, and given a short caption. No vertical rules should be used. Units should appear in parentheses in the column headings and not in the body of the table. All abbreviations should be defined in a footnote.

All tables and figures that are reproduced from a previously published source must be accompanied by a letter of permission from the Publisher or copyright owner.

Colour figures

It is the policy of *Aquaculture Nutrition* for authors to pay the full cost for the reproduction in print of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, WileyBlackwell requires you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF* here (SN_Sub2000_X_CoW.pdf). If you are unable to access the internet, or are unable to download the form, please contact the Production Editor at anu@wiley.com (<mailto:anu@wiley.com>)

Once completed, please post or courier all pages of your completed form to OPI at the address below. Please note that electronic or faxed copies cannot be accepted. Any article received by WileyBlackwell with colour work will not be published until the form has been returned.

Customer Services (OPI) John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre, New Era Estate, Oldlands Way Bognor Regis West Sussex PO22 9NQ UK.

* To read PDF files, you must have Acrobat Reader installed on your computer. If you do not have this program, this is available as a free download from the following web address: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html> (<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>)

Acknowledgements

These should be brief and must include references to sources of financial and logistical support.

Page Proofs and Reprints

Proofs will be sent via email as an Acrobat PDF (portable document format) file. The Email server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site:

<http://www.adobe.com/prodindex/acrobat/main.html>

(<http://www.adobe.com/prodindex/acrobat/main.html>) This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Proofs will be posted if no email address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your email to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Editor within 3 days of receipt, ideally by fax. Only typographical errors can be corrected at this stage. Major alterations to the text cannot be accepted.

Author Services

NEW: Online production tracking is now available for your article through WileyBlackwell's

Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated emails at key stages of production. The author will receive an email with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete email address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/>) for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Offprints

Offprints of articles may be ordered at the proof stage. The corresponding author will be provided with five free copies of the published issue. Where there are more than two authors, the corresponding author will receive two free copies for distribution to each author.

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields.

<http://offprint.cosprinters.com/blackwell> (<http://offprint.cosprinters.com/blackwell>)

If you have queries about offprints please email offprint@cosprinters.com (<mailto:offprint@cosprinters.com>)

Early View

Aquaculture Nutrition is covered by WileyBlackwell's Early View service. Early View articles are complete fulltext articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View

articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to nonsubscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to nonsubscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms (http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms).

Any author wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available here.

(https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp)

Prior to acceptance there is no requirement to inform the Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peerreview process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Last updated: July 2013