

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Maria Carolina Santos de Oliveira Moritz

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Phaffia brasiliensis*,
DESENVOLVIMENTO DE RAÇÃO E EFEITOS *in vivo* SOBRE DESEMPENHO E
SAÚDE DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) EM SISTEMAS DE
BIOFLOCOS E ÁGUA CLARA**

Belo Horizonte

2025

Maria Carolina Santos de Oliveira Moritz

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Phaffia brasiliensis*,
DESENVOLVIMENTO DE RAÇÃO E EFEITOS *in vivo* SOBRE DESEMPENHO E
SAÚDE DE TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) EM SISTEMAS DE
BIOFLOCOS E ÁGUA CLARA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Coorientadores: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa e Dra. Érika Ramos de Alvarenga

Belo Horizonte

2025

043

Moritz, Maria Carolina Santos de Oliveira.

Avaliação in vitro do potencial probiótico de *Phaffia brasiliensis*, desenvolvimento de ração e efeitos in vivo sobre desempenho e saúde de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistemas de bioflocos e água clara [manuscrito] / Maria Carolina Santos de Oliveira Moritz. – 2025.
118 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins. Coorientadores: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa e Dra. Érika Ramos de Alvarenga.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Aquicultura. 3. Leveduras. 4. Peixes. 5. Nutrição. 6. Probióticos. I. Martins, Flaviano dos Santos. II. Rosa, Carlos Augusto. III. Alvarenga, Érika Ramos de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **MARIA CAROLINA SANTOS DE OLIVEIRA MORITZ**

Nº REGISTRO: 2024656956

Às 08:30 horas do dia **24 de novembro de 2025**, reuniu-se remotamente, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Whasley Ferreira Duarte (Universidade Federal de Lavras), Eduardo Maldonado Turra (Departamento de Zootecnia/UFMG), o Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins – Orientador, Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa (coorientador) e Dra. Érika Ramos de Alvarenga (Coorientadora), para julgar o trabalho final “**Avaliação *in vitro* do potencial probiótico de *Phaffia brasiliensis*, desenvolvimento de ração e efeitos *in vivo* sobre desempenho e saúde de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistemas de bioflocos e água clara**”, da aluna **Maria Carolina Santos de Oliveira Moritz**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins - orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 24 de novembro de 2025

Prof. Dr. Whasley Ferreira Duarte

Prof. Dr. Eduardo Maldonado Turra

De acordo:

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

(Orientador)

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

(Coorientador)

Dra. Érika Ramos de Alvarenga

(Coorientadora)

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes
(Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Caio Tavares Fagundes, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 24/11/2025, às 14:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 24/11/2025, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Augusto Rosa, Coordenador(a)**, em 24/11/2025, às 14:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Maldonado Turra, Professor do Magistério Superior**, em 24/11/2025, às 14:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erika Ramos de Alvarenga, Bióloga**, em 24/11/2025, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Whasley Ferreira Duarte, Usuário Externo**, em 27/11/2025, às 09:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 4758990 e o código CRC A6A53FFC.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e institucional para execução desse trabalho.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela possibilidade de atuar como pesquisadora e por oferecer o ambiente acadêmico e os recursos necessários para a realização do meu mestrado.

Agradeço ao professor Flaviano, meu orientador, por ter me recebido no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, dando-me a oportunidade de aprimorar meus conhecimentos com probióticos e desenvolver meu trabalho nessa área.

Agradeço ao professor Carlos, meu coorientador, que abriu as portas do laboratório e me recebeu com muita gentileza e disponibilidade. Foi uma presença essencial nessa trajetória. Também foi onde eu conheci e compartilhei experiências com a Karen, a Ana Clara e a Júlia – a convivência com elas foi gratificante. Agradeço também ao professor Carlos por ter cedido as linhagens de *Phaffia brasiliensis* utilizadas para desenvolvimento desse estudo e pela disponibilização da caracterização e quantificação de antioxidantes.

Agradeço à Érika, minha também coorientadora, por sua mentoria sensível, competente e sempre presente. Mais do que uma orientadora, foi uma inspiração e uma referência humana e intelectual que levarei para a minha vida. Hoje, além da parceria profissional, tornou-se uma amiga.

Agradeço ao professor Turra pelo incentivo constante e confiança em meu potencial. Suas sugestões e orientações foram profundamente significativas. Sou especialmente grata pela atenção e cuidado, tendo ele, inclusive, zelado pelos peixes do meu experimento até mesmo em uma situação crítica durante a madrugada.

Agradeço ao professor Whasley, que tão prontamente aceitou não só compor a banca do projeto e de defesa desse trabalho, mas também ao realizar contribuição relevante com as análises de conteúdo fenólico e antioxidante das linhagens de levedura. Suas considerações detalhadas contribuíram para o aprimoramento do estudo.

Agradeço ao professor Edgar por sua escuta atenta, orientação criteriosa e dedicação.

Agradeço à Letícia e à Lívia, que desde o início foram minhas amigas e parceiras de mestrado. Compartilhar essa jornada com elas tornou o caminho mais leve. A parceria, os aprendizados e o companheirismo foram fundamentais.

Agradeço ao Vini e ao Gean, amigos e parceiros de trabalho cuja presença foi extremamente enriquecedora, tendo cada conversa trazido muitos ensinamentos.

Agradeço à equipe do LAQUA, em especial à Bela, Mari, Dara, Laryssa, Ito, Lee, Natan, Willi, Sophia, Kyvia, Agnes, Matheus, Amanda e Bianca. Foi um privilégio compartilhar esse período com pessoas tão especiais, com quem desejo que os laços criados se prolonguem para além dessa etapa. A parceria com toda a equipe tornou possível a execução desse estudo.

Agradeço ao Luís pelas contribuições valiosas, especialmente pelas conversas que suscitaram ideias relevantes para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ao Arley, Lucas e Gabriel pela companhia e risadas que tornaram os dias (e noites) mais leves.

Agradeço à Geise pela prestatividade e parceria, sempre dispondo soluções em momentos importantes, sua ajuda foi essencial.

Agradeço ao Wladimir, que esteve presente em todos os “plantões” laboratoriais. Sua companhia, principalmente nos nossos horários estendidos, e apoio foram muito importantes. Guardo as memórias com carinho.

Agradeço à Leimar por todo o suporte e ensinamentos valiosos, compartilhando sua ampla experiência na área.

Agradeço ao Jamil, que sempre se prontificou a me auxiliar com dedicação.

Agradeço a todos os funcionários do ICB e do LAQUA, principalmente o sr. Roberto e o Lucas, que foram minha companhia por diversos feriados e finais de semana. Agradeço profundamente a companhia e o apoio.

Agradeço à professora Maristela, que, ainda na minha formação pré-universitária, transformou minha forma de organizar e comunicar ideias, constituindo a base do meu trabalho como pesquisadora e fortalecendo minha jornada profissional.

Agradeço ao Victor pela amizade e parceria ao longo dos anos, dentro e fora dos laboratórios. Compartilhar experiências, desafios e realizações tornou o caminho mais leve e significativo.

E um agradecimento especial à minha família, que foi o alicerce ao longo de toda essa trajetória. O apoio incondicional que sempre me deram, compreenderam minhas ausências e celebraram comigo cada pequena conquista. Eles me ensinaram o valor do esforço, da honestidade e da perseverança, e foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

Frente à intensificação da produção de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e ao consequente cenário crescente de resistência a antimicrobianos, aumenta a demanda por alternativas funcionais que promovam benefícios nutricionais, fisiológicos e produtivos em peixes. Nessa perspectiva, leveduras do gênero *Phaffia* destacam-se por suas propriedades antioxidantes, capacidade de modular a microbiota intestinal e intensificação da coloração muscular por meio de pigmentos naturais, como a astaxantina. Diante disso, o presente estudo avaliou a segurança e a atividade antioxidante *in vitro* de linhagens de *Phaffia brasiliiana* e analisou diferentes metodologias de incorporação desta em ração para análise do seu potencial probiótico no desempenho e saúde de *O. niloticus* em sistemas de bioflocos (BFT) e água clara (AC). As três linhagens de *P. brasiliiana* mostraram-se seguras *in vitro*, não detectando fatores de virulência e apresentando indicativo de sensibilidade aos antifúngicos de primeira escolha. Apresentaram também expressiva atividade antioxidante, com potência relativa preponderante da astaxantina (507,2), apesar da sua concentração (6,56%) em comparação a outros antioxidantes, como fitoeno (53,95%; potência 208,645). Entre as estratégias de preparo da ração, o método de *spray coating* destacou-se, mantendo a concentração microbiana durante armazenamento e administração na água, enquanto o microencapsulamento, liofilização e *spray drying* apresentaram diversas limitações em pequena escala, principalmente relacionadas ao rendimento insuficiente. No ensaio *in vivo*, os peixes iniciaram o experimento com peso médio de 1,53 g e, após 63 dias, atingiram maiores pesos finais nos tratamentos em AC ($p < 0,05$) – com levedura (AC-L; 78,99 g) e sem levedura (AC-C; 74,90 g) –, enquanto os tratamentos em BFT com e sem levedura apresentaram menores valores (BFT-L; 59,41 g; e BFT-C; 64,47 g). A conversão alimentar variou entre 0,79 e 0,82 (AC-L e AC-C) para 0,96 e 0,86 (BFT-L e BFT-C). Ademais, foi indicado efeito positivo nos biomarcadores hematológicos de estresse nos grupos AC-L e BFT-L ($p < 0,05$), possivelmente relacionados à astaxantina produzida pela levedura. Foram detectadas colônias características de *P. brasiliiana* em ambas as coletas realizadas, indicando sobrevivência ao processamento, armazenamento e consumo. A análise da coloração do filé evidenciou intensificação da tonalidade avermelhada (a^*) nos grupos AC-L e BFT-L quando comparados aos respectivos controles, confirmando a presença da levedura administrada e absorção dos pigmentos antioxidantes. Não foram observadas diferenças significativas entre BFT e AC quanto ao aproveitamento dos efeitos da levedura. Em síntese, *P. brasiliiana* UFMG-CM-Y6497 demonstrou segurança e potencial biotecnológico, com benefícios observáveis na saúde e pigmentação das tilápias. Destaca-se a necessidade de

estudos futuros voltados à definição de doses ideais, efeitos dependentes da quantidade administrada e aplicação em sistemas de larga escala.

Palavras-chave: aquacultura; astaxantina; leveduras; métodos de incorporação em ração; nutrição de peixes; probióticos.

ABSTRACT

Given the intensification of the production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), and the consequent growing scenario of antimicrobial resistance, the demand for functional alternatives that promote nutritional, physiological, and productive benefits in fish is increasing. In this context, yeasts of the genus *Phaffia* stand out for their antioxidant properties, ability to modulate the intestinal microbiota, and potential to intensify the natural muscle coloration of these animals with natural pigments, such as astaxanthin. Therefore, this study evaluated the *in vitro* safety and antioxidant of *Phaffia brasiliiana* strains and analyzed different methodologies for incorporating this microorganism into feed to assess its probiotic potential and health of *O. niloticus* in biofloc (BFT) and clear water (AC) systems. The three of *P. brasiliiana* strains were found to be safe *in vitro*, showing no virulence factors and indicating sensitivity to first-line antifungals. They also exhibited strong antioxidant activity, with astaxanthin showing a predominant relative potency (507.2), despite its concentration (6.56%) compared to other antioxidants, such as phytoene (53.95%; potency 208.645). Among the feed preparation strategies, the spray coating method stood out, maintaining microbial concentration during storage and administration in water, while microencapsulation, lyophilization, and spray drying presented several limitations on a small scale, mainly related to insufficient yield. In the *in vivo* experiment, the fish started the experiment with an average weight of 1.53 g and, after 63 days, reached higher final weights in the AC treatments ($p < 0.05$) – with yeast (AC-L; 78.99 g) and without yeast (AC-C; 74.90 g) –, while the BFT treatments with and without yeast showed lower values (BFT-L; 59.41 g; and BFT-C; 64.47 g). Feed conversion ranged from 0.79 to 0.82 (AC-L and AC-C) to 0.96 to 0.86 (BFT-L and BFT-C). Furthermore, a positive effect on hematological stress biomarkers was indicated in the AC-L and BFT-L groups ($p < 0.05$), possibly related to astaxanthin produced by the yeast. Characteristic colonies of *P. brasiliiana* were detected in both sampling collections, indicating survival through processing, storage, and consumption. Analysis of fillet color showed an intensification of the reddish hue (a^*) in the AC-L and BFT-L groups when compared to their respective controls, confirming the presence of the administered yeast and absorption of antioxidant pigments. No significant differences were observed between BFT and AC regarding the utilization of the yeast's effects. In summary, *P. brasiliiana* UFMG-CM-Y6497 demonstrated safety and biotechnological potential, with observable benefits in the health and pigmentation of tilapia. Future studies should focus on defining optimal doses, effects dependent on the amount administered, and application in large-scale systems.

Keywords: aquaculture; astaxanthin; feed incorporation methods; fish nutrition; probiotics; yeasts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema dos procedimentos experimentais utilizados para avaliar diversas técnicas de incorporação de microrganismos em ração para peixes.	33
Figura 2 - Estufa agrícola do LAQUA/UFMG utilizada para realização do experimento.	37
Figura 3 - Tanques nos quais foi avaliada a variação de temperatura para posterior definição dos tratamentos.....	38
Figura 4 - Esquemas da estufa com a distribuição dos tratamentos (T1 Lev [levedura] AC, T2 Cont [controle] AC, T3 Lev B [BFT], T4 Cont B) e suas repetições (R1 – R4) do experimento para cada tanque (TQ).	39
Figura 5 - Placa com ágar GYMP modificado com <i>P. brasiliiana</i> isolada (esta placa não advém da análise de amostra do conteúdo intestinal do experimento <i>in vivo</i>).	47
Figura 6 - Micrografia óptica de corte histológico intestinal (aumento x20) mostrando as medidas de altura (em preto) e largura (em vermelho) das vilosidades intestinais e largura do epitélio intestinal (em verde).	48
Figura 7 - Gráfico relativo a cromatograma de <i>P. brasiliiana</i> (UFMG-CM-Y6497), obtido por HPLC-DAD através do método para carotenoides livres, processado a 450 nm. Picos numerados de acordo com a Tabela 4.	59
Figura 8 - Gráfico ilustrando a potência ponderada dos antioxidantes identificados, sendo (a) (all-E)-astaxantina, (b) Fitoeno, (c) (all-E)- β -caroteno, (d) (Z)-astaxantina, (e) (Z)- β -zeacaroteno e (f) (all-E)- β -zeacaroteno.	59
Figura 9 - (a) Concentração em UFC/mL das três linhagens de levedura antes e após o microencapsulamento; (b) Concentração em UFC/mL da linhagem UFMG-CM-Y6497 antes e após <i>spray drying</i>	61
Figura 10 - (a) Concentração em UFC/g das três linhagens de levedura após a liofilização utilizando diferentes crioprotetores e volumes; (b) Concentração em UFC/g da linhagem UFMG-CM-Y6497 após liofilização com a combinação de <i>Skim milk</i> e sacarose como crioprotetores.	62
Figura 11 - Concentração da linhagem de UFMG-CM-Y6497, expressa em Log10(UFC/g), imediatamente após aplicação por <i>spray coating</i> e após sete dias de armazenamento, em rações formuladas com ou sem adição de óleo vegetal.	64
Figura 12 - Concentração da linhagem de UFMG-CM-Y6497, expressa em Log10(UFC/g), ao ser administrada na água, em rações formuladas com ou sem adição de óleo vegetal.	65
Figura 13 – Micrografias ópticas de cortes histológicos intestinais (aumento x20) - demonstração da integridade da mucosa.	87
Figura 14 - Micrografias ópticas de cortes histológicos hepáticos (aumento x40) - (a; b) inclusões de glicogênio (seta preta) e lipídicas (seta vermelha).	88
Figura 15 - Micrografia óptica de corte histológico hepático (aumento x40) - foco de necrose (seta preta).	88
Figura 16 - Micrografia óptica de corte histológico hepático (aumento x40) – (a) ductos biliares (seta preta) e (b) hepatopâncreas (seta preta).	89

Figura 17 - Imagens analisadas para análise da coloração dos filés; peixes pertencentes aos grupos de tratamento (a) AC-L, (b) AC-C, (c) BFT-L e (d) BFT-C..... 90

Figura 18 - Gráficos das análises de cor do filé realizadas na coleta final (dia 63) do experimento *in vivo*, a partir das coordenadas L^* , a^* e b^* 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da avaliação das propriedades funcionais in vitro e da caracterização de fatores de virulência de <i>Phaffia brasiliana</i>	51
Tabela 2 - Valores de Concentração Inibitória Mínima para isolados de <i>Phaffia brasiliana</i> considerando os limites estabelecidos para <i>C. albicans</i> SC5314, leitura após incubação a 25° C por 48 h.	53
Tabela 3 - Resultados da análise de conteúdo fenólico e antioxidante de <i>Phaffia brasiliana</i> . .	55
Tabela 4 - Resultados da identificação e quantificação de antioxidantes produzidos por <i>Phaffia brasiliana</i> UFMG-CM-Y6497.	58
Tabela 5 - Médias e coeficiente de variação (CV) ou medianas (Q1-Q3) das análises de qualidade de água por tratamento avaliadas ao longo do experimento in vivo.....	71
Tabela 6 - Médias e coeficiente de variação (CV) ou medianas (Q1-Q3) das análises de desempenho zootécnico por tratamento avaliadas ao longo do experimento in vivo.	75
Tabela 7 - Médias e coeficiente de variação (CV) ou medianas (Q1-Q3) das análises hematológicas por tratamento realizadas na coleta final (dia 63) do experimento in vivo.....	79
Tabela 8 - Médias por tratamento das análises de índices biológicos realizadas nas coletas parcial (dia 28) e final (dia 63) do experimento in vivo.....	82
Tabela 9 - Médias e coeficiente de variação (CV) ou medianas (Q1-Q3) das análises de Log ₁₀ (UFC/g) de conteúdo intestinal de tilápias-do-Nilo por tratamento realizadas nas coletas parcial (dia 28) e final (dia 63) do experimento in vivo, a partir dos meios de cultura ágar sangue e ágar MacConkey.....	84
Tabela 10 - Médias ou medianas (Q1-Q3) das análises histológicas das vilosidades intestinais e do epitélio intestinal dos peixes por tratamento realizadas nas coletas parcial (dia 28) e final (dia 63) do experimento in vivo.	87
Tabela 11 - Médias ou medianas das análises de cor do filé por tratamento realizadas na coleta final (dia 63) do experimento in vivo, a partir das coordenadas L*, a* e b*.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC - Água clara

AGCC - Ácidos graxos de cadeia curta

AmB - Anfotericina B

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BFT - Tecnologia de bioflocos (*Biofloc Technology*)

BST - Levedura residual de cervejaria (*Brewer's Spent Yeast*)

CA - Conversão alimentar

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CASP - Caspofungina

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CV - Coeficiente de variação

DP - Desvio padrão

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EROS - Espécies reativas de oxigênio

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FCZ – Fluconazol

GRAS - Geralmente Reconhecidos como Seguros (*Generally Recognized as Safe*)

GYMP – Glicose, extrato de levedura, extrato de malte, peptona (*Glucose, Yeast Extract, Malt Extract, Peptone*)

HE - Coloração de Hematoxilina e Eosina

HPLC-DAD-MS - Cromatografia líquida de alta performance com detecção por diodo *array* e espectrometria de massas

IHS - Índice hepatossomático

ITZ - Itraconazol

IVS - Índice viscerossomático

LAQUA - Laboratório de Aquacultura

MOS - Mananoligossacarídeos

MT - 17 α -metiltestosterona

NGT-Aqua - Nutrição, Genética e Tecnologia para Aquicultura

OMS - Organização Mundial da Saúde

OD - Oxigênio dissolvido

RAS - Sistema de recirculação aquícola (*Recirculating Aquaculture System*)

RPPN - Reserva Particular do Patrimônio Natural

SS - Sólidos sedimentáveis

SST - Sólidos suspensos totais

TCE - taxa de crescimento específico

Temp - Temperatura

TGI - Trato gastrointestinal

TQ - Tanque

UFLA - Universidade Federal de Lavras

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

VCM - Volume corpuscular médio

YNB - Ágar *Yeast Nitrogen Base*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	JUSTIFICATIVA.....	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo geral.....	26
3.2	Objetivos específicos	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	<i>Phaffia brasiliensis</i>	27
4.2	Avaliação das propriedades funcionais <i>in vitro</i>	27
4.2.1	Tolerância aos sais biliares.....	27
4.2.2	Determinação da susceptibilidade aos antifúngicos por microdiluição em caldo (EUCAST).....	28
4.2.3	Avaliação do antagonismo frente a patógenos.....	29
4.2.4	Análise de conteúdo fenólico e antioxidante de leveduras	29
4.2.5	Caracterização e quantificação de antioxidantes.....	30
4.3	Caracterização de fatores de virulência.....	31
4.3.1	Gelatinase	31
4.3.2	Hemólise	31
4.3.3	Mucina.....	32
4.3.4	Coagulase	32
4.3.5	DNAse.....	32
4.4	Avaliação das propriedades biotecnológicas e produção da ração suplementada	33
4.4.1	Microencapsulamento	33
4.4.2	<i>Spray drying</i>	34
4.4.3	Liofilização	35
4.4.4	Inclusão da levedura na ração - <i>Spray coating</i>	35
4.4.5	Avaliação da ração suplementada	36
4.5	Experimento <i>in vivo</i>	37
4.5.1	Local e instalações	37
4.5.2	Qualidade de água	39
4.5.3	Desenho experimental e período pré-experimental.....	40
4.5.4	Desempenho zootécnico.....	43
4.5.5	Coleta de sangue e análises hematológicas	44
4.5.6	Índices biológicos.....	45
4.5.7	Parâmetros microbiológicos.....	46
4.5.8	Parâmetros histológicos	47
4.5.9	Filetagem - Análise da cor do filé	48
4.6	Análise estatística.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50

5.1	Avaliação das propriedades funcionais <i>in vitro</i> e caracterização de fatores de virulência	50
5.2	Avaliação das propriedades biotecnológicas e produção da ração suplementada	60
5.3	Experimento <i>in vivo</i>	69
6	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS	94
	APÊNDICE A - PROTOCOLO HISTOLOGIA.....	115
	ANEXO A - PROTOCOLO CEUA #65/2025.....	117

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é o setor de produção de alimentos de origem animal que mais cresce no mundo atualmente, contribuindo de forma significativa para a segurança alimentar e o desenvolvimento econômico (Jiang *et al.*, 2022; Verdegem *et al.*, 2023). Segundo o relatório “*The State of World Fisheries and Aquaculture*” (SOFIA) publicado em 2024 (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação - FAO, 2024), a produção global de pescado e aquicultura alcançou mais de 223,2 milhões de toneladas em 2022. Essa intensificação tem ocasionado diversos desafios, especialmente em relação ao manejo de doenças e à sustentabilidade ambiental, exigindo estratégias de controle microbiano, como o uso de agentes químicos e antibióticos (Aly e Fathi, 2024; Ruben *et al.*, 2025).

No entanto, embora inicialmente eficaz, a antibioticoterapia tem se mostrado incapaz de prevenir recorrência e resistência (Torres-Maravilla *et al.*, 2024), sendo questionada e até mesmo restrita devido aos seus efeitos bioacumulativos, à ruptura de ecossistemas e à crise da resistência microbiana (Pelić *et al.*, 2024). Em um estudo dirigido por Tang *et al.* (2022) na China, foram identificados resíduos de antibióticos em 24,3% das amostras de peixes cultivados, com concentrações extremamente elevadas de doxiciclina e eritromicina (acima de 100 µg/kg), especialmente em espécies como *Micropterus salmoides* (41,2%), *Channa argus* (34,4%) e *Parabramis pekinensis* (31,2%).

Nesse contexto, o uso de microrganismos probióticos tem surgido como uma alternativa promissora, ao não apenas prevenir o desenvolvimento de doenças, mas também ao promover a produção de animais mais saudáveis e seguros para consumo (Anee *et al.*, 2021; Amillano-Cisneros *et al.*, 2025), garantindo a sustentabilidade e a competitividade do setor.

O termo “probiótico” foi introduzido pelo cientista Werner Kollath após estudos conduzidos por Louis Pasteur e Élie Metchnikoff (Swade, Molavi e Dolat-Abadi, 2022), designando assim “substâncias ativas essenciais para o desenvolvimento saudável da vida” (Gasbarrini, Bonvicini e Gramenzi, 2016). Recentemente, foi realizada uma atualização do conceito pela FAO e pela Organização Mundial da Saúde (OMS), tendo sido definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO, 2016).

Esse termo é frequentemente associado de forma imediata ao intestino, o qual, em humanos, é colonizado por um ecossistema complexo de aproximadamente 100 trilhões de microrganismos, distribuídos entre 1000 a 5000 espécies, caracterizando-se como o local com maior densidade e diversidade microbiana do organismo (Generoso *et al.*, 2021; Liaqat, Parveen e Kim, 2022; Rathour *et al.*, 2023). Considerando esse extenso ecossistema e sua

capacidade de interferir no funcionamento dos demais órgãos, a microbiota intestinal apresenta papel central e uma relação direta com o estado de saúde do hospedeiro, bem como o desenvolvimento ou agravamento de doenças (Maciel-Fiuza *et al.*, 2023).

No entanto, é amplamente reconhecido que diversos outros locais – como a cavidade oral, os pulmões, o trato urinário e a pele – possuem microbiotas distintas, cujas funções são essenciais tanto para a saúde local quanto para o equilíbrio sistêmico (Stavrou e Kotzampassi, 2025). A microbiota intestinal, por sua vez, reforça essa visão integrada ao influenciar órgãos distantes por meio de eixos fisiológicos e metabólitos sinalizadores. Essa comunicação é mediada por compostos bioativos derivados da microbiota, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), derivados do triptofano e ácidos biliares, que atuam como sinais moleculares para órgãos como o cérebro, pulmões e sistema imunológico (Schroeder e Bäckhed, 2016).

Estudos sugerem que probióticos podem conferir benefícios ao hospedeiro a partir de diversos mecanismos, como pela inibição da expressão de toxinas e exclusão competitiva de patógenos por limitação de substratos, locais de adesão e síntese de substâncias antimicrobianas (Latif *et al.*, 2023; Prajapati *et al.*, 2024). Ademais, a interação microbiota-intestino, em específico, pode conduzir uma ação antagônica frente a patógenos também ao promover o fortalecimento da barreira intestinal, fazer regulação negativa de mecanismos inflamatórios e estimular mecanismos imunes (Organização Mundial de Gastroenterologia, 2017).

Além disso, esses microrganismos desempenham funções metabólicas importantes, como a fermentação de resíduos alimentares não digeríveis, a produção de vitamina K e a absorção de íons, além de atuar na proliferação e diferenciação das células epiteliais e no desenvolvimento e homeostase do sistema imunológico (O’Sullivan *et al.*, 1992; Cammarota *et al.*, 2009). A microbiota intestinal também tem papel importante no metabolismo do triptofano – um aminoácido essencial envolvido na síntese de serotonina e outros metabólitos bioativos – do hospedeiro, a partir de mecanismos diretos, por meio de AGCC, derivados do indol e peróxido de hidrogênio, e indiretos, que envolvem modulações imunológicas que influenciam a via metabólica do triptofano (Lukić *et al.*, 2022).

A crescente compreensão de que doenças de diferentes tipos e sistemas do organismo – desde dermatite atópica até distúrbios neurodegenerativos – estão relacionadas à disrupção da homeostase microbiana levou à hipótese de que, ao modular a microbiota por meio de microrganismos específicos, seria possível promover melhora clínica ou até mesmo a remissão de determinadas enfermidades (Stavrou e Kotzampassi, 2025). Em função disso, probióticos têm sido amplamente estudados e já vêm sendo aplicados na prática clínica, tanto para a

prevenção quanto para o tratamento de diversas condições, incluindo aquelas de origem intestinal e extraintestinal (Sharma *et al.*, 2023).

Nesse sentido, são estabelecidos diversos critérios e etapas, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), no Brasil, para a caracterização de um microrganismo como probiótico. Um dos principais requisitos é a apresentação de efeitos benéficos linhagem específicos, além da caracterização taxonômica e comprovação de sua segurança, identidade e efeitos benéficos (Anvisa, 2021), esclarecendo, assim, não só sua administração segura e eficaz para o hospedeiro, mas também como este se diferencia de demais microrganismos com potencial patogênico.

Apesar de os probióticos mais conhecidos e amplamente utilizados serem de espécies do gênero *Lactobacillus*, o potencial de fungos com propriedades probióticas tem sido cada vez mais explorado (Selvaraj e Gurumurthy, 2023). Nesse contexto, pode-se destacar espécies do gênero *Saccharomyces*, especialmente *S. cerevisiae* e *S. boulardii* (uma linhagem de *S. cerevisiae*), que já demonstraram efeitos benéficos relevantes, incluindo efeito inibitório frente a patógenos como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* (Martins *et al.*, 2011; Roussel *et al.*, 2018).

S. boulardii tem sido amplamente utilizada como probiótico em seres humanos, principalmente na prevenção e no tratamento de distúrbios gastrointestinais, como diarreias associadas ao uso de antibióticos, infecções por *Clostridioides difficile* e síndrome do intestino irritável (Kelesidis e Pothoulaki, 2012; Szajewska e Kotodziej, 2015). Um dos fatores que contribuem para sua versatilidade em diferentes hospedeiros é a capacidade de crescer em uma faixa de temperatura relativamente ampla – entre 25 °C e 37 °C – o que favorece sua sobrevivência e funcionalidade no trato gastrointestinal (TGI) dos hospedeiros (Hossain *et al.*, 2020).

Já na aquacultura, embora os benefícios da suplementação probiótica estejam bem documentados para diversas espécies cultivadas (Amoah *et al.*, 2023; Mashhadizadeh *et al.*, 2024; Amillano-Cisneros *et al.*, 2025), a escolha do microrganismo deve levar em conta não apenas seus efeitos desejados, mas também as características fisiológicas do hospedeiro e as condições ambientais do cultivo. Fatores como a temperatura da água podem influenciar diretamente a viabilidade, a atividade metabólica e a eficácia dos probióticos administrados (Lee *et al.*, 2024). Assim sendo, torna-se essencial selecionar linhagens capazes de se adaptar ao habitat convencional da espécie-alvo, de modo a garantir sua funcionalidade no TGI e maximizar os benefícios à saúde dos animais.

Nesta perspectiva, a espécie *Phaffia rhodozyma* já é bastante estudada para utilização como suplemento alimentar na aquacultura devido às suas propriedades antioxidantes, estando estas atreladas principalmente a sua produção de astaxantina (Lyons, Jacques e Dawson, 1993). Um dos fatores que favorece sua aplicação em organismos aquáticos é a faixa de temperatura ideal para o crescimento dessas leveduras – geralmente entre 17 °C e 28 °C –, o que coincide com as condições de cultivo de diversas espécies aquícolas, como tilápias e crustáceos tropicais (FAO, 2021; Miao *et al.*, 2021; Valduga *et al.*, 2009; Wyban, Walsh e Godin, 1995). Isso contribui para uma maior viabilidade metabólica da levedura e estabilidade da astaxantina durante o processo digestivo.

Além disso, *P. rhodozyma* se destaca por sua alta capacidade de produção intracelular de astaxantina, o que confere maior estabilidade oxidativa ao pigmento e potencializa seus efeitos antioxidantes no organismo hospedeiro (Dufossé, 2006). Apesar de a temperatura ótima de crescimento de *P. rhodozyma* situar-se entre 17 °C e 21°C, linhagens mutantes, como a MK19, demonstraram crescimento viável a 28°C, com níveis de astaxantina aproximadamente duas vezes superiores aos observados na faixa de 21-25°C – embora com redução da biomassa e indícios de estresse celular, como danos à membrana plasmática (Miao *et al.*, 2021).

Em contraste, a espécie *Phaffia brasiliiana*, descrita por Santos *et al.* (2021), distingue-se das demais espécies de *Phaffia* por sua maior termotolerância. Trata-se da única representante do gênero com registro de crescimento a 30°C (moderado) e 32°C (fraco). A levedura foi isolada de um ecótono entre Cerrado e Mata Atlântica, uma região de clima moderado, o que sugere que sua capacidade de crescimento em temperaturas elevadas pode não refletir uma adaptação efetiva a ambientes mais quentes, mas sim uma amplitude térmica peculiar.

A capacidade de *P. brasiliiana* de se desenvolver em temperaturas superiores a 28°C indica um potencial de aplicação relevante na aquacultura de espécies tropicais, como a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), cujos cultivos são frequentemente mantidos em condições térmicas variáveis que poderiam induzir estresse em outros microrganismos (Leonard e Skov, 2022). Adicionalmente, a espécie também demonstra crescimento em temperaturas mais amenas, uma versatilidade térmica que sugere que sua proliferação não seria comprometida pelas oscilações térmicas diárias ou sazonais do ambiente de produção de tilápias, o que representa uma vantagem significativa para sua estabilidade como suplemento probiótico.

Ademais, a produção de astaxantina – pigmento carotenóide lipossolúvel com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiapoptóticas – é uma característica marcante de algumas espécies do gênero *Phaffia*, tendo como principal uso comercial a suplementação

dietética na aquicultura, que visa intensificar a coloração rosada de salmonídeos e crustáceos (Johnson e Echavarri-Erasun, 2011; Xia *et al.*, 2020; Brendler e Williamson, 2019). Em estudo no qual foi realizada suplementação de células hidrolisadas de *P. rhodozyma* – já que, desta maneira, a astaxantina é prontamente absorvida no intestino – para *Penaeus monodon* (camarão-tigre-gigante) (Wang *et al.*, 2021), foi observado aumento de sobrevivência e diminuição da taxa de conversão alimentar (FCR). Nesse sentido, os efeitos benéficos da astaxantina vão além do apelo estético e econômico, aumentando a utilização de nutrientes e, assim, melhorando o desenvolvimento e a sobrevivência dos camarões.

Como supracitado, a indústria da aquicultura enfrenta diversos desafios, a exemplo do desenvolvimento de doenças que afetam a criação e da necessidade de práticas sustentáveis para minimizar os impactos ambientais. Sendo assim, a introdução de probióticos pode auxiliar ao viabilizar a redução da necessidade de tratamentos químicos (Torres-Maravilla *et al.*, 2024), já que o TGI de peixes é uma das principais vias de infecção por entrar em contato direto com patógenos e estímulos antigênicos presentes no ambiente aquático, sendo assim um importante alvo a ser modulado.

Especificamente para peixes como a tilápia, uma das espécies mais cultivadas no mundo devido à sua adaptabilidade e resistência a diferentes condições ambientais, rápido crescimento, bom rendimento de filé e valor econômico (Munguti *et al.*, 2022), a utilização de probióticos adaptáveis ao seu microambiente intestinal, como *P. brasiliensis*, representa uma alternativa promissora. Dessa maneira, pode-se promover não apenas uma produção mais eficiente e sustentável, mas também o desenvolvimento de peixes mais saudáveis e, consequentemente, com melhor desempenho produtivo (Mathan Muthu *et al.*, 2024).

Em tilápias juvenis, quando administrada suplementação dietética de *Bacillus licheniformis*, não só foi possível observar aumento no crescimento e na resistência a infecções, neste caso, por *Streptococcus iniae* – um dos patógenos que mais afetam a espécie (Bowser *et al.*, 1998) –, mas também a influência no desenvolvimento e na integridade do intestino anterior destes peixes (Han *et al.*, 2015). Além disso, considerando que as lisozimas desempenham um papel importante na imunidade inata de peixes, contribuindo com uma atividade antimicrobiana frente a bactérias, o probiótico administrado demonstrou potencial para contornar as adversidades relacionadas aos agentes patogênicos ao ter sido demonstrada atividade aumentada destas enzimas.

Outros estudos também demonstraram aumento na atividade da lisozima em tilápias a partir da administração de β -glucanos isoladamente (Koch, Oliveira e Zanuzzo, 2021), utilizados como prebióticos – substratos metabolizados pelos componentes da microbiota

(Davani-Davari *et al.*, 2019) –, e combinados com *Aspergillus oryzae* (Dawood *et al.*, 2020). Em estudo semelhante, mas desta vez com a suplementação de tilápias com *Bacillus* sp. NP5 e oligossacarídeos, foi observado aumento significativo no crescimento devido, novamente, a um melhor desempenho imunológico, suprimindo a atividade de *Streptococcus agalactiae*, e uma melhor utilização de nutrientes (Widanarni e Tanbiyaskur, 2015).

Outra variável importante de se considerar é o sistema de produção utilizado. Na prática aquícola, os viveiros escavados e tanques-rede se destacam por permitir a criação em larga escala e menor custo operacional, embora ofereçam menos controle sobre variáveis ambientais que podem afetar negativamente os animais (Small, Hardy e Tucker, 2016; Brande *et al.* 2023). Embora esses sistemas sejam comercialmente os mais utilizados, a expansão deles é limitada por demandarem grandes volumes de água e terra (Avnimelech, 2012). Considerando a crescente demanda por proteína animal e essa limitação de sistemas aquícolas tradicionais, nos últimos anos tem crescido o número de estudos e a aplicação de sistemas de produção alternativos que demandam menor volume de água e que promovam a intensificação sustentável, como os sistemas de recirculação e o sistema de bioflocos (BFT – *Biofloc Technology*) (Avnimelech, 2012; Ahmad *et al.*, 2017; Khanjani, Sharifinia e Emerenciano, 2024).

O BFT é caracterizado pela presença de uma microbiota aquática específica, composta, principalmente, por agregados de bactérias nitrificantes, tais como dos gêneros *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Pseudomonas*, e outros microrganismos (Khanjani, Sharifinia e Emerenciano, 2024). A partir da adição de fontes de carbono e constante agitação e aeração da coluna d'água, é favorecido o crescimento desses microrganismos nitrificantes, responsáveis pela oxidação da amônia em nitrito e, posteriormente, pela conversão do nitrito em nitrato (Wahman e Pressman, 2014), contribuindo, assim, para a manutenção da qualidade de água e redução significativa da renovação hídrica. Ademais, os bioflocos podem servir como fonte proteica com alto valor nutricional para espécies filtradoras, como a tilápia (Avnimelech, 2007; Azim e Little, 2008).

Por se tratar de um sistema de produção mais recente, o sistema de bioflocos tem sido foco de diversos estudos (Avnimelech, 2012; Ahmad *et al.*, 2017; Manduca *et al.*, 2020; Manduca *et al.*, 2021; Khanjani, Sharifinia e Emerenciano, 2024). Para comparar os resultados de produção desse sistema com sistemas mais consolidados, experimentos sobre BFT apresentam como controle sistemas de água clara (AC), que representam bem as condições da água dos sistemas de tanques-redes, *raceways* e recirculação de água. Na escala experimental o sistema de AC pode ser obtido tanto com a renovação constante da água ou por meio

de sistemas de recirculação (RAS - *Recirculating Aquaculture System*), que tem como finalidade manter os parâmetros de qualidade hídrica adequados, reduzindo a concentração de metabólitos tóxicos como amônia e nitrito (Bentzon-Tilia, Sonnenschein e Gram, 2016). O sistema de AC apresenta-se particularmente útil para viabilizar a observação de efeitos de tratamentos experimentais, especialmente em estudos com administração de microrganismos, já que, diferentemente do sistema de BFT, não possui uma microbiota expressiva que pudesse interferir (Cardona *et al.*, 2016; Waiho *et al.*, 2023).

A escolha entre os sistemas está frequentemente relacionada aos objetivos do cultivo ou estudo. No contexto experimental com administração de microrganismos, ambos os sistemas oferecem vantagens distintas. Enquanto o sistema de AC permite maior controle sobre variáveis ambientais externas e isolamento dos efeitos do microrganismo administrado, o sistema de BFT, por sua vez, oferece um ambiente microbiano mais dinâmico, onde a interação entre o probiótico e a microbiota do sistema pode potencializar seus efeitos, além de oferecer um ambiente mais próximo da realidade de produção em viveiros escavados (Cardona *et al.*, 2016; dos Santos *et al.*, 2021).

Além de todas as variáveis supracitadas relacionadas ao animal, sistema de produção, ambiente e microrganismo, a efetividade do microrganismo probiótico também depende do método de preparo e da forma de administração deste, o qual se dá, em grande maioria, a partir da ração, já que esse processo define a viabilidade celular e a disponibilidade do potencial probiótico (Hai, 2015). O processo de extrusão, comum na produção de rações comerciais para peixes, pode afetar a viabilidade microbiana devido à alta temperatura e pressão utilizadas (Acuff e Aldrich, 2022). Estratégias como o microencapsulamento, o uso de microrganismos secos ou até mesmo a utilização de culturas *in natura*, não processadas, devem ser investigadas como alternativas para proteger e garantir a efetividade destes.

A utilização de probióticos na aquacultura tem se tornado uma prática cada vez mais comum, visando melhorar a saúde dos animais e a eficiência dos sistemas de cultivo intensivo (Mathan Muthu *et al.*, 2024). Neste contexto, o presente estudo visou avaliar o potencial probiótico e biotecnológico de linhagens de *P. brasiliiana*, os métodos de inclusão dessa levedura na ração oferecida às tilápias e a aplicação desta na aquacultura, avaliando seu desempenho em diferentes sistemas de produção.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da utilização de probióticos na prática clínica já ser comum, a busca por novos microrganismos é fundamental, uma vez que cada microrganismo pode apresentar uma ampla variedade de características e efeitos benéficos únicos. Essa diversidade permite a utilização de abordagens personalizadas para os tratamentos de diferentes doenças e condições. Na aquacultura, a introdução de suplementação dietética com probióticos representa um avanço significativo para a manutenção da saúde e a melhora do desenvolvimento dos organismos, contribuindo para a redução do uso exacerbado – e, até mesmo, inadequado – de antibióticos.

Atualmente, a indústria da aquacultura representa um setor em ascensão no mercado, enfrentando desafios relacionados à nutrição e à saúde dos peixes, incluindo tilápias. Considerando que em estudos anteriores a utilização de probióticos não só demonstrou benefícios aos organismos aquáticos a partir da modulação da microbiota intestinal e suas interações específicas com o intestino, mas também que produtores de astaxantina auxiliaram em uma melhor nutrição dos peixes, a descoberta de novas linhagens microbianas com propriedades semelhantes pode abrir novas perspectivas para o setor.

A utilização de *P. brasiliiana* na aquacultura também tem o potencial de promover uma abordagem mais sustentável para o processo de cultivo ao realizar a modulação positiva da microbiota intestinal dos organismos e, devido a promoção de um melhor desempenho do sistema imune, contribuir para a redução da necessidade do uso de antibióticos. Dessa forma, a utilização da levedura contribui para práticas mais sustentáveis na aquacultura.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial probiótico de *P. brasiliiana* a partir de análises *in vitro* e desenvolvimento de ração suplementada, a fim de analisar seus efeitos sobre o desempenho zootécnico e saúde de *Oreochromis niloticus* em sistemas de bioflocos e água clara.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial probiótico e biotecnológico *in vitro* de 3 linhagens de *P. brasiliiana*;
- Caracterizar o perfil antioxidante de três linhagens de *P. brasiliiana* por meio das análises de conteúdo fenólico e antioxidante e, para a linhagem selecionada para experimento *in vivo*, identificar e quantificar os principais pigmentos antioxidantes, como astaxantina e β -caroteno;
- Comparar diferentes estratégias de preparo e incorporação da levedura (microencapsulamento, *spray drying*, liofilização e *spray coating*), selecionando e padronizando o método mais eficiente para inclusão desta em ração de *O. niloticus*;
- Preparar ração suplementada com a linhagem de levedura selecionada a partir dos resultados de experimentos *in vitro*;
- Verificar a influência da ração suplementada com a levedura sobre *O. niloticus* em diferentes sistemas de produção (água clara e bioflocos), considerando o desempenho zootécnico, microbiota intestinal, cor do filé e parâmetros histológicos e hematológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Phaffia brasiliiana*

As linhagens de *P. brasiliiana* (UFMG-CM-Y6497, UFMG-CM-Y6498, UFMG-CM-Y6662) estudadas neste trabalho pertencem à Coleção de Microrganismos, DNA e Células da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Ademais, a linhagem UFMG-CM-Y6497 está preservada em estado metabólico inativo no *CBS Yeast Collection do Westerdijk Fungal Diversity Collection*, sob o número de depósito CBS 16121, em Utrecht, Holanda. As leveduras foram isoladas previamente de amostras de solo da Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Santuário do Caraça, Minas Gerais, Brasil, como descrito por Santos *et al.* (2021).

As leveduras foram mantidas em meio *Glucose, Yeast Extract, Malt Extract, Peptone* (GYMP) modificado (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, fosfato de sódio monobásico 0,2%), acrescido de 20% de glicerol, acondicionada em *ultrafreezer* a -80° C em tubos criogênicos de 2 mL.

Para todas as análises realizadas (com exceção o ensaio de Microdiluição em Caldo), as leveduras foram cultivadas em ágar GYMP modificado por 72 h a 25° C e, então, transferidas para um erlenmeyer com 100 mL de caldo GYMP modificado incubado com agitação constante (150 rpm) por 24 h a 25° C. Em seguida, a cultura foi transferida para um erlenmeyer com 450 mL de caldo GYMP modificado, também incubado com agitação constante (25° C), mas por 48 h. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm (~ 3,100 x g) por 5 min a 10° C (centrífuga Hermle Z326K; raio máximo de 11 cm), obtendo-se a biomassa de cada levedura para as diferentes análises. No caso de métodos que foi necessária a utilização de colônias isoladas de placas, a placa com ágar GYMP modificado foi inoculada a partir da biomassa obtida após a centrifugação sendo esta incubada por 72 h a 25° C.

4.2 Avaliação das propriedades funcionais *in vitro*

4.2.1 Tolerância aos sais biliares

Para avaliação da tolerância das leveduras aos sais biliares, foi utilizado o método descrito por Coutinho *et al.* (2021). Uma alíquota de cada linhagem foi ressuspensa em salina tamponada estéril, sendo esta semeada (em triplicata) em placas contendo ágar GYMP modificado e suplementado ou não (controle) com diferentes concentrações de sais biliares (0,01 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,15 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,5 mg/mL; 1,0 mg/mL; 2,0 mg/mL) e incubadas a 25° C durante 72 h. Ao final, a tolerância foi avaliada de 0 (ausência de crescimento) a 3 (crescimento intenso).

4.2.2 Determinação da susceptibilidade aos antifúngicos por microdiluição em caldo (EUCAST)

A susceptibilidade das linhagens aos antifúngicos de relevância clínica foi determinada por meio do método de microdiluição em caldo, seguindo as diretrizes estabelecidas pela EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (2024) com modificações.

Microplacas estéreis de 96 poços foram preparadas contendo um gradiente de concentrações de cada antifúngico testado (Anfotericina B, fluconazol, itraconazol e caspofungina). A solução de trabalho de cada fármaco foi diluída em meio líquido Sabouraud (1% peptona, 4% glicose), sendo dispensados 100 µL por poço. Cada placa foi organizada com oito séries de diluições, destinadas à avaliação de três linhagens em estudo e da linhagem controle *Candida albicans* SC5314. As placas foram armazenadas a -20 °C até o uso.

As linhagens foram previamente cultivadas por 24 a 48 horas em ágar YM (glicose 1%, peptona bacteriológica 0,5%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3% e ágar 2%). Após o crescimento, duas a três colônias foram ressuspensas em água destilada estéril até atingir uma densidade celular equivalente a 65 ± 2 % de transmitância, medida em espectrofotômetro a 530 nm (aproximadamente $1-5 \times 10^6$ UFC/mL). Em seguida, as suspensões foram diluídas 1:10 em caldo Sabouraud.

As placas foram descongeladas e estabilizadas à temperatura ambiente antes da inoculação. Em cada poço, foram adicionados 100 µL da suspensão celular preparada, totalizando um volume final adequado e atingindo uma densidade de inóculo entre $0,5$ e $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. As microplacas foram incubadas a 25 °C por 48 horas, considerando a temperatura ótima de crescimento de *P. brasiliensis*.

A leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada por inspeção visual, com base na turvação dos poços e nos critérios estabelecidos para *C. albicans*. A CIM, para fluconazol (FCZ) e itraconazol (ITZ), foi definida como a menor concentração capaz de reduzir o crescimento visual em $\geq 50\%$ em relação ao controle de crescimento. Para anfotericina B (AmB), a CIM foi determinada como a menor concentração que resultou em $\geq 90\%$ de inibição do crescimento, comparado ao controle sem antifúngico.

Os seguintes pontos de corte foram considerados para interpretação dos resultados:

- AmB: ≤ 1 µg/mL (sensível), > 1 µg/mL (resistente);
- FCZ: ≤ 2 µg/mL (sensível), > 4 µg/mL (resistente);
- ITZ: $\leq 0,06$ µg/mL (sensível), $> 0,06$ µg/mL (resistente).

Para a caspofungina (CASP), considerando que a EUCAST ainda não estabeleceu pontos de corte clínicos devido à significativa variabilidade interlaboratorial nos valores de CIM, a interpretação foi realizada com base nos critérios do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), conforme o documento M27-A3 (2017):

- Suscetível (S): $\text{CIM} \leq 0,25 \mu\text{g/mL}$;
- Intermediário (I): $\text{CIM} = 0,5 \mu\text{g/mL}$;
- Resistente (R): $\text{CIM} > 0,5 \mu\text{g/mL}$.

4.2.3 Avaliação do antagonismo frente a patógenos

A avaliação da atividade antagonista foi realizada a partir do método de difusão em ágar de dupla camada, adaptado a partir de Coutinho *et al.* (2021), avaliando sua atividade frente a *Aeromonas hydrophila* (AER 41), *Edwardsiella tarda* (77-21), *Francisella* sp. (160-22), e *Streptococcus agalactiae* (718-24), patógenos comuns de *O. niloticus*.

Aliquotas de 5 μL da cultura de cada linhagem de levedura (caldo GYMP modificado) foram adicionadas ao centro de cada placa (em triplicata) contendo ágar GYMP modificado. Após incubação, a 25° C por 72 h, as placas foram expostas ao vapor de clorofórmio (1 mL) por 30 min para interromper a multiplicação microbiana. Em seguida, estas foram abertas, por mais 30 min, para evaporação completa do clorofórmio residual e, em seguida, a sobrecamada de 5 mL de ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) semissólido (ágar 0,7%) acrescido de 25 μL de cultura da bactéria patogênica a ser testada foi colocada sobre o ágar. Após incubação a 25° C por 24 h, foi realizada a leitura de possíveis halos de inibição, tendo sido estabelecido como critério de determinação dos resultados a presença ou ausência do halo de inibição.

4.2.4 Análise de conteúdo fenólico e antioxidante de leveduras

A análise do conteúdo fenólico e antioxidante das três linhagens de levedura foi realizado em colaboração com o Departamento de Biologia / Setor de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

A fim de obter extratos para a avaliação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante, foi realizado o rompimento da parede celular da levedura (Bertolo *et al.*, 2019). Foi adicionado 1 g de biomassa das leveduras (em triplicata) em tubos cônicos de capacidade de 15 mL contendo 1 mL de água destilada estéril na proporção de 1:1 (m/v). Foram submetidas ao banho ultrassônico (SSBU-3,8L, Mylabor equipamentos, São Paulo, São Paulo), separadamente, a uma frequência de 40 kHz e por 60 min à 40° C. Após o rompimento das

células, o conteúdo foi centrifugado a 2150 g por 30 min e o extrato obtido foi congelado à -20° C até a realização das análises.

A determinação dos compostos fenólicos foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, como descrito por Waterhouse (2002). A determinação foi realizada a 720 nm, em espectrofotômetro (Biochrom EZ Read 400, Cambridge, United Kingdom). Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra.

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e pelo método β -caroteno/ácido linoleico como descrito por Rufino *et al.* (2010). Para o método de DPPH, a leitura dos extratos por reação foi realizada durante 120 min e determinada à 517 nm (Biochrom EZ Read 400, Cambridge, United Kingdom), sendo os resultados foram expressos em IC₅₀ (mg. mL⁻¹). Já para o método β -caroteno/ácido linoleico, foi determinada à 470 nm (Biochrom EZ Read 400, Cambridge, United Kingdom), sendo os resultados expressos em percentagem de proteção (% proteção).

4.2.5 Caracterização e quantificação de antioxidantes

A extração dos carotenoides da biomassa liofilizada de *P. brasiliiana* UFMG-CM-Y6297 (selecionada adiante para os testes *in vivo* a partir das análises dos diferentes métodos de preparo da levedura) foi realizada pelo Laboratório de Química de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). As extrações dos carotenoides foram realizadas em triplicata.

Inicialmente, 50 mg da amostra foram agitadas em vórtex durante 1 min juntamente com 50 mg de micropérolas de vidro e 1,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, foram adicionados 3 mL de uma mistura de éter etílico:acetato de etila (1:1), procedeu-se nova agitação por 1 min e, em seguida, foram adicionados 4 mL de água destilada, sendo o tubo centrifugado a 3000 g por 5 min a 20° C. Enquanto a fase orgânica foi coletada, a fase aquosa foi extraída outras duas vezes com a mesma mistura de solvente. As fases orgânicas foram combinadas, evaporadas sob fluxo de nitrogênio e o extrato seco foi mantido em *freezer* até a análise cromatográfica.

As análises por cromatografia líquida de alta performance com detecção por diodo array e espectrometria de massas (HPLC-DAD-MS) foram conduzidas segundo o método descrito por De Rosso e Mercadante (2007) para carotenoides livres. A quantificação dos carotenoides foi realizada por padronização externa utilizando os padrões (all-E)-luteína e (all-E)- β -caroteno. A identificação baseou-se em comprimento de onda de máxima absorção, estrutura fina espectral, intensidade de pico *cis*, molécula protonada/desprotonada, fragmentação MS/MS,

co-cromatografia com padrões e comparação com literatura (Britton, Liaaen-Jensen e Pfander, 2004; De Rosso e Mercadante, 2007; Mariutti *et al.*, 2012; Rivera, Christou e Canela-Garayoa 2014). Para facilitar a identificação foram utilizados modos de ionização positivo e negativo, além de terem sido identificados apenas carotenoides previamente relatados nas referências citadas.

A estimativa da potência antioxidante relativa de cada carotenoide foi baseada em valores da literatura: a astaxantina foi considerada com potência = 10 (por ser reportada como $\sim 10 \times$ maior que o β -caroteno) (Naguib, 2000), o β -caroteno e seus derivados foram atribuídos com potência = 1 (Aracati *et al.*, 2022), e precursores como fitoeno receberam potência = 0,5 (Mapelli-Brahm *et al.*, 2017). Esses fatores permitiram ponderar a contribuição estimada (ponderada) de cada composto para o efeito antioxidante total da levedura – com exceção das substâncias 3-hidróxi-equinenon, e aqueles não identificados.

4.3 Caracterização de fatores de virulência

4.3.1 Gelatinase

A produção de gelatinase foi avaliada conforme descrito pela *American Society for Microbiology* (2012). As leveduras foram inoculadas perfurando o meio *Nutrient Gelatin* com auxílio de uma alça de platina em agulha até o fundo dos tubos, sendo estes incubados por 72 h a 25° C (em triplicata). Após a incubação, os tubos foram retirados da estufa e refrigerados por 30 min (4° C).

As amostras que apresentaram liquefação do meio foram consideradas positivas (que produzem a enzima). No entanto, as amostras que permaneceram com o meio sólido, foram mantidas por mais 72h a 25° C e novamente resfriadas por 30 min (4° C), sendo consideradas negativas apenas aquelas que permaneceram sólidas (não produzem a enzima). Como controle positivo, foi utilizada a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) – tendo esta sido incubada a 37° C em períodos de 24 h.

4.3.2 Hemólise

As linhagens foram testadas também quanto à atividade hemolítica utilizando o meio de cultura ágar sangue (5% v/v de sangue de carneiro) em duplicata e incubação a 25° C por 72 h, como descrito por Coutinho *et al.* (2021). As leveduras que apresentaram γ -hemólise – não sendo visualizado nenhum efeito no meio de cultura –, foram consideradas não hemolíticas, enquanto aquelas que apresentaram α -hemólise – produção de zonas esverdeadas em torno das colônias – ou β -hemólise – zonas claras de lise sanguínea no meio de cultura –, foram

consideradas hemolíticas. *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 foi utilizado como controle positivo para β -hemólise – tendo este sido incubado a 37° C por 24 h.

4.3.3 Mucina

A degradação da mucina foi verificada em ágar GYMP modificado suplementado com 0,5% de mucina – já que *P. brasiliensis* não apresentou crescimento em ágar *Yeast Nitrogen Base* (YNB), foi realizada esta adaptação para viabilizar a análise –, sendo o ensaio realizado conforme descrito por Coutinho *et al.* (2021) em triplicata. Como controle positivo do teste, foi utilizada a linhagem *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028.

Aliquotas de 5 μ L de culturas das leveduras foram inoculadas na superfície de placas contendo o meio com mucina, sendo estas incubadas a 25° C por 72 h. Após incubação, as placas foram coradas com 0,1% de amido *black* em 3,5 M de ácido acético por 30 min e, posteriormente, descoloridas com 1,2 M de ácido acético. Os resultados do ensaio foram interpretados como positivos para a degradação da mucina quando houve a presença de halo ao redor das colônias das leveduras.

4.3.4 Coagulase

A produção da coagulase foi avaliada a partir de teste de tubo clássico de acordo como descrito por Yigit *et al.* (2011). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizado como controle positivo para expressão de coagulase.

Foram preparadas suspensões em duplicata de cada linhagem em caldo GYMP, ajustadas de acordo com a escala McFarland 0,1 ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL), e, então foi inoculado 0,1 mL em tubo contendo 0,5 mL de BBL Coagulase Plasma, Rabbit com citrato. Os tubos foram incubados a 25° C e avaliados após 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h e 72 h quanto a formação de coágulos.

Os resultados foram interpretados a partir do grau de formação de coágulos, sendo este classificado em: (+) - coágulos pequenos e desorganizados (em forma de fio); (++) - coágulo(s) pequeno(s) e organizado(s); (+++) - coágulo grande e bem formado que se move quando o tubo é invertido; e (+++++) - coágulo firme que permanece no lugar quando o tubo é invertido. No caso da ausência de coágulo, a linhagem de levedura foi considerada desprovida de tal enzima.

4.3.5 DNase

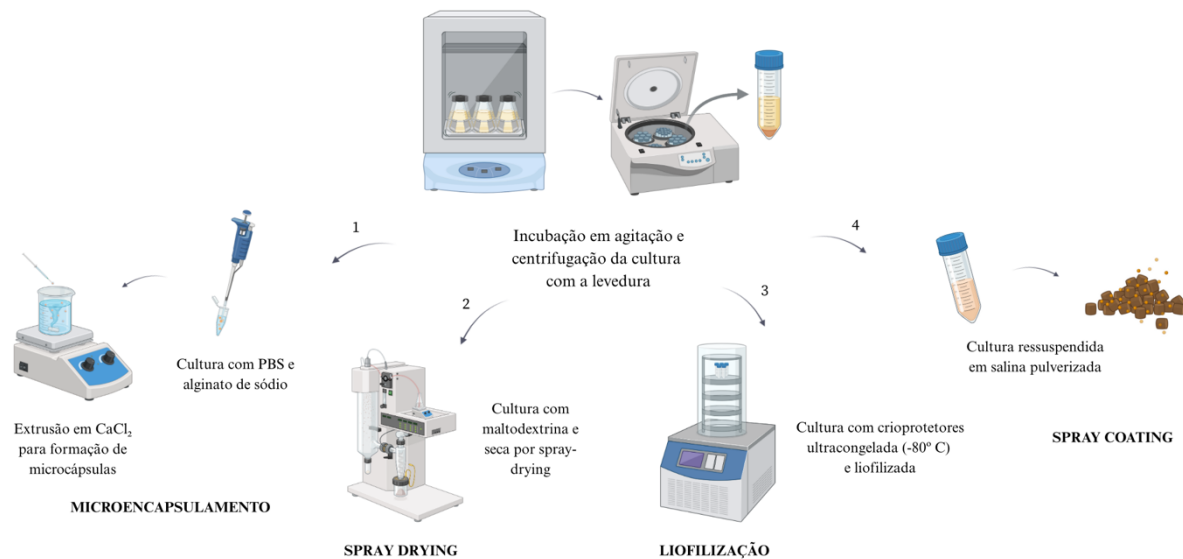
A produção da DNase foi avaliada de acordo como descrito por Jeffries, Holtman e Guse (1957), tendo sido utilizado *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como controle positivo para expressão da enzima.

Aliquotas de 5 µL de culturas das leveduras foram inoculadas na superfície das placas, sendo estas incubadas a 25° C por 72 h. Após incubação, foi adicionado ácido clorídrico 1 M. Os resultados do ensaio foram interpretados como positivos para a produção de DNase quando houve a presença de halo ao redor das colônias das leveduras.

4.4 Avaliação das propriedades biotecnológicas e produção da ração suplementada

Além da verificação das propriedades biotecnológicas das leveduras, os resultados obtidos a partir dos diferentes métodos de preparo do microrganismo (demonstrados na Figura 1 e descritos a seguir) também foram utilizados para seleção da linhagem de *P. brasiliiana* que, em seguida, foi administrada em experimento *in vivo*.

Figura 1 - Esquema dos procedimentos experimentais utilizados para avaliar diversas técnicas de incorporação de microrganismos em ração para peixes.



Fonte: de autoria própria, 2025.

4.4.1 Microencapsulamento

O processo de microencapsulamento foi realizado no Laboratório de Genética Celular e Molecular da UFMG. Para o microencapsulamento, as 3 linhagens ($\sim 10^5$ CFU/mL) foram homogeneizadas em solução de 20 µL de PBS estéril e de 50 µL de alginato de sódio (1%), de acordo com a metodologia descrita por Krasaekoopt *et al.* (2003).

Para este processamento, a solução de alginato de sódio (CaCl_2) foi preparada e esterilizada em autoclave (121°C por 15 min). Então, a mistura foi homogeneizada com cautela e, com o auxílio de uma agulha 21 G, administrada em solução estéril de CaCl_2 (3%) com agitador magnético (solução *cross-linking*), formando microcápsulas (levedura microencapsulada) a partir do contato entre as duas soluções. Em seguida, as microcápsulas foram coletadas por filtração, utilizando um filtro de nylon 40 mm (*Cell Strainer filter*), enquanto o volume remanescente de CaCl_2 foi removido com pipeta. As microcápsulas foram transferidas para microtubos estéreis e armazenadas (-20°C) até que sua concentração foi aferida no dia seguinte.

Para verificar a concentração após o microencapsulamento, as microcápsulas foram ressuspensas em 2 mL de solução de citrato de sódio a 2% (pH 8,36), ou seja, no mesmo volume que os tubos com as leveduras antes do processo de microencapsulamento continham. Após 10 min, os tubos foram vigorosamente homogeneizados para que houvesse a quebra completa das microcápsulas e o conteúdo pudesse ser diluído e plaqueado em ágar GYMP modificado pelo método de *spread plate*. Após incubação por 72 h (25°C), as colônias foram contadas para cálculo das unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Ademais, a concentração (UFC/mL) de cada levedura foi avaliada antes do microencapsulamento.

4.4.2 *Spray drying*

O método de *spray drying* também foi realizado no Laboratório de Genética Celular e Molecular da UFMG. O equipamento utilizado foi um *Spray dryer* modelo MSDi 1.0 (LabMaq. Brasil). Para essa análise, somente a linhagem *P. brasiliensis* UFMG-CM-Y6297 foi testada.

Inicialmente, o equipamento foi desinfetado com 200 mL de álcool 70% e o sistema foi normalizado com água destilada estéril por 15 min. Então, a amostra de 500 mL com a levedura ($\sim 10^{10}$ CFU/mL) ressuspensa em solução estéril de maltodextrina (20%) foi submetida ao procedimento de *spray drying*.

Os parâmetros para padronização e operação do equipamento foram baseados nos estudos de Chandralekha *et al.* (2017) e Martins *et al.* (2022), com as devidas adaptações, a saber: bico atomizador de 1 mm, temperatura de entrada de 100°C , ajustada quando necessário para atingir uma temperatura de saída de aproximadamente 65°C , vazão de alimentação do secador de aproximadamente 0,6 L/h, pressão do ar comprimido de $3,5\text{ kgf/cm}^2$ e fluxo de ar de atomização de 40 L/min.

O pó obtido (microrganismo seco) foi coletado por meio do ciclone separador e armazenado em frasco de vidro coberto com papel alumínio, a fim de evitar a exposição à luz,

a 4 °C. Foram avaliados a biomassa de levedura obtida antes do processo de secagem e o peso total (biomassa + maltodextrina), além da concentração (UFC/mL), determinada pelo método de *spread plate* imediatamente após o processo.

4.4.3 Liofilização

A técnica de liofilização foi baseada na metodologia proposta nos estudos de Bolla *et al.* (2011) e Li *et al.* (2011), com adaptações. O equipamento utilizado foi um liofilizador modelo K105 (Liotop, Brasil). Para essa análise, as 3 linhagens (UFMG-CM-Y6497 ~ 10⁶ CFU/mL; UFMG-CM-Y6498 ~ 10⁶ CFU/mL; UFMG-CM-Y6662 ~ 10⁷ CFU/mL) foram testadas com diferentes crioprotetores (*Skim milk* ©Neogen, sacarose e trealose). Assim, baseado nos resultados obtidos de maior rendimento e menor perda, o processo foi repetido apenas com *P. brasiliensis* UFMG-CM-Y6497 (~ 10⁷ CFU/mL) utilizando *Skim milk* (10%) e sacarose (10%) como crioprotetores.

Foram distribuídos 15 mL de cada suspensão microbiana (já com crioprotetor) em tubos cônicos de 50 mL (previamente esterilizados), os quais foram levados para ultrafreezer (-80° C) por 18 h para congelamento das amostras. Em seguida, foi retirada a tampa dos tubos e colocado papel filtro para o processo de liofilização – os tubos foram mantidos no equipamento por 48 h a -98° C e 4 Pa de pressão. Ao final do ciclo, as tampas dos tubos foram recolocadas e as amostras liofilizadas foram mantidas a -20° C. A biomassa das leveduras obtida antes do processo de liofilização e o peso total (biomassa + crioprotetor) logo após o processo foram avaliados, além da determinação da concentração (UFC/mL) pelo método de *spread plate*.

4.4.4 Inclusão da levedura na ração - *Spray coating*

Com base nos resultados obtidos com as metodologias de microencapsulamento, *spray drying* e liofilização, foi selecionada uma linhagem de *P. brasiliensis* (UFMG-CM-Y6497) para inclusão na ração a partir do método de *spray coating* e seguinte administração em experimento *in vitro* com *O. niloticus*.

O método de *spray coating* foi realizado com base na metodologia proposta por Silva *et al.* (2017), com adaptações. Para tal, foi utilizada uma ração comercial (Propescado, *Nutriave Foods*) contendo 12% de umidade, 45% de proteína bruta, 9% de lipídios brutos e 15% de cinzas, conforme especificações do fabricante. A granulação da ração variou conforme a etapa de desenvolvimento dos animais (período pré-experimental – ração sem levedura – e experimental – ração com levedura, com exceção dos grupos controle). Para o teste de formulação, foi empregada a ração com granulação de 2–4 mm, com o objetivo de avaliar se o

óleo vegetal (de canola) auxiliaria na manutenção da viabilidade da levedura ao atuar como revestimento do pellet. Os procedimentos foram conduzidos de forma independente, realizando-se integralmente um ensaio para a ração sem óleo e outro para a ração com óleo.

A biomassa da levedura (*P. brasiliiana* UFMG-CM-Y6497, $\sim 10^6$ CFU/mL) foi ressuspensa em solução salina a 0,9%, de modo que o volume utilizado fosse suficiente para diluir a biomassa de forma homogênea, contudo, sem exceder o teor de umidade que a ração poderia apresentar (< 15%). Após a homogeneização da solução salina com a biomassa da levedura, a ração foi pulverizada com a mistura em recipiente desinfetado e parcialmente fechado, a fim de minimizar o contato com o ar. Em seguida, foi transferida para um recipiente esterilizado e fechado, sendo posteriormente armazenada sob refrigeração a 4° C.

Logo após a transferência para o recipiente estéril, o pote contendo a ração sem óleo foi imediatamente armazenado sob refrigeração. Paralelamente, à ração do segundo pote foi adicionado óleo vegetal de canola na proporção de 20 mL/kg, distribuído de forma homogênea, conforme o procedimento usual de suplementação de vitamina C na ração destinada a esses animais (Gao *et al.*, 2014), sendo, em seguida, também armazenado sob refrigeração.

Após a definição da formulação mais adequada (com ou sem óleo), o processo de *spray coating* foi repetido com porções de ração destinadas ao uso em intervalos de 15 dias, sendo a quantidade preparada proporcional ao consumo dos peixes, que varia de acordo com a fase de desenvolvimento e a biomassa.

4.4.5 Avaliação da ração suplementada

Para análise da umidade na ração, foi utilizado determinador de umidade (ID200, Marte Científica) imediatamente e 24 h após o *spray coating* a partir de amostras de 4 g de ambas as formulações (com e sem adição de óleo). Ademais, alíquotas da ração foram processadas nos tempos 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h e 168 h (1, 2, 3, 4, 5, 6, e 7 dias) para determinação da UFC. Para tal, a ração foi pesada e macerada na quantidade proporcional de solução salina estéril (0,9%), sendo esta diluída, plaqueada e incubada (a 25° C por 72 h) para posterior contagem de UFC/g. Os dados de contagem microbiana (UFC/g) foram transformados usando logaritmo decimal (log10) antes da análise estatística, sendo as comparações realizadas com os valores transformados.

Com o objetivo de avaliar as formulações quanto à flutuabilidade, hidroestabilidade e manutenção da levedura durante a administração da ração na água, 200 pellets foram adicionados a recipientes distintos contendo água (Freitas *et al.*, 2016). Alíquotas da ração foram coletadas nos tempos 0 min, 3 min, 5 min e 10 min para determinação da UFC, seguindo

o mesmo procedimento descrito anteriormente para a avaliação ao longo dos dias. Além disso, após 10 min, realizou-se a contagem dos pellets que permaneceram flutuando e a avaliação de sua integridade.

4.5 Experimento *in vivo*

4.5.1 Local e instalações

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquacultura (LAQUA) da Escola de Veterinária da UFMG, em estufa agrícola isolada de 71,5 m² (13 m x 5,5 m; Figura 2), caracterizando-se como um estudo independente, com acesso restrito a pessoas autorizadas e adoção de medidas profiláticas de segurança para minimizar o risco de contaminação entre experimentos do laboratório. Durante o período experimental, as janelas e a porta da estufa permaneceram fechadas, colaborando para a manutenção da temperatura interna.

Figura 2 - Estufa agrícola do LAQUA/UFMG utilizada para realização do experimento.



Fonte: acervo pessoal, 2025.

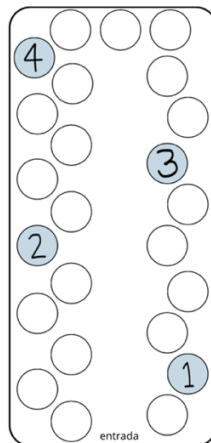
Foram utilizados 24 tanques de fibra de polipropileno, com volume útil de 600 L, sendo 16 tanques destinados aos grupos experimentais – 8 com AC e 8 com BFT (previamente preparado e sendo mantido a partir da adição de açúcar como fonte de carbono (Ebeling, Timmons e Bisogni, 2006) até o início do experimento) – e 8 com AC para trocas de água dos tanques experimentais – essenciais para evitar, assim, variações bruscas de temperatura.

Previamente ao período experimental, foi averiguado se havia a existência ou não de variações de temperatura – que pudessem afetar a necessidade de uma distribuição diferenciada dos tanques no ambiente da estufa – em quatro diferentes regiões da estufa (Figura 3) ao

acompanhar por nove dias a temperatura média, máxima e mínima por meio de termohigrômetros. A partir desses dados, definiu-se a distribuição dos tratamentos (Figura 4), garantindo uma alocação lógica que evitasse equívocos e, conseqüentemente, possíveis contaminações.

Além disso, todos os materiais utilizados durante o experimento foram higienizados e isolados, sendo mantidos na própria estufa para uso exclusivo. Foram separados os materiais destinados aos grupos que receberam levedura daqueles utilizados nos grupos que não receberam. Como única exceção, foram empregadas sondas de uso compartilhado do laboratório para as análises de qualidade da água; nesse caso, as sondas eram devidamente desinfetadas antes e após cada utilização.

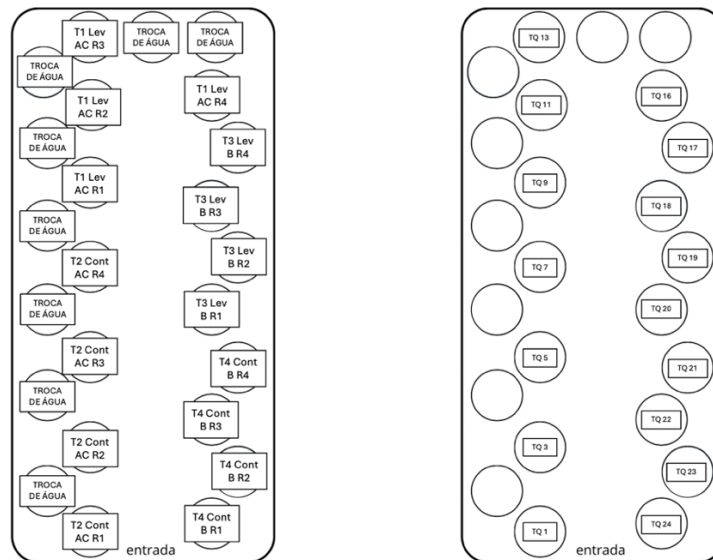
Figura 3 - Tanques nos quais foi avaliada a variação de temperatura para posterior definição dos tratamentos.



Fonte: de autoria própria, 2025.

Os animais foram mantidos e manipulados de acordo com as diretrizes definidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo esse protocolo e todos os procedimentos/análises realizados sido submetidos (em 12/03/2025) e aprovados (em 24/03/2025) junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (Protocolo CEUA #65/2025) (Anexo A).

Figura 4 - Esquemas da estufa com a distribuição dos tratamentos (T1 Lev [levedura] AC, T2 Cont [controle] AC, T3 Lev B [BFT], T4 Cont B) e suas repetições (R1 – R4) do experimento para cada tanque (TQ).



Fonte: de autoria própria, 2025.

4.5.2 Qualidade de água

Durante todo o período experimental, foram realizados monitoramentos constantes dos parâmetros físico-químicos da água dos tanques, tanto do sistema de BFT quanto de AC. As mensurações de pH e salinidade (ppt) foram efetuadas duas vezes por semana utilizando sonda multiparâmetros (Hanna®), enquanto o oxigênio dissolvido (OD; mg/L) foi determinado na mesma periodicidade por meio de oxímetro (AT 160, Alfakit®). A temperatura dos tanques foi monitorada continuamente com termohigrômetros (modelo K29-5070H, Kasvi®), realizando-se leituras da temperatura média, máxima e mínima cinco vezes por semana, além de acompanhamento diário.

As concentrações de amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NO}_4^+$; mg/L) e nitrito (N-NO_2^- ; mg/L) foram determinadas duas vezes por semana por espectrofotometria (Libra S22®), conforme metodologias descritas pela UNESCO (1983) e por Bendschneider e Robinson (1952). Quando a concentração de amônia total ultrapassava 1 mg/L, foi adicionado açúcar (na proporção de C:N de 6:1) diretamente na água para o estímulo do desenvolvimento de bactérias heterotróficas nos tanques com sistema BFT (Ebeling, Timmons e Bisogni, 2006), enquanto, nos tanques com AC, procedia-se à renovação parcial da água.

Já a alcalinidade (mg de CaCO_3/L) e os sólidos sedimentáveis (SS; mL/L) – estes últimos avaliados apenas nos tanques do sistema BFT utilizando cones de Imhoff de 1000 mL

– foram analisados semanalmente, segundo as metodologias propostas por APHA (1998) e (Avnimelech, 2006), respectivamente. Nos casos em que a alcalinidade apresentava valores iguais ou inferiores a 60 mg de CaCO_3/L , procedia-se à correção com calcário na proporção de 0,1–0,4 kg/m^3 .

Nos dias 0, 28 e 63 do experimento foram quantificadas as concentrações de nitrato (mg/L) e de sólidos suspensos totais (SST; mg/L), conforme metodologias descritas por Monteiro *et al.* (2003) e Strickland e Parsons (1972), respectivamente. Além disso, os tanques permaneceram continuamente aerados por meio de difusores de ar, assegurando que o nível de OD fosse mantido acima de 5 mg/L . A renovação de água (2/3 do volume do tanque), proveniente de poço artesiano e previamente armazenada em tanques da própria estufa, foi realizada apenas quando detectadas alterações significativas nos parâmetros físico-químicos monitorados.

4.5.3 Desenho experimental e período pré-experimental

O experimento teve duração de 63 dias (10 semanas), ocorrendo entre os meses de maio e julho de 2025. A distribuição dos peixes nos tanques experimentais foi realizada no dia anterior ao início do experimento (dia 0), iniciando-se apenas no dia 1 a administração da ração suplementada com a levedura para os grupos experimentais correspondentes a esse tratamento.

O tamanho amostral foi calculado a partir do método de Cochran (Couto Junior, 2009) adaptado mostrado abaixo. Dentre as variáveis analisadas, foi selecionada a variação de peso, por se tratar de um dos principais indicadores de desempenho zootécnico nos animais que se deseja analisar.

$$\Delta = \frac{t \cdot CV}{\sqrt{n}}$$

Na qual:

- Δ (delta) representa a precisão ou margem de erro desejada;
- t representa o valor da distribuição t de Student (neste caso, será considerado o valor de t em torno de 2,0 e um nível de confiança de 95%);
- CV representa o coeficiente de variação, calculado a partir do desvio padrão (σ) e da média (μ);
- n representa o tamanho da amostra necessária para estimar a média de uma população com resultados significativos.

Foi determinada $\Delta = 20\%$ para balancear a necessidade de precisão em um estudo de escala menor, obtendo resultados representativos sem comprometer a viabilidade da pesquisa.

Para cálculo do CV , foi selecionado um artigo que, dentre outras análises, avaliou a variação de peso de tilápias-do-Nilo (Turra *et al.*, 2016). Portanto, optou-se por utilizar o valor de $CV = 19,01\%$.

Assim sendo, aplicando os valores na equação:

$$\Delta = \frac{t \cdot CV}{\sqrt{n}}$$

$$20\% = \frac{2,0 \cdot 19,01\%}{\sqrt{n}}$$

$$\sqrt{n} = \frac{2,0 \cdot 19,01\%}{20\%}$$

$$(\sqrt{n})^2 = \left(\frac{2,0 \cdot 19,01\%}{20\%} \right)^2$$

$$n = \left(\frac{38,02\%}{20\%} \right)^2$$

$$n \approx 1,901^2$$

$$n \approx 3,614$$

Assim, foram necessárias quatro unidades experimentais (tanques) por grupo experimental. Considerando que, para os tanques de 600 L de volume útil utilizados, foram estocados 22 peixes por tanque, a densidade de estocagem correspondente foi de aproximadamente $1,11 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ($31,7 \text{ peixes} \cdot \text{m}^{-3}$) – valor representativo como parâmetro da maior parte do experimento e próximo ao descrito como ideal por Manduca *et al.* (2021).

Dessa maneira, o experimento envolveu 352 tilápias divididas em 4 grupos de tratamento (com quatro repetições cada):

- (I) tratamento 1 (T1), peixes no sistema de AC que receberam ração suplementada com a levedura *P. brasiliensis*;

- (II) controle do tratamento 1 (T2), controle do grupo que recebeu o tratamento 1, animais no sistema de AC alimentados somente com ração extrusada controle (sem a levedura, porém com a mesma composição nutricional);

- (III) tratamento 2 (T3), peixes no sistema de BFT que receberam ração suplementada com a levedura *P. brasiliiana*;
- (IV) controle do tratamento 2 (T4), controle do grupo que recebeu o tratamento 2, animais no sistema de BFT alimentados somente com ração extrusada controle (sem a levedura, porém com a mesma composição nutricional).

Para o experimento, foram utilizadas tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) ($1,53 \pm 0,09$ g) pertencentes à geração 0 (G0) do Programa de Melhoramento do grupo de pesquisa NGT-Aqua (Nutrição, Genética e Tecnologia para Aquicultura), vinculado ao Laboratório de Aquicultura (LAQUA/UFMG). Após o período de reprodução (7 dias), as fêmeas foram separadas individualmente em hapas de incubação e as larvas foram transferidas para tanques em sistema de BFT após a absorção do saco vitelínico.

Durante 28 dias, foi realizado o protocolo de masculinização das larvas por meio da administração de ração suplementada com 17α -metiltestosterona (MT), fornecida cinco vezes ao dia. Após o preparo da solução – 150 mg de MT para cada mL de álcool etílico PA (99,5%) –, esta foi pulverizada sobre a ração farelada (ração comercial Propescado, *Nutriave Foods*) contendo 55% de proteína bruta, 12% de umidade, 10% de lipídios brutos e 15% de cinzas, conforme especificações do fabricante. A ração foi armazenada ao abrigo da luz por 24 horas para evaporação do álcool, evitando degradação do hormônio (sensível à luminosidade), e posteriormente acondicionada em recipientes opacos sob refrigeração a -20°C .

Após esse período, os peixes foram alimentados com a mesma ração, cinco vezes ao dia (8 h, 10 h, 12 h, 14 h e 16 h), sem suplementação hormonal. Nas duas semanas que antecederam o início do experimento, foi administrada ração farelada misturada com ração de granulação 0,8 mm (ração comercial Propescado, *Nutriave Foods*), contendo 45% de proteína bruta, 12% de umidade, 9% de lipídios brutos e 15% de cinzas, conforme especificações do fabricante. Essa transição foi necessária, pois os peixes já apresentavam tamanho suficiente para consumir ração granulada, sendo essa forma essencial para a correta administração da levedura.

Durante o período experimental, os peixes foram alimentados três vezes ao dia (8 h, 12 h e 16 h) – até que estivessem visivelmente saciados (*ad libitum*) –, sendo fornecida apenas no primeiro trato (8 h) a ração suplementada com levedura (*P. brasiliiana* UFMG-CM-Y6497) para os tratamentos T1 e T3 – uma vez que este se caracteriza como o momento de maior ingestão alimentar pelos peixes, inclusive, com ausência de sobras. Conforme o desenvolvimento dos animais, foram utilizadas diferentes granulações de ração (0,8 mm; 1,7 - 2,0 mm; 2 - 4 mm). A cada produção quinzenal da ração suplementada com levedura, todos os potes – não apenas

aqueles suplementados – eram pesados e reabastecidos para o cálculo do consumo de ração e da conversão alimentar (CA).

Foram realizadas duas coletas ao longo do experimento: parcial (dia 28) e final (dia 63). Em ambas, três peixes de cada tanque foram eutanasiados por administração de sobredose de solução do anestésico eugenol a 300 mg/L, conforme recomendações de Ross e Ross (2008), para análise de parâmetros de desempenho, composição da microbiota intestinal e histologia intestinal e hepática. Na coleta final, também foram avaliados parâmetros hematológicos e a coloração do filé dos peixes, e todos os animais de todos os tanques foram contados, pesados e, em seguida, submetidos à eutanásia.

4.5.4 Desempenho zootécnico

Para avaliação do efeito da administração da ração suplementada com *P. brasiliensis*, foram calculadas as seguintes variáveis de desempenho zootécnico a partir de dados da coleta parcial (dia 28) e final (dia 63) do experimento (Han *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2020):

$$\text{Produtividade (kg/m}^3\text{)} = \frac{\text{peso médio (kg)} \times \text{n}^{\circ} \text{ peixes}}{\text{volume do tanque (m}^3\text{)}}$$

$$\text{Consumo de ração (g)} = \text{ração ofertada (g)} - \text{sobra ração (g)}$$

$$\text{Ganho de peso diário (g/dia)} = \left(\frac{\text{peso médio final (g)} - \text{peso médio inicial (g)}}{\text{dias}} \right)$$

$$\text{Taxa de crescimento específico (\% \cdot dia}^{-1}\text{)} = \left(\frac{\ln \text{ peso final (g)} - \ln \text{ peso inicial (g)}}{\text{dias}} \right) \times 100$$

$$\text{Conversão alimentar} = \frac{\text{consumo de ração (kg)}}{\text{ganho de biomassa (kg)}}$$

$$\text{Sobrevivência (\%)} = \left(\frac{\text{n}^{\circ} \text{ sobreviventes}}{\text{n}^{\circ} \text{ inicial peixes}} \right) \times 100$$

Para preservar o bem-estar dos peixes ao longo do experimento e minimizar o estresse, optou-se por realizar as biometrias apenas nos dias de coleta (Waheed *et al.*, 2023). Além disso, para evitar manipulação excessiva, na coleta parcial foram pesados apenas alguns animais de cada tanque (pelo menos a metade da quantidade total estimada), selecionados aleatoriamente.

Dessa forma, como os valores obtidos não representariam fielmente a realidade, optou-se por não estimar a taxa de sobrevivência e a conversão alimentar nessa coleta.

4.5.5 Coleta de sangue e análises hematológicas

Na coleta final do experimento (dia 63), três peixes de cada tanque foram selecionados de maneira aleatória operacional – isto é, sem direcionamento ou escolha prévia dos indivíduos – para coleta de amostra sanguínea, seguida de eutanásia por sobredosagem de anestésico (eugenol 300 mg/L (Ross e Ross, 2008). Previamente à coleta, os animais foram anestesiados com eugenol (100 mg/L), e realizou-se a punção direta da veia caudal para obtenção de 1 a 2 mL de sangue. No momento da coleta, o nível de glicose (mg/dL) foi determinado em duplicata, utilizando um glicosímetro portátil digital (ACCU-CHEK Active®, Roche Diagnostic Systems).

Também foram realizados esfregaços sanguíneos em duplicata, em lâminas de vidro com ponta fosca (Olen®), para análise diferencial leucocitária. Cada esfregaço foi preparado a partir de 5 a 10 µL de sangue, deslizando rapidamente uma lâmina sobre a amostra em ângulo de 45° (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013). Após a secagem, as lâminas foram coradas com kit de corante rápido (panótico, RenyLab®), seguindo as instruções do fabricante: fixação em solução de triarilmetano por 30 s, coloração em solução de xantenos por 30 s, e coloração em solução de tiazinas por mais 30 s, seguido de lavagem em água destilada e secagem vertical completa. Posteriormente, realizou-se a contagem diferencial de 200 leucócitos por lâmina, utilizando objetiva de imersão (100×) de microscópio de luz (Nikon Eclipse 50i), classificando-se os leucócitos em neutrófilos, linfócitos, monócitos ou eosinófilos (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013).

O hematócrito (%) foi determinado em duplicata pelo método de microhematócrito. Para tanto, microcapilares não heparinizados (Micron glass) foram preenchidos até 2/3 de seu volume, vedados e centrifugados a 12.000 rpm por 5 min (Microspin® SPIN-1000, Fluxo Tecnologia). A leitura do hematócrito foi realizada em cartela de aferição, e, a partir do plasma remanescente, determinou-se o teor de proteínas plasmáticas totais (g/dL) por refratometria. O plasma foi transferido para o prisma do refratômetro portátil (RMT90, 0-90% Brix), previamente calibrado a 0 g/dL e lavado com água destilada a cada análise (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013).

Além disso, amostras de 10 µL de sangue foram adicionadas a microtubos contendo 2 mL de solução formol-citrato (formaldeído 37% 30 mL/L, citrato de sódio 29 g/L) para posterior contagem total de eritrócitos. Após homogeneização, aproximadamente 20 µL da mistura foram carregados em Câmara de Neubauer (Global Optics) com lamínula fixa. A

contagem de eritrócitos foi realizada em 5 quadrados pequenos de cada retículo (fator de diluição = 200; volume total contado = $0,02 \text{ mm}^3$), utilizando microscópio de luz com aumento de $40\times$. O número total de eritrócitos foi calculado pela equação:

$$\begin{aligned} & \text{Total de eritrócitos } (10^6/\text{mm}^3) \\ &= \left(\frac{\left(\frac{\text{eritrócitos retículo 1} + \text{eritrócitos retículo 2}}{2} \right) \times \text{fator de diluição}}{\text{volume da área contada } (\text{mm}^3)} \right) \end{aligned}$$

A partir dos valores de hematócrito e eritrócitos obtidos, foi calculado o volume corpuscular médio (VCM):

$$\text{Volume corpuscular médio (fL)} = \frac{\text{hematócrito (\%)} \times 10}{\text{contagem de eritrócitos } (10^6/\text{mm}^3)}$$

Por se tratar de peixes ainda de pequeno porte, optou-se por não realizar a coleta sanguínea na coleta parcial, uma vez que, além da dificuldade em obter volume suficiente para todas as análises, o procedimento poderia gerar estresse e interferir nos resultados obtidos.

Vale ressaltar que, para viabilizar as análises microbiológicas a partir do conteúdo intestinal das tilápias, a primeira alimentação do dia foi realizada 2 h antes do início da coleta. Isto é, os peixes não estavam em jejum, tendo essa característica sido considerada principalmente para a interpretação da glicose sérica.

4.5.6 Índices biológicos

Após a coleta sanguínea, foi realizada a eutanásia dos peixes por sobredosagem de anestésico (eugenol 300 mg/L), de acordo com recomendações de Ross e Ross (2008). Em seguida, foram separados o fígado e as vísceras, sendo estes pesados para cálculo dos índices hepatossomático (IHS) e viscerossomático (IVS) (Silva *et al.*, 2020):

$$\text{Índice hepatossomático (\%)} = \left(\frac{\text{peso do fígado (g)}}{\text{peso peixe}} \right) \times 100$$

$$\text{Índice viscerossomático (\%)} = \left(\frac{\text{peso das vísceras (g)}}{\text{peso peixe}} \right) \times 100$$

4.5.7 Parâmetros microbiológicos

Após a pesagem, o intestino foi separado para coleta do conteúdo intestinal, o qual foi transferido para tubos de ensaio estéreis previamente pesados. Os tubos foram mantidos em isopor com gelo até o momento do processamento (até 30 minutos após a coleta). Em seguida, cada tubo foi novamente pesado para o cálculo do volume de solução salina (NaCl 0,9%) necessário para a obtenção da diluição 10^{-1} . Posteriormente, as amostras foram maceradas com bastão de vidro esterilizado.

A partir dessa diluição inicial, foram preparadas diluições seriadas em microtubos, das quais alíquotas de 25 μ L das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram plaqueadas em placas de Petri tripartidas contendo diferentes meios de cultura:

- Ágar GYMP modificado, suplementado com cloranfenicol (0,2 g/L), para inibição de bactérias e crescimento seletivo de fungos, objetivando a identificação morfológica de *P. brasiliensis*; as placas foram incubadas em aerobiose, por 72 h a 25 °C.
- Ágar MacConkey, para isolamento e crescimento de enterobactérias, incubado em aerobiose, por 24 h a 37 °C.
- Ágar sangue suplementado (hemina 0,1%; menadiona 0,1%; extrato de levedura 0,5%; e sangue de carneiro desfibrinado 5%) (Holdeman, Cato e Moore, 1977), para o crescimento de bactérias sob condições microaerofílicas/anaeróbicas parciais, obtidas pela incubação em jarros de vidro com vela (por 24 h a 37 °C). Nestas condições, buscou-se observar possíveis patógenos comuns de tilápias, que preferem esse tipo de ambiente.

Após o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias formadas nos meios Ágar MacConkey e Ágar Sangue, sendo calculadas as unidades formadoras de colônia (UFC/g de fezes). Os dados de contagem microbiana (UFC/g) foram transformados usando logaritmo decimal ($\log_{10}$) antes da análise estatística. As médias apresentadas e comparações entre tratamentos foram realizadas com os valores transformados. No meio Ágar GYMP modificado, realizou-se a identificação presumitiva de *P. brasiliensis* com base na morfologia típica das colônias – pequenas, convexas e de coloração laranja intensa (Figura 5).

Figura 5 - Placa com ágar GYMP modificado com *P. brasiliiana* isolada (esta placa não advém da análise de amostra do conteúdo intestinal do experimento *in vivo*).



Fonte: acervo pessoal, 2025.

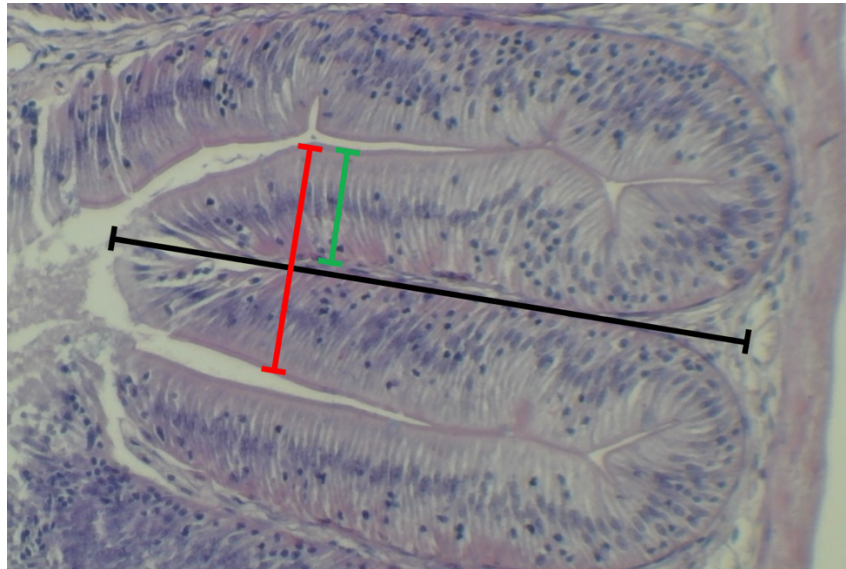
4.5.8 Parâmetros histológicos

Após a coleta do conteúdo intestinal, o material biológico foi processado para análises histológicas do intestino e do fígado. Foi realizado corte transversal da porção distal do intestino, enquanto, para o fígado, foram obtidos cortes histológicos do parênquima hepático, preparados de forma a evidenciar a disposição dos hepatócitos. O processamento dos tecidos e a montagem e coloração das lâminas com cortes histológicos estão descritos no Apêndice A. A microtomia e a Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) das lâminas foram realizadas no Laboratório de Histopatologia e Imunohistoquímica da Escola de Veterinária da UFMG.

Após a secagem, as lâminas foram observadas em microscópio óptico binocular (NO216B, Global Optics) e os cortes histológicos foram fotografados com uma câmera acoplada GX, utilizando o programa S-Eye (S-EYE_Setup-1.6.0.11).

A partir do software ImageJ (versão 1.54p, 2025), foram avaliadas a altura (μm) e largura (μm) das vilosidades intestinais (10 vilosidades por amostra, totalizando 120 vilosidades por tratamento e 480 vilosidades por coleta realizada), além da largura (μm) do epitélio intestinal (5 medidas por amostra) (Bellinate, 2023), como demonstrado na Figura 6. Ademais, foi efetuada a interpretação histológica de vinte campos dos tecidos hepáticos de cada amostra de forma aleatória, ou seja, sem que houvesse conhecimento prévio sobre a qual tratamento cada amostra pertencia (Wolf *et al.*, 2015).

Figura 6 - Micrografia óptica de corte histológico intestinal (aumento x20) mostrando as medidas de altura (em preto) e largura (em vermelho) das vilosidades intestinais e largura do epitélio intestinal (em verde).



Fonte: acervo pessoal (micrografia registrada a partir do programa S-Eye), 2025.

4.5.9 Filetagem - Análise da cor do filé

Como última análise, os peixes foram filetados para obtenção dos filés dorsais. A coloração do músculo dos peixes foi avaliada na coleta final a partir das coordenadas $L^*a^*b^*$ utilizando o aplicativo Colorímetro (Research Lab Tools, São Paulo, Brasil), disponível na Play Store (Ravindranath *et al.*, 2018; Reis *et al.*, 2024). As imagens dos filés foram registradas com a câmera principal (48 MP; resolução máxima de 8064 x 6048 pixels) de um smartphone.

As imagens foram capturadas em até 30 min após a eutanásia dos peixes, a fim de garantir a avaliação da coloração em sua condição natural e sem interferência de alterações *post mortem*, uma vez que o tempo e o congelamento promovem modificações na coloração do tecido muscular devido a processos de oxidação e desnaturação de proteínas (Yu *et al.*, 2024).

A partir das imagens, as coordenadas $L^*a^*b^*$ foram determinadas em cinco pontos distintos do músculo de cada animal. O parâmetro L^* representa a luminosidade – valores menores indicam tonalidades mais escuras (próximas do preto) e valores maiores, tonalidades mais claras (próximas do branco). O parâmetro a^* varia do verde ao vermelho – valores menores indicam maior proximidade do verde, enquanto valores maiores indicam maior intensidade de vermelho. Já o parâmetro b^* varia do azul ao amarelo – valores menores indicam tonalidades mais azuladas e valores maiores indicam tonalidades mais amareladas.

4.6 Análise estatística

As análises estatísticas e a visualização dos resultados foram realizadas utilizando o software R (R Core Team, 2024) com o pacote tidyverse (Wickham *et al.*, 2019) e o programa InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2015). Foram ajustados modelos de regressão linear a fim de descrever a relação estatística entre as variáveis estudadas para avaliação das propriedades biotecnológicas e produção da ração suplementada. As suposições de normalidade e homocedasticidade foram verificadas a partir de visualização gráfica dos resíduos da análise de regressão. Para todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

Para a caracterização da cor dos filés, as coordenadas L^* , a^* e b^* obtidas em cinco pontos de cada amostra foram tabeladas, sendo calculada a mediana individual e, posteriormente, a média por tratamento. A homocedasticidade foi avaliada, para estas variáveis, pelo teste de Bartlett e a normalidade pelo teste de Shapiro–Wilk. Quando os pressupostos foram atendidos, realizou-se análise de variância (ANOVA). A coordenada b^* , que não apresentou distribuição normal, foi analisada pelo teste de Kruskal–Wallis, enquanto as variáveis que atenderam aos pressupostos foram submetidas aos testes de comparações múltiplas adequados, definidos de acordo com o coeficiente de variação (CV): teste de Tukey para $CV < 10\%$, teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para $10\% \leq CV \leq 15\%$ e teste de Duncan para $CV > 15\%$.

Para as variáveis relacionadas à análise de água ao longo do período experimental, as médias foram organizadas de acordo com os tratamentos e os resultados visualizados por meio de gráficos elaborados com o pacote ggplot2 no software R. Em seguida, estas e outras variáveis do experimento *in vivo* (desempenho zootécnico, índices biológicos e análises hematológicas, microbiológicas e histológicas) foram avaliadas quanto às suposições de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk – e homocedasticidade pelo teste de Levene.

Quando os pressupostos foram atendidos, realizou-se análise de variância (ANOVA) e, quando $p \leq 0,05$, pós-teste de acordo com o CV conforme especificado acima. No entanto, quando os pressupostos não foram atendidos, os dados foram transformados por meio de funções logarítmicas (logaritmo neperiano da variável resposta). Nos casos em que a transformação não foi suficiente para normalizar a distribuição ou igualar as variâncias, aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Conover.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação das propriedades funcionais *in vitro* e caracterização de fatores de virulência

A identificação de microrganismos com potencial probiótico deve atender a critérios rigorosos de segurança, funcionalidade e efeitos benéficos reconhecidos por órgãos regulatórios. Esses critérios garantem que o microrganismo não apenas seja seguro para administração, mas também capaz de exercer efeitos positivos sobre a saúde do hospedeiro, enquadrando-se no conceito de probiótico previamente estabelecido pela FAO e OMS. Dessa forma, a avaliação sistemática dessas características é essencial para fundamentar o uso potencial da linhagem microbiana, garantindo que os benefícios alegados sejam cientificamente sustentados (Alkalbani *et al.*, 2022).

A caracterização *in vitro* desses microrganismos constitui um passo fundamental, permitindo a análise da capacidade do microrganismo de sobreviver a condições adversas do TGI do hospedeiro e, assim, determinando sua viabilidade e compatibilidade de administração ao se obter informações iniciais sobre a funcionalidade do microrganismo (Erkkilä e Petäjä, 2000). Leveduras, por serem células eucarióticas maiores que bactérias, possuem características únicas que podem favorecer sua ação probiótica. Seu tamanho e estrutura celular permitem atuar como barreiras físicas contra patógenos, por exemplo, enquanto sua diversidade metabólica oferece potencial para a produção de compostos moduladores da microbiota intestinal (Czerucka *et al.*, 2007).

Nesse sentido, foi realizada avaliação *in vitro* das propriedades funcionais e dos fatores de virulência de três linhagens de *P. brasiliiana*, apresentados na Tabela 1. As análises demonstraram que todas as linhagens são tolerantes aos sais biliares (Tabela 1), tendo essas tolerado todas as concentrações testadas. Mesmo não sendo uma condição presente no TGI de tilápias, foco do presente estudo, essa análise é amplamente utilizada em estudos *in vitro* por permitir a padronização dos testes entre diferentes espécies, fornecendo informações sobre a resistência da levedura a compostos detergentes e à ação de moléculas anfipáticas (Alkalbani *et al.*, 2022). Além disso, contribui para a compreensão da robustez funcional e segurança do microrganismo em diferentes ambientes intestinais, considerando a possibilidade de administração da levedura para outras espécies animais no futuro.

Ademais, nenhuma das três linhagens de *P. brasiliiana* apresentou produção de gelatinase, coagulase ou DNase, nem demonstraram capacidade de degradação de mucina ou de hemólise (Tabela 1), indicando ausência de produção de mucinase e hemolisinas também. Essas enzimas são fatores de patogenicidade que têm sido amplamente utilizados na determinação da potencial patogenicidade de microrganismos, já que podem causar danos e

degeneração das células, tecidos e material genético do hospedeiro, facilitando a invasão e infecção (Kusdarwati, Amin e Wardana, 2021). A importância desses fatores para a virulência bacteriana foi evidenciada em diversos estudos (Di Bella *et al.*, 2025; Eidaroos *et al.*, 2025; Jonsson *et al.*, 1985), nos quais foi verificado que a perda de coagulase e hemolisina comprometeu a capacidade de *S. aureus* de causar infecção, reduzindo significativamente as lesões teciduais observadas em camundongos e a infectividade em humanos e bovinos.

Tabela 1 - Resultados da avaliação das propriedades funcionais *in vitro* e da caracterização de fatores de virulência de *Phaffia brasiliensis*.

Parâmetro		Linhagem			Controle positivo
		UFMG-CM-Y6497	UFMG-CM-Y6498	UFMG-CM-Y6662	
Propriedades funcionais	Tolerância aos sais biliares *	3	3	3	NA
	Antagonismo frente a patógenos * ²	-	-	-	NA
Fatores de virulência	Gelatinase * ³	-	-	-	+
	Hemólise * ⁴	γ -hemólise	γ -hemólise	γ -hemólise	β -hemólise
	Mucina * ⁵	-	-	-	+
	Coagulase * ⁶	-	-	-	+++
	DNAse * ³	-	-	-	+

Fonte: de autoria própria, 2025.

NA: não se aplica.

* A tolerância foi avaliada de 0 (ausência de crescimento) a 3 (crescimento intenso); Para todas as concentrações testadas, as três linhagens apresentaram o mesmo resultado, sendo, então, resumidos em um só tópico.

*² (+) indica ocorrência de atividade antagonista, enquanto (-) indica ausência de atividade antagonista; Para todos os patógenos testados, as três linhagens apresentaram o mesmo resultado, sendo, então, resumidos em um só tópico.

*³ (+) indica a produção da enzima, enquanto (-) indica ausência da produção da enzima; Controle positivo *S. aureus* (ATCC 25923).

*⁴ Controle positivo *S. pyogenes* (ATCC 19615).

*⁵ (+) indica presença de halo/degradação de mucina, enquanto (-) indica ausência de halo/degradação de mucina; Controle positivo *S. Typhimurium* (ATCC 14028).

*⁶ (+) coágulos pequenos e desorganizados, (++) coágulo(s) pequeno(s) e organizado(s), (+++) coágulo grande e bem formado que se move quando o tubo é invertido, (+++++) coágulo firme que permanece no lugar quando o tubo é invertido, (-) ausência da enzima/coágulo; Para todos os intervalos de tempo registrados, as três linhagens apresentaram o mesmo resultado, sendo, então, resumidos em um só tópico; Controle positivo *S. aureus* (ATCC 25923).

A capacidade de degradar mucina é reconhecida como um fator de virulência, uma vez que a camada de muco que reveste os epitélios, tanto no TGI quanto em outras superfícies do hospedeiro, atua como uma barreira física e química, protegendo contra a colonização e invasão por microrganismos (Sheng e Hasnain, 2022). Microrganismos produtores dessas enzimas, como mucinases, proteases ou glicosidases específicas, podem romper essa camada de muco, facilitando a adesão, invasão e colonização dos tecidos epiteliais pelo patógeno. Em estudos com *Pseudomonas aeruginosa* (Aristoteli e Willcox, 2003; Robinson *et al.*, 2012; Wheeler *et al.*, 2019), foi demonstrado que linhagens capazes de degradar mucina apresentaram vantagem de crescimento e potencial invasivo, uma vez que a quebra da barreira mucosa permitiu contato maior com epitélio e maior susceptibilidade do hospedeiro.

No que se refere à gelatinase, essa enzima já foi identificada como fator de virulência em casos de bacteremia em seres humanos, sendo capaz de hidrolisar colágeno, hemoglobina e pequenos peptídeos biologicamente ativos (Costa *et al.*, 2013). Estudos clínicos com *Enterococcus faecalis* revelaram que linhagens produtoras de gelatinase e hemolisina exibem maior capacidade de virulência, tendo sido encontrados, entre 219 isolados, 64 % positivos para gelatinase e 11 % para hemolisina, sugerindo que essas enzimas podem atuar conjuntamente na patogênese (Vergis *et al.*, 2002).

Na aquacultura, a interação entre esses mecanismos também é relevante, tendo sido observados patógenos, como *Photobacterium damsela* e *Aeromonas hydrophila* isolados de peixes (Kusdarwati, Amin e Wardana, 2021; Vences *et al.*, 2017), que produziram simultaneamente β -hemolisina, gelatinase e DNase em ensaios fenotípicos. Esse padrão observado reforça a ideia de que essas enzimas atuam de modo combinado na virulência de organismos aquáticos, promovendo não apenas a degradação de tecidos, mas também a evasão de respostas imunológicas do hospedeiro. Dessa forma, a ausência desses fatores de virulência nas três linhagens avaliadas indica que essas leveduras não apresentam características associadas à invasão do hospedeiro, destacando sua segurança para potencial uso probiótico.

Em relação ao teste de antagonismo realizado, nenhuma das linhagens avaliadas apresentou atividade antagonista frente aos patógenos testados (Tabela 1). Vale destacar que a ausência de ação antagonista *in vitro* não compromete o potencial probiótico da espécie nem restringe seu potencial antagonista, uma vez que, em leveduras, outros mecanismos de ação podem ser mais relevantes, como adesão à mucosa intestinal, modulação da resposta imunológica e efeito de barreira. O estudo de Coutinho *et al.* (2021) corrobora esse padrão, tendo relatado que nenhuma das leveduras testadas, incluindo diferentes espécies, apresentou atividade antagonista *in vitro*.

Como demonstrado em um estudo com leveduras isoladas de bebidas fermentadas (Alvarez *et al.*, 2024), embora não houvesse antagonismo direto contra *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, ensaios com células epiteliais humanas (Caco-2/TC-7) mostraram redução superior a 50% na adesão e invasão da bactéria. Esse achado evidencia que o mecanismo de ação de leveduras probióticas muitas vezes depende da ligação às células epiteliais e da interferência na colonização de patógenos, e não apenas de supressão direta *in vitro*.

Outro fator essencial na avaliação da segurança de potenciais probióticos é a análise do perfil de sensibilidade microbiana, no caso de leveduras, frente a antifúngicos. Os valores de CIM (Tabela 2) indicam um perfil de sensibilidade das linhagens de *P. brasiliiana* analisadas a 3/4 antifúngicos testados (AmB, FCZ e ITZ), apresentando resistência isolada apenas à CASP. Embora as equinocandinas, como a CASP, sejam frequentemente utilizadas no tratamento de infecções fúngicas invasivas, essa resistência não é considerada alarmante.

Estudos clínicos indicam que a resistência à CASP em leveduras ainda é relativamente rara, com prevalência geralmente abaixo de 5 % em isolados de *Candida* sp., enquanto a sensibilidade a outras classes, como polienos e azóis, permanece preservada (Lin *et al.*, 2025; El-Graniny, Yossef e Kamel, 2021). Essas características reforçam a segurança das linhagens microbianas e indicam que a resistência isolada à CASP não compromete sua utilização em experimentos *in vivo*, tendo em vista a existência de alternativas terapêuticas.

Tabela 2 - Valores de Concentração Inibitória Mínima para isolados de *Phaffia brasiliiana* considerando os limites estabelecidos para *C. albicans* SC5314, leitura após incubação a 25° C por 48 h.

Linhagem	Antifúngico			
	AmB	FCZ	ITZ	CASP
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)
<i>C. albicans</i> SC5314	<0,06	2	<0,06	<0,03
<i>P. brasiliiana</i> UFMG-CM-Y6497	<0,06	0,5	<0,06	4*
<i>P. brasiliiana</i> UFMG-CM-Y6498	<0,06	1	<0,06	4*
<i>P. brasiliiana</i> UFMG-CM-Y6662	<0,06	0,5	<0,06	4*

Fonte: de autoria própria, 2025.

AmB: anfotericina B; FLZ: fluconazol; ITZ: itraconazol; CSF: caspofungina.

* Valores apresentados em negrito indicam resistência da linhagem ao respectivo antifúngico.

Outra característica relevante, já descrita para o gênero *Phaffia*, é a capacidade de produzir compostos antioxidantes (Lyons, Jacques e Dawson, 1993). Para sobreviver em ambientes adversos, os microrganismos desenvolveram sistemas de defesa eficientes capazes de mitigar os efeitos do estresse oxidativo por meio da síntese de biomoléculas protetoras.

Embora todos os organismos aeróbicos, incluindo os humanos, possuam mecanismos antioxidantes endógenos, essas defesas naturais podem ser insuficientes, tornando o fornecimento de antioxidantes por meio da dieta um aspecto de grande interesse para a manutenção da saúde do hospedeiro (Salar *et al.*, 2012).

Além de sua ação protetora frente ao estresse oxidativo, compostos antioxidantes microbianos apresentam ampla aplicabilidade na aquacultura devido à sua capacidade de intensificar a coloração natural de organismos aquáticos (Elwan *et al.*, 2019). Em espécies como salmões e camarões, a pigmentação alaranjada característica decorre do acúmulo dietético de antioxidantes pigmentados, uma vez que esses animais não sintetizam tais compostos endogenamente. Dentre eles, a astaxantina destaca-se como o pigmento mais empregado e eficaz, responsável pela coloração avermelhada típica e por efeitos fisiológicos positivos, como melhora da imunidade e resistência ao estresse (Cao e Wang, 2013; Jeong e Kim, 2014).

Nesse contexto, a atividade antioxidante das linhagens de *P. brasiliiana* representa um atributo adicional relevante na caracterização de potenciais probióticos, uma vez que pode conferir benefícios diretos ao hospedeiro, constituindo uma característica biotecnológica de destaque com potencial aplicação tanto na promoção da saúde do hospedeiro quanto como aditivo funcional em dietas de organismos aquáticos cultivados. A avaliação foi conduzida por meio da determinação do conteúdo fenólico total (método de Folin-Ciocalteu) e da aplicação de ensaios de capacidade antioxidante (DPPH e branqueamento do β -caroteno).

O método de Folin-Ciocalteu quantifica o teor total de compostos fenólicos, reconhecidos por sua habilidade em neutralizar radicais livres e proteger células e tecidos contra danos oxidativos (Sánchez-Rangel *et al.*, 2013). O ensaio de DPPH mede a capacidade das amostras em sequestrar radicais livres, fornecendo uma estimativa direta de sua atividade antioxidante (Gulcin e Alwasel, 2023). Já o ensaio de branqueamento do β -caroteno simula processos de oxidação lipídica, avaliando a habilidade das leveduras em proteger moléculas lipofílicas contra degradação oxidativa (Gulcin, 2025) – um parâmetro particularmente relevante para aplicações alimentares e biotecnológicas.

Os resultados obtidos indicam que as três linhagens de *P. brasiliiana* apresentam perfis de atividade antioxidante semelhantes entre os métodos avaliados (Tabela 3), evidenciando a presença de compostos bioativos com potencial de neutralização de radicais livres e proteção contra processos oxidativos. Estudos com *S. cerevisiae* demonstraram resultados semelhantes, cuja biomassa apresentou elevada capacidade antioxidante em ensaios de β -caroteno/linoleato, correlacionada à presença de compostos fenólicos e à atividade de enzimas antioxidantes endógenas (Cui *et al.*, 2023).

Tabela 3 - Resultados da análise de conteúdo fenólico e antioxidante de *Phaffia brasiliiana*.

Parâmetro	Linhagem					
	UFMG-CM-Y6497		UFMG-CM-Y6498		UFMG-CM-Y6662	
	Média ± DP	CV (%)	Média ± DP	CV (%)	Média ± DP	CV (%)
Folin-Ciocalteu (mg EAG. 100 g ⁻¹)	69,76 ± 3,08	4,42	114,42 ± 8,85	7,74	108,97 ± 0,41	0,38
DPPH (mg.mL ⁻¹)	5,37 ± 1,00	18,55	4,84 ± 1,51	31,19	5,22 ± 1,45	27,72
Branqueamento do β-caroteno (% proteção)	64,55 ± 0,90	1,39	66,52 ± 0,46	0,69	61,63 ± 1,90	3,08

Fonte: de autoria própria, 2025.
DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Resultados análogos também foram reportados para o ensaio de DPPH em *S. cerevisiae* (Makky *et al.*, 2021), tendo os metabólitos secundários extraídos da levedura apresentado atividade antioxidante significativa e alta capacidade de sequestro de radicais DPPH. Em outro estudo recente envolvendo o gênero *Saccharomyces* (Lee, Park e Chewaka, 2024), foi relatado que a biomassa de levedura residual de cervejaria (BSY), envolvendo *S. boulardii* e *S. cerevisiae*, apresentou teor total de compostos fenólicos significativamente elevado, bem como eficiente atividade de sequestro de radicais (ensaio de DPPH). Esse resultado confirma que a biomassa de leveduras, mesmo em resíduos industriais (BSY), pode comportar-se como fonte de compostos bioativos com efeito antioxidante.

A atividade antioxidante equilibrada observada nos diferentes métodos indica que as linhagens possuem diversos compostos com mecanismos complementares, como fenólicos, pigmentos e outros metabólitos redutores, tornando-as fontes promissoras de antioxidantes naturais com potencial para uso em probióticos e em dietas de organismos aquáticos.

Foi realizada também a identificação e quantificação dos antioxidantes carotenoides presentes na biomassa de *P. brasiliiana* UFMG-CM-Y6497 – linhagem selecionada para administração do experimento *in vivo*, como detalhado na próxima seção –, avaliando sua contribuição potencial para a atividade antioxidante observada. A metodologia utilizada combina a extração seletiva de carotenoides livres com a análise cromatográfica por HPLC-DAD-MS, permitindo tanto a identificação quanto a quantificação dos compostos com base em padrões externos e dados espectrais de referência.

A HPLC-DAD-MS oferece informações detalhadas sobre os carotenoides presentes, como por exemplo, o tempo de retenção (t_R) indica a ordem de eluição dos compostos, permitindo confirmar a identidade dos carotenoides quando comparado com padrões conhecidos. O comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) fornece informação sobre a estrutura conjugada da molécula, auxiliando na diferenciação de compostos semelhantes. Já a estrutura fina espectral ($\%III/II$) e a intensidade relativa do pico *cis* ($\%A/A_{II}$) reforçam a confiabilidade da identificação, enquanto os íons de massa e fragmentação confirmam a estrutura molecular. Esses parâmetros combinados garantem que os compostos relatados representam, de fato, os carotenoides presentes na amostra.

Na linhagem UFMG-CM-Y6497, foram identificados diversos carotenoides, incluindo astaxantina (nas formas all-E e Z), β -caroteno, β -zeacaroteno e alguns precursores como fitoeno e fitoflueno (Tabela 4). Alguns picos (Figura 7) não puderam ser identificados com precisão, provavelmente devido à baixa concentração ou à ausência de padrões de referência correspondentes. No entanto, a presença desses picos não identificados é relevante, já que

sugere que a levedura produz uma variedade de compostos carotenoides, incluindo, possivelmente, metabólitos intermediários que podem contribuir de forma indireta à atividade antioxidante.

A análise da potência relativa dos antioxidantes permitiu estimar a contribuição de cada carotenoide para o efeito antioxidante total da amostra. No presente estudo, a astaxantina foi considerada o composto com maior potencial antioxidante, enquanto β -caroteno e derivados tiveram potência menor, e precursores como fitoeno foram atribuídos a valores intermediários. De acordo com estudo de Naguib (2000), a astaxantina demonstra capacidade de captura de radicais peroxil aproximadamente 10x superior à do β -caroteno.

Dessa forma, ao aplicar fatores de potência relativos (astaxantina = 10; β -caroteno = 1; fitoeno = 0,5) à concentração, observa-se que, apesar de uma concentração maior de fitoeno, a contribuição estimada da astaxantina para a atividade antioxidante potencial da levedura é preponderante (Figura 8). Essa ponderação é importante, já que, apesar de alguns carotenoides estarem presentes em maiores concentrações, o impacto funcional de cada um depende de sua capacidade antioxidante intrínseca. Dessa perspectiva, embora o fitoeno seja encontrado em maior concentração relativa (53,95%), sua potência antioxidante intrínseca (208,645) limita sua contribuição global. Em contraste, as formas de astaxantina, mesmo presentes em proporções reduzidas (6,56%), apresentam elevada potência antioxidante (507,2), resultando em contribuição preponderante.

Esses resultados reforçam que a relevância funcional dos carotenoides deriva não apenas de sua abundância, mas, sobretudo, de suas propriedades antioxidantes intrínsecas. Essa avaliação complementa a análise da atividade de conteúdo fenólico e antioxidante da levedura. Ao integrar os dados de composição de carotenoides e suas potências relativas, é possível compreender melhor quais compostos provavelmente são responsáveis por esses efeitos antioxidantes, confirmando que a presença de carotenoides como astaxantina e β -caroteno contribui substancialmente para a atividade observada, enquanto precursores e picos não identificados podem atuar como coadjuvantes ou como reservatórios metabólicos.

A produção de carotenoides, como astaxantina e β -caroteno, por microrganismos é considerada altamente positiva devido à combinação de benefícios biotecnológicos e funcionais que oferece, representando uma alternativa sustentável à síntese química e à extração de pigmentos naturais (Saubenova *et al.*, 2024). Ao serem cultivados em meios de baixo custo e em processos fermentativos controlados, resultam em alta produtividade e pureza dos compostos (Bubphasawan *et al.*, 2025).

Tabela 4 - Resultados da identificação e quantificação de antioxidantes produzidos por *Phaffia brasiliensis* UFMG-CM-Y6497.

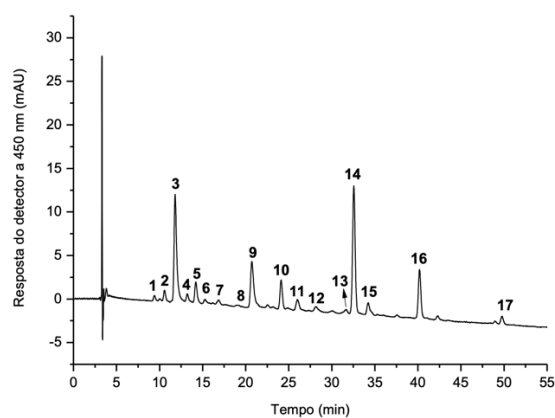
Pico	Antioxidante	t _R (min)	λ max (nm)	Concentração (μg/g)*	Concentração relativa (%)	Potência ponderada
1	NI 1	9,6	466	2,25 ± 0,24	0,29%	NC
2	(Z)-astaxantina	10,8	371,467	5,04 ± 0,55	0,65%	50,4
3	(all-E)-astaxantina	12,0	476	45,68 ± 5,58	5,91%	456,8
4	NI 2	13,5	470	3,86 ± 0,73	0,50%	NC
5	NI 3	14,5	474,489	9,37 ± 1,12	1,21%	NC
6	NI 4	15,6	470,490	2,52 ± 0,16	0,33%	NC
7	NI 5	17,3	272, 281,293,479	3,19 ± 0,27	0,41%	NC
8	Fitoeno	18,4	273,285	417,29 ± 43,03	53,95%	208,645
9	3-hidróxi-equinenona	21,2	474	24,28 ± 2,91	3,14%	NC
10	NI + Fitoflueno	24,8	473	58,35 ± 4,01	7,54%	NC
11	NI 6	26,8	418, 439, 471	5,84 ± 0,63	0,76%	NC
12	NI 7	28,7	454, 474	3,47 ± 0,81	0,45%	NC
13	NI 8	32,3	ND	3,00 ± 0,32	0,39%	NC
14	(all-E)-β-caroteno	33,4	452,478	78,80 ± 6,54	10,19%	78,8
15	(all-E)-β-zeacaroteno	35,0	428,454	32,58 ± 0,63	4,21%	32,58
16	(Z)-β-zeacaroteno	40,9	428,454	47,01 ± 2,70	6,08%	47,01
17	NI 9	50,4	470	30,88 ± 0,66	3,99%	NC

Fonte: de autoria própria, 2025.

NC: não calculada; ND: não detectado; NI: não identificado.

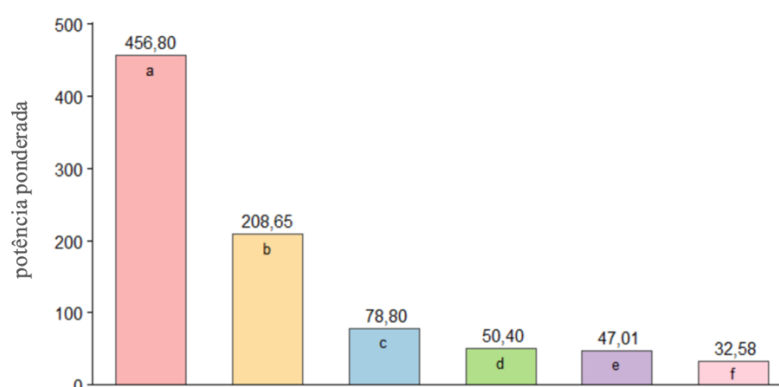
* Média ± desvio padrão

Figura 7 - Gráfico relativo a cromatograma de *P. brasiliana* (UFMG-CM-Y6497), obtido por HPLC-DAD através do método para carotenoides livres, processado a 450 nm. Picos numerados de acordo com a Tabela 4.



Fonte: Laboratório de Química de Alimentos (UNICAMP), 2025.

Figura 8 - Gráfico ilustrando a potência ponderada dos antioxidantes identificados, sendo (a) (all-E)-astaxantina, (b) Fitoeno, (c) (all-E)- β -caroteno, (d) (Z)-astaxantina, (e) (Z)- β -zeacaroteno e (f) (all-E)- β -zeacaroteno.



Fonte: de autoria própria, 2025.

Além disso, os carotenoides pigmentados, como a astaxantina e o β -caroteno, possuem reconhecida atividade antioxidante, contribuindo para a proteção celular contra o estresse oxidativo e para a promoção da saúde do hospedeiro que recebe o microrganismo (Terao, 2023). Quando produzidos por um microrganismo com potencial probiótico, esses metabólitos bioativos agregam valor funcional ao unir efeitos benéficos à microbiota intestinal com propriedades antioxidantes e imunomoduladoras, destacando-se como fontes promissoras para o desenvolvimento de alimentos funcionais e outros produtos biotecnológicos de alto valor agregado.

Assim, com base no perfil de susceptibilidade e nos demais resultados das análises *in vitro*, todas as linhagens foram consideradas seguras, sendo uma delas selecionada para o experimento *in vivo* de acordo com seu desempenho nos testes de avaliação de propriedades biotecnológicas.

5.2 Avaliação das propriedades biotecnológicas e produção da ração suplementada

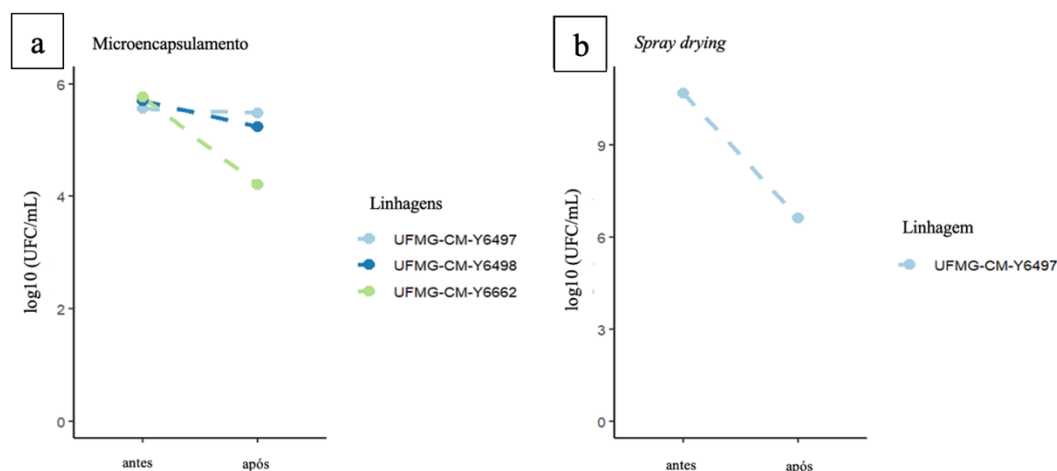
Notavelmente, diversos estudos demonstram o impacto significativo na saúde e no manejo de organismos aquáticos da administração de rações suplementadas com microrganismos (Amillano-Cisneros *et al.* 2025; Amoah *et al.* 2023; Hamdan *et al.* 2016; Mashhadizadeh *et al.* 2024; Munni *et al.* 2023; Omar *et al.* 2024). Embora o uso de microrganismos na nutrição em aquacultura seja bem documentado, ainda não há estudos especificamente voltados para as melhores formas de incorporá-los à ração de peixes, especialmente em escala não industrial, como exigido em ensaios experimentais.

De acordo com a literatura revisada, a maioria dos estudos existentes se concentra na avaliação do potencial probiótico de microrganismos em modelos experimentais, apenas tangenciando os métodos utilizados para incorporar esses microrganismos à ração. De maneira geral, os autores apenas indicam a forma como os microrganismos foram utilizados (por exemplo, liofilizados ou secos por *spray drying*), sem descrever o procedimento de incorporação em si. Além disso, apenas alguns estudos avaliam a viabilidade dos microrganismos após serem adicionados à ração, sem garantir a estabilidade ou a manutenção efetiva do microrganismo e sua concentração na dieta proposta.

Nesse sentido, visando suprir essa lacuna, diferentes métodos de preparo de microrganismos para incorporação em ração para peixes foram testados (Figura 1), dessa forma, permitindo a avaliação das propriedades biotecnológicas das linhagens de *P. brasiliiana*.

Iniciando com o microencapsulamento, após o processamento das microcápsulas, duas das três linhagens de levedura mantiveram sua concentração – a linhagem UFMG-CM-Y6497 diminuiu de $3,68 \times 10^5$ UFC/mL para $3,0 \times 10^5$ UFC/mL, e a linhagem UFMG-CM-Y6498 de $4,96 \times 10^5$ UFC/mL para $1,73 \times 10^5$ UFC/mL – enquanto a linhagem UFMG-CM-Y6662 apresentou uma redução mais acentuada, de $5,76 \times 10^5$ UFC/mL para $1,64 \times 10^4$ UFC/mL (Figura 9a). No entanto, essa redução por si só não impediria o uso da linhagem UFMG-CM-Y6662 a partir desse método – algumas limitações práticas tornam o microencapsulamento menos viável para aplicações experimentais, como será discutido mais adiante.

Figura 9 - (a) Concentração em UFC/mL das três linhagens de levedura antes e após o microencapsulamento; (b) Concentração em UFC/mL da linhagem UFMG-CM-Y6497 antes e após *spray drying*.



Fonte: de autoria própria, 2025.

Posteriormente, a secagem pelo método de *spray drying* foi testada utilizando apenas a linhagem UFMG-CM-Y6497, devido ao fato de que, em escala laboratorial, o método torna-se relativamente trabalhoso e exige uma grande quantidade de cultura de levedura para se obter biomassa seca suficiente. Essa linhagem foi selecionada por ter mantido a maior concentração após o microencapsulamento. Assim sendo, o *spray drying* levou a uma diminuição significativa na concentração de levedura – de $4,8 \times 10^{10}$ UFC/mL para $4,1 \times 10^6$ UFC/mL (Figura 9b) – bem como a uma redução substancial no peso total (biomassa + maltodextrina), de 58,944 g antes da secagem para 31,77 g após.

A partir desses resultados, optou-se por seguir a avaliação da liofilização como alternativa metodológica para secagem da levedura. Anteriormente à análise da viabilidade da utilização da liofilização para posterior produção de ração com o microrganismo liofilizado, foi conduzido um teste preliminar para determinar o(s) crioprotetor(es) mais adequado(s) e para avaliar se uma única linhagem de levedura poderia ser selecionada para os experimentos subsequentes.

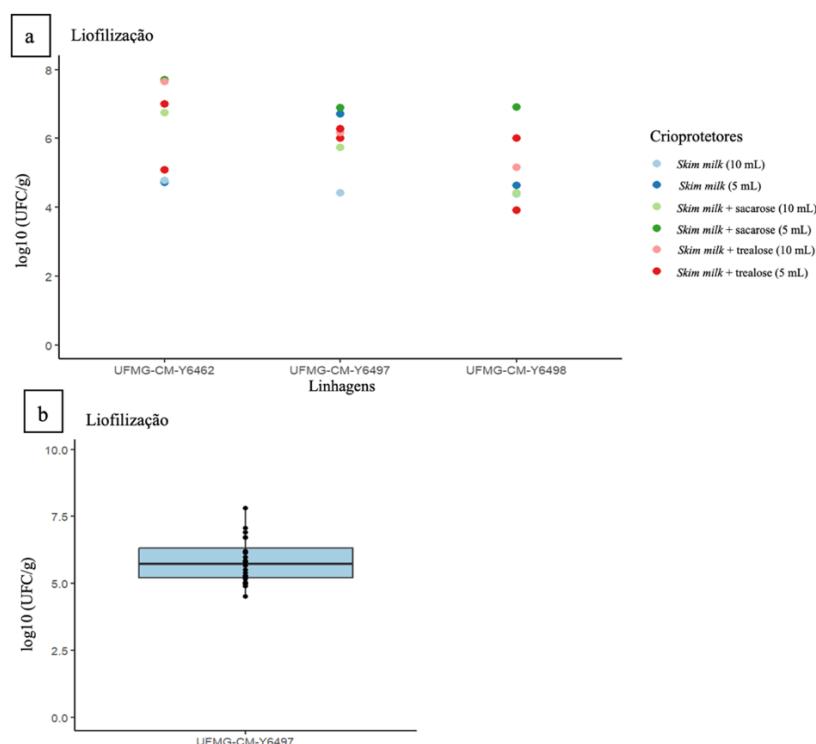
Dentre os crioprotetores testados, a combinação de *Skim milk* e sacarose apresentou o melhor desempenho na preservação da concentração das três linhagens de levedura (Figura 10a). A linhagem UFMG-CM-Y6497, que apresentava uma concentração inicial de 10^6 UFC/mL, apresentou concentrações pós-liofilização de $8,0 \times 10^6$ UFC/g quando ressuspensa em 5 mL da combinação de *Skim milk* e sacarose e $5,52 \times 10^5$ UFC/g em 10 mL. A linhagem UFMG-CM-Y6498, também com concentração inicial de 10^6 UFC/mL, apresentou

concentrações de $8,04 \times 10^6$ UFC/g (5 mL) e $2,64 \times 10^4$ UFC/g (10 mL) após a liofilização. E a linhagem UFMG-CM-Y6662, com concentração inicial de 10^7 UFC/mL, resultou em $4,96 \times 10^7$ UFC/g (5 mL) e $5,60 \times 10^6$ UFC/g (10 mL) após a liofilização.

Em um estudo que investigou o papel crioprotetor do leite integral para linhagens bacterianas (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) (Jiménez *et al.*, 2020), foi relatado que o leite integral sozinho foi eficaz na manutenção da viabilidade microbiana. No entanto, esse resultado contrasta com o que foi observado no presente estudo, no qual o *Skim milk* isoladamente resultou nas maiores perdas de concentração em todas as três linhagens de levedura (Figura 10a).

Além disso, a linhagem UFMG-CM-Y6497 apresentou a menor variabilidade na concentração entre os crioprotetores testados, conforme observado no gráfico. Como enfatizado por Montgomery (2009), "a qualidade é inversamente proporcional à variabilidade", o que implica que "se a variabilidade nas características importantes de um produto diminui, a qualidade do produto aumenta". Avaliando por um ponto de vista prático, a linhagem UFMG-CM-Y6497 foi considerada a mais adequada para inclusão na ração, devido ao seu desempenho consistente entre os crioprotetores.

Figura 10 - (a) Concentração em UFC/g das três linhagens de levedura após a liofilização utilizando diferentes crioprotetores e volumes; (b) Concentração em UFC/g da linhagem UFMG-CM-Y6497 após liofilização com a combinação de *Skim milk* e sacarose como crioprotetores.



Fonte: de autoria própria, 2025.

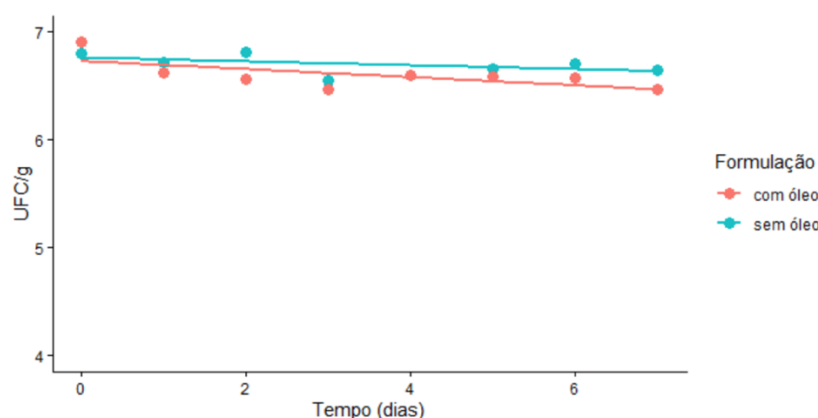
Dessa forma, a liofilização da linhagem UFMG-CM-Y6497 utilizando a combinação de crioprotetores selecionada (*Skim milk* e sacarose) resultou em uma modesta redução geral na concentração (Figura 10b). No entanto, observou-se alta variabilidade entre as replicatas, comprometendo mais uma vez a qualidade do produto. Aliado ao baixo rendimento obtido (discutido posteriormente), optou-se por adotar o método de *spray coating*, que oferece um processo de aplicação direto, com menos etapas de manipulação, aumentando, assim, a probabilidade de manter a viabilidade microbiana. Devido ao baixo rendimento dos demais métodos e, conseqüentemente, à impossibilidade de testar a inclusão para extrusão de ração, o único método efetivamente utilizado para incorporar microrganismos na ração foi o *spray coating*.

Diferentemente das metodologias anteriores, nas quais o microrganismo era submetido a processamento prévio antes de sua inclusão na ração, o *spray coating* permite sua aplicação direta (*in natura*) sobre uma ração já formulada. Nesse caso, apenas o cultivo do microrganismo e o preparo da suspensão são necessários, dispensando etapas adicionais de formulação ou processamento térmico. Diversas rações comerciais submetem os pellets à aplicação de *óleo vegetal*, o que, além de aumentar a palatabilidade e fornecer energia concentrada, também atua na redução da formação de poeira durante o manuseio e no transporte, contribuindo para a higiene do manejo e a segurança dos operadores (Guarino, Jacobson e Janni, 2007).

Adicionalmente, o revestimento oleoso exerce efeito protetor sobre nutrientes sensíveis, como vitaminas lipossolúveis e compostos bioativos, prevenindo sua degradação durante o armazenamento e mantendo a qualidade nutricional da ração (Pandey, 2018). Dessa forma, foi avaliado se a adição de óleo vegetal após a inclusão da levedura na ração poderia favorecer a preservação da viabilidade do microrganismo, tanto durante o período de estocagem quanto durante a administração na água, simulando condições práticas de uso.

Dentre os métodos testados, o *spray coating* se destacou por preservar de maneira eficaz, a partir de ambas as formulações (com e sem adição de óleo vegetal), a viabilidade microbiana na ração após o processamento e durante o armazenamento (Figura 11), evitando também perdas de material durante a incorporação. Isso oferece uma relação favorável em termos de eficiência e viabilidade para contextos de pesquisa – especialmente quando comparado aos métodos de *spray drying* e liofilização, que serão discutidos adiante – e permanece viável para reprodução em pequena escala em ambientes de laboratório de pesquisa.

Figura 11 - Concentração da linhagem de UFMG-CM-Y6497, expressa em Log10(UFC/g), imediatamente após aplicação por *spray coating* e após sete dias de armazenamento, em rações formuladas com ou sem adição de óleo vegetal.



Fonte: de autoria própria, 2025.

Embora alguns estudos tenham empregado a metodologia de *spray coating* para incluir microrganismos em rações destinadas à aquacultura, poucos avaliaram a viabilidade microbiana após o processo de inclusão. Nesse contexto, o estudo de Torres e Mancilha (2020) também avaliou uma metodologia envolvendo microrganismos vivos e não processados termicamente, apesar de utilizar uma variação do método de *spray coating* – no qual, ao invés de pulverizar, a solução microbiana foi incorporada à ração com o auxílio de um misturador circular semelhante a uma betoneira. O método descrito pelos autores consistiu na suspensão do microrganismo em uma solução salina com 2% de óleo e posterior mistura em ração comercial. A viabilidade microbiana foi monitorada ao longo do período de armazenamento, não sendo observada redução significativa no número de células viáveis durante o período de 120 dias ($p > 0,05$).

No presente estudo, a análise de regressão linear das contagens de UFC/g ao longo dos dias subsequentes ao *spray coating* também não revelou declínio significativo durante o período de 7 dias ($p > 0,05$) (Figura 11). Esse resultado indica que, embora a ração contendo o microrganismo probiótico em sua forma *in natura* precise ser preparada com mais frequência em comparação à ração formulada com o microrganismo seco (que seria preparada apenas uma vez no início do experimento), a preparação semanal da ração revestida com a suspensão microbiana mostrou-se suficiente para garantir sua estabilidade.

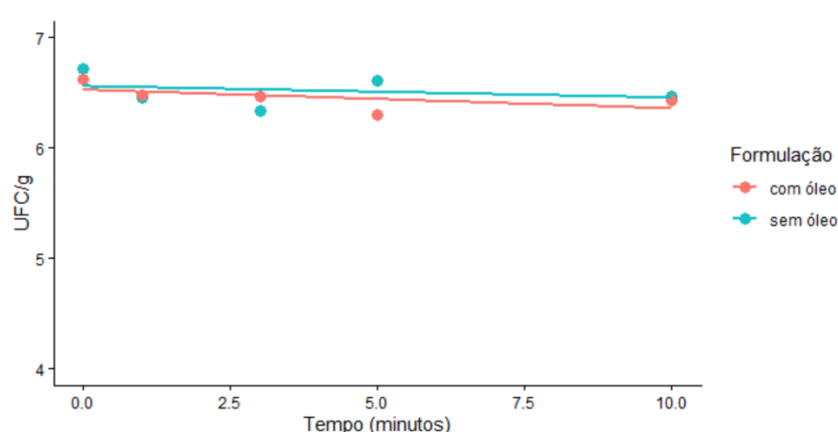
Além disso, o método de *spray coating* também demonstrou eficiência na manutenção do teor de umidade dentro dos limites aceitáveis na ração sem adição de óleo vegetal, registrando-se 13,8% de umidade logo após o procedimento e 12,2% após 24 h de

armazenamento. Por outro lado, na formulação com óleo vegetal, o teor de umidade excedeu o limite recomendado, apresentando valores de 17% imediatamente após o processamento e 16,2% após 24 h. De acordo com a FAO (2001), o teor de umidade na ração para aquacultura não deve exceder 15% para evitar a contaminação fúngica e garantir condições adequadas de armazenamento.

O controle da umidade é um aspecto crítico do processamento da ração, pois níveis excessivos podem promover o crescimento microbiano e a deterioração. Neste caso, o método permitiu a diluição eficaz da solução microbiana para distribuição homogênea na ração, preservando a integridade física e a estabilidade, com valores de umidade permanecendo abaixo do limite recomendado – o que reforça ainda mais a eficácia da abordagem por *spray coating*. No entanto, a adição de óleo vegetal resultou em aumento expressivo do teor de umidade final, podendo comprometer a estabilidade do produto ao longo do período de armazenamento.

A manutenção da viabilidade microbiana foi verificada também ao administrar as duas formulações de ração na água (Figura 12). A alimentação em sistemas aquáticos apresenta particularidades, como a lixiviação de nutrientes para o meio, o que pode comprometer tanto a ingestão pelos organismos aquáticos quanto a qualidade da água (Freitas *et al.*, 2016). Dessa forma, a flutuabilidade e a hidroestabilidade dos pellets são características essenciais a serem observadas.

Figura 12 - Concentração da linhagem de UFMG-CM-Y6497, expressa em Log10(UFC/g), ao ser administrada na água, em rações formuladas com ou sem adição de óleo vegetal.



Fonte: de autoria própria, 2025.

No presente estudo, a análise dessas propriedades mostrou-se fundamental para garantir não apenas a nutrição dos animais, mas também a disponibilidade da levedura até o momento do consumo. Os resultados indicam que, a partir do método de *spray coating*, a ração manteve

a flutuabilidade dentro do padrão estabelecido – com 80-85% dos pellets flutuando (Kubitza, 2009; ACEAQ *et al.*, 2013) –, sendo registrados 90% para a formulação sem óleo e 85% para a formulação com óleo. Ambas as formulações também apresentaram boa hidroestabilidade física, mantendo sua integridade estrutural ao longo de todo o período avaliado.

Ainda que em ambas as análises, durante o período de estocagem e durante a administração na água, tenha havido uma pequena variação entre as concentrações das rações formuladas com e sem adição de óleo vegetal, a análise de regressão linear indicou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações quanto à manutenção da concentração da levedura na ração. Dessa forma, com base nos resultados das análises de regressão linear, umidade, flutuabilidade e hidroestabilidade, foi optado pela utilização da formulação sem adição de óleo vegetal, eliminando-se também uma variável nutricional que poderia interferir nas análises relacionadas à administração da levedura nos peixes.

Retomando a análise do microencapsulamento, uma consideração relevante é a quantidade de microrganismo microencapsulado necessária para um ensaio experimental. Embora a administração oral forçada de microcápsulas já tenha sido relatada na literatura (Krasaekoopt *et al.* 2003), esse método é altamente estressante para os animais e pode interferir negativamente não apenas nos resultados dos tratamentos administrados, mas também na sobrevivência dos animais.

Portanto, para administrar microrganismos microencapsulados de forma eficaz, as microcápsulas precisariam ser incorporadas à ração após o processo de extrusão ou à ração comercial usando um veículo à base de óleo, uma abordagem comumente empregada com a suplementação de vitamina C (Gao *et al.* 2014). No entanto, isso exigiria um volume significativamente maior de microrganismo microencapsulado.

Para fins de estimativa, considera-se um ensaio experimental envolvendo tilápia-do-Nilo, espécie comumente utilizada para estudos de administração de probióticos. Esses ensaios geralmente são conduzidos durante um período de quatro a oito semanas, com peixes juvenis de peso médio de 5 a 70 g. O desenho experimental pode envolver de quatro a seis grupos de tratamento, cada um com três tanques, totalizando de doze a dezoito tanques. Supondo que cada tanque tenha de 15 a 20 peixes, o número total de peixes variaria de aproximadamente 180 a 360 indivíduos.

Ao longo do período experimental, e dependendo da temperatura da água e da taxa de alimentação (tipicamente em torno de 3% do peso corporal por dia), o consumo total de ração por tanque pode variar. No entanto, considerando o crescimento dos peixes durante o ensaio e a conversão alimentar, pode-se estimar que seria necessário aproximadamente 15 kg de ração

para todo o período experimental. Com base na taxa de inclusão comumente utilizada (de 10 g kg⁻¹) para microrganismos microencapsulados, seria necessário cerca de 150 g de microrganismo microencapsulado.

É importante ressaltar que esse material deve ser produzido, idealmente, em uma concentração um logaritmo acima da desejada, uma vez que, durante o processamento, é comum ocorrer a redução de cerca de um logaritmo. Nessas condições, o método torna-se inviável, especialmente considerando que cada microtubo contém apenas, aproximadamente, 0,5 g do produto microencapsulado.

Em seguida, foi realizada análise análoga para os métodos de *spray drying* e liofilização, considerando que ambos envolvem a secagem do microrganismo e sua inclusão durante o processo de extrusão da ração. A quantidade necessária de microrganismos secos foi estimada com base na seguinte fórmula:

Quantidade de microrganismo seco (g)

$$= \frac{\text{Concentração alvo na ração } \left(\frac{\text{UFC}}{\text{g de ração}} \right) \times \text{Quantidade total de ração (g de ração)}}{\text{Concentração da biomassa com o microrganismo seco } \left(\frac{\text{UFC}}{\text{g de microrganismo seco}} \right)}$$

Para ilustrar as implicações práticas desse cálculo, são apresentadas duas simulações baseadas em dados experimentais reais. No primeiro caso, visando uma concentração alvo de $4,1 \times 10^6$ UFC/g de ração em 15 kg de ração, e utilizando biomassa seca obtida por *spray drying* com uma concentração microbiana de $4,1 \times 10^6$ UFC/g de microrganismo seco, o resultado indica que seria necessário 15 kg de microrganismo seco. Da mesma forma, no segundo caso, utilizando produto liofilizado com uma concentração de $4,58 \times 10^6$ UFC/g e a mesma quantidade de ração e concentração alvo, a quantidade necessária de microrganismo seco permanece 15 kg. Em ambos os cenários, a ração consistiria essencialmente em uma proporção de 1:1 entre biomassa microbiana seca e ração base.

Consequentemente, dois fatores-chave devem ser avaliados para determinar a viabilidade desses métodos: o rendimento de biomassa recuperada (g) e a concentração microbiana após o processo de secagem (UFC/g). Em relação ao rendimento de biomassa, observou-se uma perda significativa em ambos os métodos de secagem. Em termos de concentração microbiana, a liofilização resultou em apenas uma modesta redução em escala logarítmica (Figura 10b), com considerável variabilidade entre as réplicas, enquanto a secagem por *spray drying* levou a uma perda de viabilidade mais acentuada (Figura 9b).

Embora diversas combinações de crioprotetores tenham sido testadas durante o processo de liofilização – tendo sido selecionada a formulação mais eficaz para as três linhagens de levedura – estudos adicionais sobre protetores e combinações alternativas poderiam melhorar a viabilidade microbiana tanto na liofilização quanto no *spray drying*. Contudo, essa otimização estava além do escopo do presente estudo.

Com base nos resultados obtidos e utilizando o mesmo exemplo de ensaio experimental envolvendo tilápias-do-Nilo durante um período de quatro a oito semanas, um total de 15 kg de microrganismo seco seria necessário – se processados por *spray drying* ou por liofilização – para suplementar 15 kg de ração para peixes, a fim de pelo menos manter a já baixa concentração de microrganismos secos na ração. Essa proporção de 1:1 (50% de levedura seca para 50% de ração) não apenas comprometeria a formulação nutricional da dieta, mas também poderia reduzir a palatabilidade da ração e alterar suas características físico-químicas, tornando-a inadequada para aplicação prática.

Assim, dado o rendimento de biomassa significativamente baixo de ambos os métodos, mesmo após a otimização de protocolos de produção em pequena escala laboratorial, essas abordagens tornam-se impraticáveis para esta aplicação. Além disso, em um cenário de utilização exclusiva da biomassa obtida, a concentração microbiana diminuiria de maneira significativa, seja por *spray drying* (31,77 g) – reduzindo de $4,10 \times 10^6$ UFC/g para $8,68 \times 10^3$ UFC/g na ração – ou por liofilização (42,73 g) – diminuindo de $4,58 \times 10^6$ UFC/g para $1,30 \times 10^4$ UFC/g na ração.

Diante dessas limitações, alguns estudos compararam indiretamente métodos de incorporação (Jiménez *et al.* 2020; Madureira 2020; Torres e Mancilha 2020). No estudo de Madureira (2020), a funcionalidade de um vetor plasmídico transformado em um probiótico foi avaliada em tilápia-do-Nilo, no qual o probiótico foi administrado oralmente na forma microencapsulada ou como produto liofilizado. A expressão da proteína foi significativamente maior no grupo liofilizado em comparação com o microencapsulado ($p < 0,001$).

No entanto, nenhum desses estudos avaliou a viabilidade dos microrganismos incorporados ou a viabilidade prática dos métodos de incorporação entre diferentes abordagens para a produção de ração para peixes. Essa lacuna na literatura destaca a necessidade de estudos comparativos que avaliem tanto a viabilidade microbiana quanto a viabilidade prática de diferentes métodos de incorporação em condições relevantes para a produção de ração em pequena escala.

Embora numerosos estudos envolvendo a administração de potenciais microrganismos probióticos tenham relatado o uso de biomassa seca (por exemplo, Jantzen *et al.*, 2013; Ying *et*

al., 2010), a maioria se baseou em microrganismos disponíveis comercialmente e produzidos em escala industrial – um contexto que difere substancialmente das condições e limitações abordadas no presente estudo. Antes da produção em escala industrial, o potencial de diversos microrganismos deve ser explorado em ensaios experimentais, como realizado no presente estudo, sendo, portanto, necessário investigar métodos viáveis de produção de ração para pequena escala laboratorial.

Com base nos resultados obtidos para os diferentes métodos de preparo da levedura, a linhagem UFMG-CM-Y6497 de *P. brasiliiana* foi selecionada para incorporação na ração a partir do método de *spray coating*, a qual foi administrada no experimento *in vivo* com tilápias-do-Nilo. A recuperação da levedura a partir do conteúdo intestinal dos peixes em ambas as coletas realizadas durante o experimento permitiu verificar a sobrevivência da levedura e confirmar que a formulação da ração manteve o microrganismo disponível até o consumo, evidenciando a eficácia do método de incorporação selecionado, cuja análise detalhada será discutida mais adiante no texto.

5.3 Experimento *in vivo*

Anteriormente ao período experimental, foram monitoradas as temperaturas em quatro regiões distintas da estufa, onde o experimento seria realizado em seguida. A análise de variância não revelou diferenças significativas entre os tanques quanto à temperatura média, máxima ou mínima ($p > 0,05$), indicando que as condições térmicas estavam homogêneas e que a distribuição dos tratamentos (Figura 4) foi adequada. Dado que a temperatura ambiente pode atuar como importante variável de confusão em ensaios de desempenho nutricional e zootécnico, afetando, por exemplo, a ingestão de ração ou o metabolismo, é fundamental constatar sua uniformidade para garantir que diferenças entre tratamentos não sejam atribuídas a flutuações térmicas (Appana, Queen e Cao, 2023; Chang-Fung-Martel *et al.*, 2021).

Ao início do experimento, as tilápias apresentavam peso médio de 1,5 g, valor correspondente à fase em que o TGI já se encontra funcional para a digestão e absorção dos nutrientes e em que os peixes são capazes de consumir ração peletizada (Rahayu *et al.*, 2024) – característica fundamental para a administração do tratamento probiótico, que foi incorporado exclusivamente à ração peletizada. Essa faixa de peso também coincide com aquela em que as tilápias são comumente adquiridas pelos produtores para a fase de engorda, conferindo pertinência prática ao delineamento experimental (Santos *et al.*, 2016).

Ademais, esse período do desenvolvimento é marcado pela formação da microbiota intestinal, o que o torna adequado à administração de microrganismos com potencial probiótico,

favorecendo sua colonização e os possíveis efeitos benéficos sobre a saúde e o desempenho dos peixes (Wang *et al.*, 2022). À medida que os peixes evoluem em peso, é possível delimitar as faixas de desenvolvimento: as larvas correspondem geralmente a indivíduos com cerca de 0,2 g, nos quais o TGI ainda está imaturo; os alevinos englobam peixes de aproximadamente 0,2 a 1,5 g, período em que o intestino já se encontra funcional, mas a microbiota ainda está em formação e altamente influenciável por fatores externos; por fim, a fase juvenil inicia-se a partir de ~3 g, quando a microbiota intestinal já se encontra mais estabelecida e resiliente a modificações (Godói, 2024; Kubitz, 2006; Pezzato *et al.*, 2010).

Nesse contexto, o estágio inicial do experimento, com peixes de aproximadamente 1,5 g, situou-se na fase de alevinagem, considerada estratégica para a administração de microrganismos probióticos, permitindo maior probabilidade de colonização e efeitos benéficos. O estudo conduzido por Wang *et al.* (2022) corrobora essa questão, evidenciando que a microbiota intestinal de tilápias se estabiliza a partir da fase juvenil e que intervenções dietéticas têm maior impacto nos estágios iniciais de desenvolvimento, quando a microbiota ainda está em formação.

Ao longo do experimento, os parâmetros de qualidade da água nos diferentes sistemas de cultivo e tratamentos permaneceram dentro das faixas ideais para a criação de *O. niloticus* (Alavarenga *et al.*, 2018; Avnimelech, 2009; El-Sayed, 2006; Hargreaves, 2013; Monsees *et al.*, 2017; Wedemeyer, 1996), como apresentado na Tabela 5. A temperatura média dos tanques permaneceu em um intervalo de valores recomendado para a espécie, apesar das oscilações naturais do ambiente externo durante os meses mais frios do inverno. Como já destacado, a temperatura é uma variável ambiental crítica que afeta diretamente o metabolismo, a alimentação e o crescimento das tilápias (Salomão, Santos e Mareco, 2018). Valores dentro da faixa ideal promovem taxas de crescimento mais altas, maior eficiência alimentar e melhor conversão de nutrientes, enquanto desvios podem levar ao ganho de peso e à redução da atividade digestiva (Abd El-Hack *et al.*, 2022).

Em contrapartida, temperaturas mais baixas tendem a diminuir a taxa metabólica e o consumo de alimento, retardando o crescimento, enquanto temperaturas acima do ótimo podem gerar estresse térmico (Emam, Lambert e Brown, 2025). Vale destacar que, no presente estudo, a temperatura foi aferida cinco vezes por semana, permitindo monitoramento próximo da realidade diária. Nesse sentido, apesar das pequenas variações observadas ao longo do dia, a temperatura média permaneceu dentro da faixa recomendada, o que sugere que seu efeito sobre o crescimento provavelmente foi uniforme entre os tratamentos.

Tabela 5 - Médias e coeficiente de variação (CV) ou medianas (Q1-Q3) das análises de qualidade de água por tratamento avaliadas ao longo do experimento *in vivo*.

Parâmetro	Tratamento*				CV* ³	p-valor* ⁴	Valor de referência
	AC-L (T1)	AC-C (T2)	BFT-L (T3)	BFT-C (T4)			
Temp média (° C)	27,60 ^a	27,03 ^a	27,53 ^a	26,93 ^a	1,66	0,1319	27 - 32 ^I
Temp máxima (° C)	31,92 ^a	31,50 ^a	31,66 ^a	31,08 ^a	2,27	0,4385	-
Temp mínima (° C)	24,90 ^a	24,69 ^a	25,14 ^a	24,79 ^a	1,88	0,5821	-
OD (mg/L)	7,27 ^a	7,27 ^a	7,35 ^a	7,33 ^a	2,34	0,8603	> 4 ^{II}
pH	8,02 ^a	8,00 ^a	7,95 ^a	7,94 ^a	0,80	0,3124	6 - 9 ^{II}
Salinidade (ppt)	0,12 ^a	0,12 ^a	0,30 ^b	0,30 ^b	8,91	< 0,0001	< 8 ^{III}
Alcalinidade (mg/L de CaCO ₃)	80,80 ^b	81,25 ^b	67,73 ^a	67,84 ^a	9,11	0,0168	> 50 ^{IV}
Amônia total (mg/L)	0,33 ^a	0,24 ^a	0,16 ^a	0,26 ^a	39,47	0,1913	< 1 ^I
Nitrito (mg/L)	2,82 ^b (1,48 – 3,93)	2,30 ^b (1,41 – 2,80)	0,79 ^a (0,29 – 0,95)	1,08 ^a (0,89 – 1,12)	-	0,0092	< 8 ^I
SS (mL/L)	-	-	14,25 ^a	14,23 ^a	36,86	0,9957	25 – 50 ^V
SST (mg/L) dia 0	-	-	110 ^a	110 ^a	29,51	0,8680	< 1000 ^{IV}
SST (mg/L) dia 28	-	-	700 ^a	740 ^a	23,78	0,7708	< 1000 ^{IV}
SST (mg/L) dia 63	-	-	210 ^a	490 ^b	32,18	0,0130	< 1000 ^{IV}
Nitrato (mg/L) dia 0	1,88 ^a	2,43 ^a	5,29 ^b	5,05 ^b	21,17	0,0002	< 500 ^{VI}
Nitrato (mg/L) dia 28	2,05 ^a	1,76 ^a	5,01 ^b	5,34 ^b	19,89	0,0003	< 500 ^{VI}
Nitrato (mg/L) dia 63	6,72 ^a (1,26 – 11,01)	9,10 ^a (4,42 – 11,14)	296,75 ^b (205,87 – 334,59)	348,44 ^b (181,08 – 389,18)	-	0,0092	< 500 ^{VI}

Fonte: de autoria própria, 2025.

CV: coeficiente de variação; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil; OD: oxigênio dissolvido; SS: sólidos sedimentáveis; SST: sólidos suspensos totais; Temp: temperatura.

* Tratamentos: AC-L – tanques com AC que receberam ração suplementada com levedura; AC-C – controle tanques com AC; BFT-L – tanques com bioflocos que receberam ração suplementada com levedura; BFT-C – controle tanques com bioflocos.

*² As médias ou medianas com letras diferentes na mesma linha diferem de acordo com os testes ANOVA e Tukey (CV < 10%) ou Student-Newman-Keuls (CV de 10% – 15%) ou Duncan (CV > 15%) ou de acordo com os testes de Kruskal-Wallis e Conover (p < 0,05).

*³ Para os parâmetros que foi realizada análise de variância (ANOVA), foi apresentado apenas o coeficiente de variação (CV), por se tratar de uma medida de dispersão relativa, sendo que os dados apresentaram, nesse caso, homocedasticidade.

*⁴ Valor de p referente à análise de variância (ANOVA) para todos os parâmetros, com exceção de nitrito e nitrato no dia 63, cujo valor de p é referente ao teste de Kruskal-Wallis.

^I El-Sayed (2006)

^{II} Wedemeyer (1996)

^{III} Alavarenga *et al.* (2018)

^{IV} Avnimelech (2009)

^V Hargreaves (2013)

^{VI} Monsees *et al.* (2017)

O oxigênio dissolvido apresentou médias de 7,27 mg/L a 7,35 mg/L, mantendo-se acima do limite crítico de 4 mg/L recomendado (Wedemeyer, 1996), indicando que as condições aeróbicas nos tanques foram satisfatórias. A presença de algas e/ou fitoplâncton foi registrada desde o período pré-experimental e se manteve ao longo de todo o experimento, mesmo com as trocas de água. Embora a literatura indique que a presença de algas/fitoplâncton possa provocar variações de pH e OD (Nankervis *et al.*, 2025), no presente estudo não foi apresentado impacto negativo nesses parâmetros. O pH variou de 7,94 a 8,02 entre os tratamentos, permanecendo próximo da neutralidade e dentro da faixa ideal para ambos os sistemas de produção.

Estudos indicam que a presença de algas ou fitoplâncton nos tanques pode exercer influência significativa sobre os parâmetros de qualidade da água, especialmente no OD e no pH, devido às atividades metabólicas de fotossíntese durante o dia e respiração à noite (Kunlasak *et al.*, 2013). Durante o período diurno, a fotossíntese realizada por esses organismos resulta na produção de oxigênio, contribuindo para a manutenção de concentrações adequadas de OD, enquanto durante a noite a respiração pode reduzir localmente os níveis de oxigênio e ocasionar pequenas variações no pH também (Boyd, 2018). Dessa forma, é importante que haja acompanhamento diário nesses casos, para manutenção da qualidade da água e consequente bem-estar dos animais.

Em sistemas de água reutilizada, estudos prévios relataram tendência de redução do pH após cerca de oito semanas de cultivo, o que pode comprometer a estabilidade química do ambiente e, conseqüentemente, o desenvolvimento dos peixes (Gallardo-Colli, Pérez-Rostro e Hernández-Vergara, 2019). No entanto, no presente estudo, mesmo após dez semanas de experimento, não foram observadas alterações nos níveis de pH capazes de comprometer a qualidade da água.

Essa estabilidade pode estar associada, entre outros fatores, à menor densidade de estocagem utilizada, uma vez que concentrações mais baixas de peixes reduzem a produção de CO₂ resultante da respiração e, portanto, a tendência de acidificação do meio (Svobodová *et al.*, 1993). A manutenção da estabilidade do pH, aliada a valores de OD dentro da faixa ideal, é particularmente relevante, uma vez que ambos os parâmetros exercem influência direta sobre o crescimento e a saúde das tilápias (Salomão, Santos e Mareco, 2018), assegurando condições adequadas para o desenvolvimento dos peixes ao longo de todo o período experimental.

A salinidade média apresentou diferenças significativas entre os sistemas: os tanques com BFT exibiram valores de 0,30 ppt, superiores aos de 0,12 ppt observados nos sistemas de AC. Essa diferença era esperada devido ao acúmulo de sais nos sistemas de BFT, resultado da

degradação da matéria orgânica e da menor diluição por trocas parciais de água menos frequentes (Yadav *et al.*, 2025). Já a alcalinidade seguiu um padrão inverso: os tanques de AC apresentaram médias em torno de 81 mg CaCO₃/L, enquanto nos sistemas de BFT os valores foram ligeiramente menores (~ 67,8 mg CaCO₃/L), embora permanecessem acima do limite mínimo recomendado de 50 mg CaCO₃/L (Avnimelech, 2009). Pequenas correções foram realizadas ao longo do período experimental, garantindo estabilidade adequada para a formação de BFT e manutenção da função tampão da água.

Os compostos nitrogenados também apresentaram diferenças notáveis características entre os sistemas. A amônia total manteve-se baixa em todos os tratamentos (0,16 - 0,33 mg/L), evidenciando que as poucas trocas de água foram eficientes e ocorreram nos momentos adequados, evitando acúmulo de metabólitos nitrogenados. Já o nitrito apresentou diferenças significativas entre os sistemas ($p < 0,05$), com valores mais elevados nos tanques de AC (~ 2,3 - 2,8 mg/L) e menores nos tanques de BFT (~ 0,79 - 1,08 mg/L), indicando que o segundo sistema manteve maior capacidade de conversão de nitrito através da ação de bactérias nitrificantes.

A microbiota dos sistemas de BFT desempenha papel importante na ciclagem do nitrogênio, promovendo a oxidação sequencial de compostos nitrogenados (Xu *et al.*, 2024). As aminas e a amônia liberadas pelo metabolismo dos peixes e pela decomposição de matéria orgânica são inicialmente convertidas em nitrito, geralmente por bactérias do gênero *Nitrosomonas*, e, em seguida, transformadas em nitrato, comumente por bactérias do gênero *Nitrobacter* (Robles-Porchas *et al.*, 2020). Nesse sentido, foi observado um acúmulo progressivo maior nos tanques com sistema de BFT ao longo do tempo, enquanto no sistema de AC, mesmo após o final do experimento, os níveis se mantiveram estáveis abaixo de 10 mg/L.

A conversão completa para nitrato representa uma vantagem significativa, uma vez que este apresenta baixa toxicidade para os peixes, diferentemente da amônia e nitrito, que são altamente nocivos mesmo em concentrações relativamente baixas (Raza, Zheng e Yang, 2024). Além disso, parte do nitrogênio inorgânico é consumido por outras bactérias presentes no BFT, incorporando esse elemento em biomassa microbiana, assim, também contribuindo para a redução da toxicidade dos compostos nitrogenados (Ahmad *et al.*, 2017). Essa rede metabólica complexa permite que o BFT mantenha parâmetros de qualidade de água estáveis, mesmo sob elevada carga orgânica, reduzindo a necessidade de trocas de água e garantindo um ambiente adequado para o desenvolvimento das tilápias.

Em relação às análises de sólidos sedimentáveis e suspensos totais, apenas realizadas nos tanques com sistema de BFT, foi observada diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$) apenas nos SST ao final do experimento. Ainda assim, vale destacar que a primeira troca de água parcial nesses tanques foi realizada no 53º dia do experimento. Durante esse intervalo de tempo, não só os valores de SS e SST permaneceram estáveis e abaixo dos limites máximos recomendados, como também os outros parâmetros já discutidos, indicando que o sistema permaneceu equilibrado por cerca de 84,1% do período experimental.

Nesse contexto, a análise integrada dos parâmetros avaliados evidencia associações importantes, como a maior salinidade e o acúmulo progressivo de nitrato característicos nos sistemas de BFT, demonstrando, novamente, o funcionamento ótimo do sistema. De maneira geral, os sistemas mostraram-se adequados para a criação de tilápias, com o sistema de BFT oferecendo maior capacidade de biofiltração, enquanto os sistemas de AC mantiveram parâmetros mais próximos à água renovada, atendendo aos objetivos propostos na definição do desenho experimental. Isto é, a qualidade da água foi adequada em todos os tratamentos e sistemas, com diferenças esperadas entre AC e BFT. As trocas parciais de água, correta estipulação de densidade e monitoramento contínuo permitiram controlar os compostos nitrogenados e sólidos, garantindo condições favoráveis ao crescimento e à saúde dos peixes.

Em relação às análises de desempenho zootécnico, foi indicado que os sistemas de produção e a administração da levedura influenciaram de maneira distinta os parâmetros ao longo do experimento (Tabela 6). Um resultado relevante observado é a manutenção de taxas de sobrevivência elevada entre todos os tratamentos (81 - 94%), sem diferença significativa ($p > 0,05$), o que demonstra que a levedura foi administrada em níveis seguros e não apresentou efeitos tóxicos, não havendo comprometido o bem-estar ou a sanidade dos peixes.

Na literatura, há poucos registros de doses consideradas tóxicas de microrganismos probióticos, provavelmente devido ao fato de que, microrganismos com potencial tóxico ou patogênico já são eliminados nas etapas de avaliação *in vitro*. O estudo de Vaishnavi *et al.* (2024), por exemplo, avaliou diferentes doses de *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) – atualmente, *Lacticaseibacillus rhamnosus* – quanto à toxicidade. Mesmo fazendo parte do gênero *Lactobacillus* que são amplamente reconhecidos pelo *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe* - Geralmente Reconhecidos como Seguros) (Duche *et al.*, 2023). A segurança desses microrganismos continua sendo um tema controverso devido a relatos de reações inesperadas (Petrariu *et al.*, 2024), tendo sido relatado pelos autores efeitos tóxicos leves a moderados dependentes da dose, incluindo mortalidade.

Tabela 6 - Médias e coeficiente de variação (CV) ou medianas (Q1-Q3) das análises de desempenho zootécnico por tratamento avaliadas ao longo do experimento *in vivo*.

Parâmetro	Tratamento*				CV** ³	p-valor** ⁴
	AC-L (T1)	AC-C (T2)	BFT-L (T3)	BFT-C (T4)		
Produtividade (kg/m ³) até dia 28	0,55 ^a	0,44 ^a	0,43 ^a	0,45 ^a	16,39	0,1570
Produtividade (kg/m ³) final	2,24 ^b	2,19 ^b	1,49 ^a	1,66 ^a	14,35	0,0041
Consumo de ração (kg) até dia 28	0,15 ^b (0,14 – 0,15)	0,13 ^{ab} (0,12 – 0,13)	0,12 ^a (0,12 – 0,12)	0,12 ^a (0,12 – 0,12)	-	0,0097
Consumo de ração (kg) final	1,030 ^b	1,045 ^b	0,810 ^a	0,819 ^a	2,34	0,0112
Ganho de peso (g/dia) até dia 28	0,48 ^a	0,39 ^a	0,38 ^a	0,40 ^a	19,14	0,2821
Ganho de peso (g/dia) final	1,23 ^c	1,17 ^{bc}	0,92 ^a	1,0 ^{ab}	10,85	0,0095
Peso (g) inicial (dia 0)	1,56 ^a	1,49 ^a	1,50 ^a	1,58 ^a	5,80	0,4652
Peso (g) dia 28	15,10 ^a	12,39 ^a	12,18 ^a	12,74 ^a	17,11	0,2775
Peso(g) final	78,99 ^c	74,90 ^{bc}	59,41 ^a	64,47 ^{ab}	10,62	0,0096
Taxa de crescimento específico (%/dia) até dia 28	8,09 ^a	7,55 ^a	7,38 ^a	7,43 ^a	8,24	0,3956
Taxa de crescimento específico (%/dia) final	6,23 ^b	6,21 ^{ab}	5,83 ^a	5,88 ^{ab}	3,15	0,0170
Conversão alimentar final	0,79 ^a	0,82 ^{ab}	0,96 ^b	0,86 ^{ab}	8,47	0,0269
Taxa de sobrevivência	89,0 ^a	94,0 ^a	81,0 ^a	85,0 ^a	8,77	0,1272

Fonte: de autoria própria, 2025.

CV: coeficiente de variação; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil.

* Tratamentos: AC-L – tanques com AC que receberam ração suplementada com levedura; AC-C – controle tanques com AC; BFT-L – tanques com bioflocos que receberam ração suplementada com levedura; BFT-C – controle tanques com bioflocos.

**² As médias ou medianas com letras diferentes na mesma linha diferem de acordo com os testes ANOVA e Tukey (CV < 10%) ou Student-Newman-Keuls (CV de 10% – 15%) ou Duncan (CV > 15%) ou de acordo com os testes de Kruskal-Wallis e Conover (p < 0,05).

**³ Para os parâmetros que foi realizada análise de variância (ANOVA), foi apresentado apenas o coeficiente de variação (CV), por se tratar de uma medida de dispersão relativa, sendo que os dados apresentaram, nesse caso, homocedasticidade.

**⁴ Valor de p referente à análise de variância (ANOVA) para todos os parâmetros, com exceção do consumo de ração até dia 28, cujo valor de p é referente ao teste de Kruskal-Wallis. Para este parâmetro, foram apresentadas as médias apenas como referência, já que a análise estatística foi realizada com base nas medianas e ranks.

Nesse sentido, no presente estudo, optou-se por não adotar um regime de dose crescente, uma vez que, com o aumento natural do consumo alimentar ao longo do crescimento, os peixes já receberiam uma maior quantidade do microrganismo de forma proporcional. Assim, apesar de ter ocorrido variação no consumo de ração entre os tratamentos (p < 0,05), visto que a quantidade de ração ofertada foi ajustada a cada trato baseada na demanda alimentar dos peixes

no momento (*ad libitum*), essa diferença de consumo não resultou em variações expressivas na recuperação da levedura no conteúdo intestinal entre os tratamentos, análise que será discutida em maior detalhe mais a frente no texto.

Além disso, considerando que *P. brasiliiana* é uma espécie recentemente caracterizada e não havia sido administrada previamente a nenhum organismo, optou-se por realizar uma abordagem conservadora para avaliação geral da segurança do microrganismo. Estudos adicionais com diferentes doses são necessários para determinação da toxicidade da levedura. Contudo, essa otimização estava além do escopo do presente estudo.

No que se refere à produtividade, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ao final do experimento ($p < 0,05$), tendo os grupos mantidos em sistema de AC (AC-L e AC-C) apresentado produtividade final superior (2,24 e 2,19 kg/m³, respectivamente) em comparação aos grupos em sistema BFT (BFT-L e BFT-C; 1,49 e 1,66 kg/m³, respectivamente). No peso médio final, também houve diferença significativa ($p < 0,05$), mas em um padrão gradativo entre os tratamentos, com os grupos AC-L e BFT-L apresentando maior e menor médias, respectivamente.

Ainda assim, é possível observar uma tendência de maiores pesos nos grupos AC, especialmente em AC-L, o que definiu a maior produtividade observada nesse sistema, uma vez que as sobrevivências foram semelhantes. Esse comportamento pode estar relacionado à menor ingestão de ração observada nos tanques com BFT, característica intrínseca ao sistema, em que parte das necessidades nutricionais dos peixes é suprida pela ingestão de matéria orgânica suspensa (Ahmad *et al.*, 2016; Ekasari, Crab e Verstraete, 2010).

O sistema de BFT, como citado anteriormente, representa uma fonte nutricional complementar para peixes filtradores, como as tilápias, fornecendo proteínas, aminoácidos essenciais, lipídios, carboidratos, vitaminas e minerais. Azim e Little (2008) descreveram que o BFT geralmente é composto por 12-50% de proteínas, 0,5-41% de lipídios, 14-59% de carboidratos e 3-61% de cinzas em peso seco. Dentre as microalgas, por exemplo, as diatomáceas apresentam excelente valor nutricional e contribuem com aminoácidos essenciais e ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3 (Ju *et al.*, 2008). Além disso, a ingestão de BFT promove benefícios à saúde intestinal dos peixes, atuando como probiótico natural e modulando a microbiota do TGI (Asha *et al.*, 2024). No entanto, apesar desses benefícios potenciais, o BFT não substituiu completamente a dieta fornecida, sendo insuficiente para promover crescimento superior ao observado nos sistemas de AC.

Outra hipótese para o menor desempenho de crescimento nos tanques com BFT e administração da levedura (BFT-L) está relacionada à interação microbiana entre a levedura

suplementada e a microbiota residente dos peixes advinda do BFT. A microbiota intestinal é adaptada à dieta habitual do seu hospedeiro, isto é, alterações na composição alimentar podem modificar a composição dos grupos microbianos que ali residem (Defaix *et al.*, 2024). Ao introduzir a levedura via ração, pode haver competição por nutrientes e nichos ecológicos, reduzindo a disponibilidade desses compostos para a microbiota residente e modificando sua abundância e atividade, conseqüentemente, interferindo na dinâmica digestiva e nutricional do hospedeiro, podendo afetar seu desenvolvimento (Agboola *et al.*, 2023).

Ademais, embora a levedura não tenha sido adicionada diretamente à água, modificações na microbiota intestinal e na composição das fezes podem influenciar secundariamente a dinâmica do BFT. Essa situação foi descrita por Qiu *et al.* (2023), que observaram que a suplementação de probióticos em sistemas BFT alterou a composição microbiana do BFT, além de modular a comunidade intestinal, resultando em variações no desempenho produtivo dos animais avaliados.

Em consonância com esses resultados, a conversão alimentar (CA) e a taxa de crescimento específico (TCE) apresentaram variações moderadas entre os tratamentos. A TCE parcial (até o dia 28) não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$), indicando crescimento semelhante na fase inicial de desenvolvimento. No entanto, na avaliação final (dia 63), AC-L apresentou TCE significativamente maior que BFT-L (6,23%/dia e 5,83%/dia, respectivamente), enquanto AC-C e BFT-C exibiram valores estatisticamente sobrepostos, sem diferenças em relação aos demais grupos. Quanto à CA, AC-L registrou a maior eficiência alimentar (0,79), diferindo de BFT-L (0,96), que apresentou a menor eficiência. Ademais, AC-C (0,82) e BFT-C (0,86) tiveram valores sobrepostos novamente, indicando que a separação entre os sistemas não é uniforme para essa variável.

De maneira geral, observa-se uma tendência de maior eficiência alimentar e TCE nos tratamentos em água clara, sobretudo em AC-L, seguindo padrões relatados por Fleckenstein, Tierney e Ray (2018) e Ray, Drury e Cecil (2017), nos quais sistemas de AC tenderam a apresentar menor CA e maior TCE que sistemas de BFT. Além disso, a redução da TCE entre a fase inicial e final reflete o efeito esperado do aumento do tamanho corporal, já que peixes menores apresentam TCE proporcionalmente maior por apresentarem metabolismo relativo mais elevado. À medida que os peixes crescem, o crescimento absoluto também aumenta, mas a taxa percentual diária tende a diminuir (Márquez *et al.*, 2024).

De maneira geral, o bom desempenho em ambos os sistemas, mesmo com suas diferenças, pode ser atribuído às condições ambientais estáveis durante o experimento, à densidade de estocagem adequada e ao rigor no manejo alimentar e de qualidade de água. O

ambiente controlado em estufa isolada assegurou estabilidade térmica e manutenção da taxa metabólica dos animais, evitando sobras de ração e garantindo ingestão adequada – aspecto essencial considerando que o tratamento probiótico foi administrado a partir da dieta. Dessa forma, os resultados indicam que tanto o sistema BFT quanto o sistema de AC mostraram-se adequados para o cultivo de tilápias, sendo o primeiro mais eficiente na retenção e reaproveitamento de nutrientes e o segundo mais favorável ao crescimento e ganho de biomassa.

As análises hematológicas e bioquímicas são parâmetros importantes para avaliação do estado fisiológico e de saúde dos peixes, servindo como biomarcadores confiáveis (Witeska, Kondera e Bojarski, 2023). No presente estudo, observou-se efeito significativo ($p < 0,05$) dos tratamentos sobre alguns parâmetros das análises hematológicas (Tabela 7).

No eritrograma, as tilápias dos grupos suplementados com levedura (AC-L e BFT-L) apresentaram maiores valores de contagem de eritrócitos e hematócrito em comparação aos respectivos controles (AC-C e BFT-C). Esses resultados sugerem um possível efeito positivo da suplementação com a levedura na eritropoiese e na capacidade de transporte de oxigênio, refletindo uma melhor condição fisiológica e metabólica dos peixes (Abd El-Naby *et al.*, 2024).

O aumento de eritrócitos, mesmo permanecendo dentro da faixa normal, pode ser correlacionado a respostas iniciais a fatores ambientais e metabólicos. Em situações de maior atividade metabólica, por exemplo, crescimento acelerado ou temperaturas ligeiramente elevadas, a produção de hemácias pode ser estimulada para atender à maior demanda de oxigênio (Nikinmaa, 2020). O aumento das contagens de eritrócitos também pode indicar inflamações crônicas e respostas compensatórias a estresse ambiental, como hipóxia leve, aumento de temperatura ou manipulação intensa, com efeitos geralmente transitórios (Mu *et al.*, 2025; Shi *et al.*, 2022). Dessa forma, a interpretação deve considerar o contexto ambiental e nutricional, bem como os outros parâmetros hematológicos e bioquímicos, diferenciando adaptações fisiológicas de sinais iniciais de estresse.

Nesse sentido, o fato de os valores permanecerem dentro da faixa normal ($1,0\text{--}3,0 \times 10^6/\text{mm}^3$) indica que não houve estresse hematológico, mas sim uma resposta positiva adaptativa, possivelmente mediada pelos componentes bioativos da levedura, como β -glucanas, mananoligossacarídeos (MOS) e vitaminas do complexo B, que podem estimular a hematopoiese e melhorar a oxigenação tecidual (Abd El-Naby *et al.*, 2024). Essa interpretação é reforçada pelo comportamento do hematócrito, seguindo a tendência observada nos eritrócitos, ou seja, valores significativamente maiores nos grupos que receberam a suplementação com a levedura. Caso fosse decorrente de estresses ambientais, como a

manipulação realizada durante a coleta, não haveria diferença quando comparados aos grupos controle.

Tabela 7 - Médias e coeficiente de variação (CV) ou medianas (Q1-Q3) das análises hematológicas por tratamento realizadas na coleta final (dia 63) do experimento *in vivo*.

Parâmetro		Tratamento*				CV* ³ (%)	p* ⁴
		AC-L (T1)	AC-C (T2)	BFT-L (T3)	BFT-C (T4)		
Eritrograma	Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	1,85 ^b	1,07 ^a	1,60 ^b	1,10 ^a	32,16	0,0001
	Hematócrito (%)	38,13 ^b	24,08 ^a	34,54 ^b	20,83 ^a	27,49	< 0,0001
	VCM (fL)	5,36 ^a	5,65 ^a	5,40 ^a	5,33 ^a	6,68	0,5869
Leucograma	Neutrófilos (%)	89,19 ^a	90,13 ^{ab}	87,73 ^a	95,60 ^b	2,99	0,0076
	Linfócitos (%)	10,71 ^b	8,50 ^b	12,10 ^b	3,67 ^a	29,49	0,0031
	Monócitos (%)	0,06 ^a	0,35 ^a	0,15 ^a	0,65 ^a	123,63	0,1774
	Eosinófilos (%)	0,00 ^a (0,0 – 0,0)	0,13 ^a (0,0 – 0,25)	0,00 ^a (0,0 – 0,0)	0,00 ^a (0,0 – 0,25)	-	0,1151
Bioquímica plasmática	Proteínas plasmáticas (g/dL)	2,65 ^a (2,5 – 2,9)	3,15 ^b (2,8 – 3,3)	2,87 ^a (2,0 – 3,0)	2,85 ^a (2,1 – 3,0)	-	0,0484
	Glicose (mg/dL)	82,92 ^a	87,17 ^a	101,42 ^a	83,25 ^a	23,46	0,1139

Fonte: de autoria própria, 2025.

CV: coeficiente de variação; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil.

* Tratamentos: AC-L – tanques com AC que receberam ração suplementada com levedura; AC-C – controle tanques com AC; BFT-L – tanques com bioflocos que receberam ração suplementada com levedura; BFT-C – controle tanques com bioflocos.

*² As médias ou medianas com letras diferentes na mesma linha diferem de acordo com os testes ANOVA e Tukey (CV < 10%) ou Student-Newman-Keuls (CV de 10% – 15%) ou Duncan (CV > 15%) ou de acordo com os testes de Kruskal-Wallis e Conover (p < 0,05).

*³ Para os parâmetros que foi realizada análise de variância (ANOVA), foi apresentado apenas o coeficiente de variação (CV), por se tratar de uma medida de dispersão relativa, sendo que os dados apresentaram, nesse caso, homocedasticidade.

*⁴ Valor de p referente à análise de variância (ANOVA) para todos os parâmetros, com exceção de eosinófilos e proteínas plasmáticas, cujo valor de p é referente ao teste de Kruskal-Wallis. Para estes parâmetros, foram apresentadas as médias apenas como referência, já que a análise estatística foi realizada com base nas medianas e ranks.

Em estudo conduzido por Abu-Elala *et al.* (2021) com tilápias utilizando extratos fermentados de *S. cerevisiae* (contendo nucleotídeos, β -glucanas e MOS), foi observado aumento significativo nas contagens de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, além de melhorias em parâmetros hemato-imunológicos. De maneira semelhante, Abu-Elala *et al.* (2013) também observaram aumento significativo dos eritrócitos, leucócitos e hemoglobina em

tilápias consideradas saudáveis, a partir de outros parâmetros, alimentados com subprodutos de *S. cerevisiae*.

A ausência de diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de VCM entre os tratamentos indica que o tamanho médio das hemácias permaneceu estável, sugerindo que as variações observadas estão relacionadas principalmente ao número de eritrócitos circulantes e não a alterações morfológicas das células sanguíneas. O aumento do VCM em tilápias poderia indicar macrocitose relacionada a deficiências nutricionais, inflamações crônicas ou doenças hematológicas (Aslinia, Mazza e Yale, 2006). Entretanto, tais condições seriam refletidas em outros parâmetros zootécnicos, hematológicos ou histológicos, o que não foi observado neste estudo.

Ao analisar o leucograma, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) nas proporções relativas de neutrófilos e linfócitos. Os peixes do grupo BFT-C apresentaram maior porcentagem de neutrófilos (95,6%) e menor de linfócitos (3,67%), enquanto os grupos suplementados com levedura mantiveram linfócitos mais elevados e neutrófilos moderados, refletindo uma resposta imunológica mais equilibrada. Já os níveis de monócitos e eosinófilos permaneceram baixos e dentro dos intervalos normais ($< 1\%$), indicando ausência de inflamação crônica ou estresse significativo (Balla *et al.*, 2010; Grzelak *et al.*, 2017). Apesar de ter sido verificado um padrão distinto no grupo BFT-C, com aumento da contagem de neutrófilos e redução de linfócitos, como os valores permanecem dentro de limites toleráveis (Bavia *et al.*, 2024), não havendo alterações em monócitos ou eosinófilos, não há indicação de inflamação crônica, possivelmente sendo uma alteração transitória relacionada a estresse leve ou ajustes fisiológicos do manejo.

Nas análises de bioquímica plasmática, as proteínas plasmáticas totais representam a soma das frações de albumina e globulinas presentes no plasma sanguíneo e desempenham diversas funções fisiológicas importantes, como a manutenção da pressão osmótica, transporte de substâncias, regulação do pH e participação na resposta imune (Witeska, Kondera e Bojarski, 2023). Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) nos níveis de proteínas plasmáticas totais, com maiores valores nas tilápias do grupo AC-C em relação aos demais. No entanto, por este e os demais valores estarem compatíveis com faixas frequentemente relatadas em tilápias saudáveis (Bittercourt *et al.*, 2003; Flores-Méndez *et al.*, 2022), além da ausência de alterações em outros parâmetros de estresse, é sugerido que o aumento observado no AC-C provavelmente não reflete doença, mas sim uma variação fisiológica.

Os níveis de glicose sérica permaneceram estáveis ($p > 0,05$) entre os tratamentos, indicando que não houve mobilização energética associada a estresse agudo. Vale ressaltar que

a coleta foi realizada 2 h após a primeira alimentação do dia, ou seja, os peixes não estavam em jejum, situação que pode elevar temporariamente a glicose plasmática. Ainda assim, os valores encontrados (aproximadamente 95-105 mg/dL) permaneceram dentro das faixas fisiológicas relatadas na literatura para *O. niloticus*, que variam de ~40-80 mg/dL em jejum e ~100-110 mg/dL no período pós-prandial (Chen *et al.*, 2017).

O tecido hematopoiético é bastante sensível a mudanças ambientais, sendo considerado um excelente biomarcador do estresse (Reis, 2021; Silva *et al.*, 2017), assim como a glicose sérica, que tende a aumentar em situações de estresse (Abdel-Tawwab *et al.*, 2025). Nesse sentido, as análises hematológicas e bioquímicas realizadas indicam que, na maioria dos parâmetros avaliados, os grupos que receberam a suplementação com *P. brasiliensis* apresentaram melhores resultados, sugerindo diminuição ou, até mesmo, ausência de estresse. Considerando que a linhagem UFMG-CM-Y6497 possui comprovada atividade antioxidativa (Tabela 3), é possível correlacionar esses achados hematológicos aos compostos bioativos produzidos pela levedura.

A administração de antioxidantes tem demonstrado redução do estresse em peixes, principalmente ao neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROS) e proteger células contra danos oxidativos (Ma *et al.*, 2025). Em estudo conduzido por Aracati *et al.* (2021), foi avaliado o efeito da suplementação com astaxantina em tilápias durante 60 dias. Os autores relataram melhora no perfil leucocitário e trombocitário, além de redução significativa ($p < 0,05$) nos níveis séricos de glicose e triglicerídeos nos peixes suplementados, sugerindo que a astaxantina exerceu efeito protetor, provavelmente por meio de sua atividade antioxidante, contribuindo para uma menor carga de estresse metabólico e melhor resposta imunológica.

Os índices biológicos IHS e IVS são utilizados como indicadores de estado nutricional, do desenvolvimento e do acúmulo de reservas energéticas em peixes, sendo também sensíveis a alterações decorrentes de estresse ou exposição a substâncias tóxicas (Rizzo e Bazzoli, 2020). Enquanto o IHS reflete alterações no fígado, principalmente associadas ao metabolismo de lipídios e proteínas, o IVS relaciona-se ao desenvolvimento de órgãos viscerais e reservas energéticas, podendo ser influenciado pelo tipo de sistema de produção utilizado e por suplementação nutricional (Khanjani, Sharifinia, Hajirezaee, 2022).

No presente estudo, foi verificado que o IHS parcial foi significativamente maior no tratamento AC-L em relação aos demais (Tabela 8), enquanto os valores finais não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$). Esse comportamento sugere que a suplementação com a levedura pode ter estimulado o acúmulo de reservas

hepáticas temporariamente, por efeitos bioativos sobre o metabolismo lipídico e proteico, sem comprometer a homeostase hepática a longo prazo.

Tabela 8 - Médias por tratamento das análises de índices biológicos realizadas nas coletas parcial (dia 28) e final (dia 63) do experimento *in vivo*.

Parâmetro	Tratamento [*]				CV ^{*3} (%)	p ^{*4}
	AC-L (T1)	AC-C (T2)	BFT-L (T3)	BFT-C (T4)		
Índice hepatossomático (%) parcial	2,44 ^b	1,67 ^a	1,78 ^a	1,63 ^a	34,39	0,0122
Índice hepatossomático (%) final	3,09 ^a	2,63 ^a	2,62 ^a	2,83 ^a	13,16	0,2752
Índice viscerossomático (%) parcial	16,16 ^a	17,55 ^a	16,11 ^a	18,56 ^a	20,14	0,2519
Índice viscerossomático (%) final	12,03 ^{ab}	14,66 ^c	10,86 ^a	13,60 ^{bc}	14,88	0,0001

Fonte: de autoria própria, 2025.

CV: coeficiente de variação.

^{*} Tratamentos: AC-L – tanques com AC que receberam ração suplementada com levedura; AC-C – controle tanques com AC; BFT-L – tanques com bioflocos que receberam ração suplementada com levedura; BFT-C – controle tanques com bioflocos.

^{*2} As médias com letras diferentes na mesma linha diferem de acordo com os testes ANOVA e Tukey (CV < 10%) ou Student-Newman-Keuls (CV de 10% – 15%) ou Duncan (CV > 15%) (p < 0,05).

^{*3} Para os parâmetros que foi realizada análise de variância (ANOVA), foi apresentado apenas o coeficiente de variação (CV), por se tratar de uma medida de dispersão relativa, sendo que os dados apresentaram, nesse caso, homoscedasticidade.

^{*4} Valor de p referente à análise de variância (ANOVA) para todos os parâmetros.

Já o IVS final apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, sendo maior nos grupos AC-C e BFT-C, mas ainda dentro das faixas fisiológicas relatadas para tilápias (Khanjani, Sharifinia, Hajirezaee, 2022). Além disso, os valores de IVS apresentaram-se mais elevados na coleta parcial, com redução na coleta final. De modo semelhante ao observado para o IHS, esse padrão indica que, no início do experimento, os peixes apresentaram maior consumo proporcional de ração em função da fase de desenvolvimento que se encontravam – caracterizada por maior crescimento específico (Tabela 6) – o que pode ter estimulado o acúmulo de reservas energéticas temporariamente.

Esse padrão sugere que a administração de ração com *P. brasiliensis* não promoveu aumento excessivo de reservas energéticas hepáticas ou intestinais a longo prazo, mantendo a proporcionalidade orgânica dentro de faixas fisiológicas consideradas normais. Em estudo conduzido por Ribeiro, Marques e Albuquerque (2025), no qual foi administrado fertilizante

ovino associado a probiótico comercial, foi relatado resultado inverso, com aumento do IHS, enquanto o IVS permaneceu dentro dos valores considerados normais. Os autores concluíram que, a depender da substância administrada, pode haver um sítio preferencial para o acúmulo de reserva energética.

Como os índices biológicos permaneceram dentro dos valores esperados e não foram observados efeitos adversos no desempenho zootécnico ou na sobrevivência, não há indícios de inflamação sistêmica, estresse metabólico ou toxicidade. Dessa forma, os dados de IHS e IVS corroboram os resultados das análises de desempenho zootécnico, hematológicas e bioquímicas, indicando manutenção da saúde e adequada condição nutricional dos peixes ao longo do experimento.

As análises microbiológicas foram realizadas a partir do conteúdo intestinal dos peixes utilizando ágar GYMP modificado (suplementado com cloranfenicol), Ágar Sangue e Ágar MacConkey nas coletas parcial e final. Devido às suas diferentes composições e condições de incubação específicas, cada meio selecionou grupos microbianos distintos, permitindo a análise da composição parcial da microbiota intestinal cultivável (Tabela 9).

O Ágar Sangue foi utilizado sob condições microaerofílicas parciais a anaeróbicas, visando o isolamento de bactérias heterotróficas Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cocos e bacilos. Essas condições de incubação tendem a mimetizar o ambiente intestinal dos peixes, que é predominantemente anaeróbico devido à mucosa e ao baixo oxigênio disponível, favorecendo o crescimento de microrganismos que de fato habitam o intestino desses animais e fornecendo uma representação mais próxima da microbiota cultivável presente *in vivo* (Singh *et al.*, 2024). Dessa forma, o meio permitiu o crescimento de grupos bacterianos comuns, e, geralmente, oportunistas – porém não em sua totalidade, já que outros microrganismos não patogênicos também são capazes de crescer sob essas condições –, no intestino de tilápias, a exemplo de *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp. e *Edwardsiella* spp (Huicab-Pech *et al.*, 2016).

O Ágar MacConkey, por sua vez, é amplamente utilizado para amostras advindas de tilápias para o isolamento e quantificação de bactérias Gram-negativas pertencentes, principalmente, à família Enterobacteriaceae, incluindo *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. e *Proteus* spp. (Dias *et al.*, 2024). Essas bactérias são componentes naturais da microbiota intestinal, porém aumentos significativos em suas populações podem estar associados a disbiose ou condições patológicas nesses animais (Ofek *et al.*, 2022). Alguns gêneros oportunistas, como *Aeromonas* spp., também podem crescer nesse meio, embora com menor especificidade.

Tabela 9 - Médias e coeficiente de variação (CV) ou medianas (Q1-Q3) das análises de Log10(UFC/g) de conteúdo intestinal de tilápias-do-Nilo por tratamento realizadas nas coletas parcial (dia 28) e final (dia 63) do experimento *in vivo*, a partir dos meios de cultura ágar sangue e ágar MacConkey.

Parâmetro	Tratamento*				CV* ³ (%)	p** ⁴
	AC-L (T1)	AC-C (T2)	BFT-L (T3)	BFT-C (T4)		
Ágar sangue Log10(UFC/g) coleta parcial	6,54 ^{ab} (5,75 – 6,62)	6,17 ^a (5,67 – 6,32)	6,67 ^b (6,54 – 6,74)	6,16 ^a (5,95 – 6,40)	-	0,0344
Ágar sangue Log10(UFC/g) coleta final	6,36 ^b	5,67 ^a	6,56 ^b	6,41 ^b	4,52	< 0,0001
Ágar MacConkey Log10(UFC/g) coleta parcial	6,18 ^{ab}	5,86 ^a	6,41 ^b	6,14 ^{ab}	6,98	0,0268
Ágar MacConkey Log10(UFC/g) coleta final	6,27 ^{ab} (5,76 – 6,41)	5,24 ^a (4,59 – 5,43)	6,52 ^b (6,21 – 6,67)	6,05 ^{ab} (5,72 – 6,24)	-	0,0124

Fonte: de autoria própria, 2025.

CV: coeficiente de variação; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil.

* Tratamentos: AC-L – tanques com AC que receberam ração suplementada com levedura; AC-C – controle tanques com AC; BFT-L – tanques com bioflocos que receberam ração suplementada com levedura; BFT-C – controle tanques com bioflocos.

**² As médias ou medianas com letras diferentes na mesma linha diferem de acordo com os testes ANOVA e Tukey (CV < 10%) ou Student-Newman-Keuls (CV de 10% – 15%) ou Duncan (CV > 15%) ou de acordo com os testes de Kruskal-Wallis e Conover (p < 0,05).

*³ Para os parâmetros que foi realizada análise de variância (ANOVA), foi apresentado apenas o coeficiente de variação (CV), por se tratar de uma medida de dispersão relativa, sendo que os dados apresentaram, nesse caso, homocedasticidade.

*⁴ Valor de p referente à análise de variância (ANOVA) para todos os parâmetros, com exceção de ágar sangue coleta parcial e ágar MacConkey coleta final, cujo valor de p é referente ao teste de Kruskal-Wallis. Para estes parâmetros, foram apresentadas as médias apenas como referência, já que a análise estatística foi realizada com base nas medianas e ranks.

Já o ágar GYMP modificado, suplementado com cloranfenicol para inibir o crescimento de bactérias, foi utilizado para a seleção e observação de fungos, especialmente de *P. brasiliiana*, incubadas em aerobiose a 25 °C por 72 horas – condições de incubação ideais para crescimento da levedura de interesse.

Ao analisar os resultados quantitativos de UFC/g, transformados para escala logarítmica, foi demonstrada variação entre tratamentos. Apesar dessas diferenças estatísticas, não foram observadas variações superiores a 1 log nas UFC/g, o que indica ausência de disbiose (Martinez-Porchas *et al.*, 2023), ou seja, a administração de *P. brasiliiana* não provocou desequilíbrio da microbiota intestinal dos peixes. Essa estabilidade é desejável em estudos para avaliação de microrganismos com potencial probiótico, em especial de leveduras, cuja ação

geralmente não se manifesta pela eliminação de grupos microbianos, mas pela modulação qualitativa da microbiota e promoção da homeostase intestinal (Sanahuja *et al.*, 2023).

Vale ressaltar que a levedura, alvo principal da suplementação, não apresenta crescimento nos meios Ágar sangue e Ágar MacConkey, por esse motivo não está representada nessas contagens. A recuperação de *P. brasiliiana* foi realizada separadamente em ágar GYMP modificado, que mostrou crescimento lento, característico dessa levedura, e em menor quantidade, possivelmente devido à competição com outros fungos que crescem mais rapidamente e ocupam o espaço físico e consomem nutrientes do meio. Assim, os dados de UFC/g nos meios bacterianos devem ser interpretados separadamente da avaliação da levedura.

Além disso, embora tenham ocorrido diferenças estatísticas entre alguns tratamentos, não foram observadas variações superiores a 1 log nas UFC/g, o que indica ausência de disbiose (Martinez-Porchas *et al.*, 2023), ou seja, a administração de *P. brasiliiana* não provocou desequilíbrio da microbiota intestinal dos peixes. Essa estabilidade é desejável em estudos para avaliação de microrganismos com potencial probiótico, em especial de leveduras, cuja ação geralmente não se manifesta pela eliminação de grupos microbianos, mas pela modulação qualitativa da microbiota e promoção da homeostase intestinal (Sanahuja *et al.*, 2023).

Como citado anteriormente, acredita-se que tenha sido possível recuperar *P. brasiliiana* do conteúdo intestinal em ambas as coletas, parcial e final, a partir do ágar GYMP modificado, ou seja, por meio de análise fenotípica das colônias. Embora as amostras tenham apresentado morfologia e crescimento característicos, a confirmação desses resultados exigiria a realização de uma análise independente de cultivo, como a abordagem metagenômica. Apesar de apresentar crescimento limitado em placa, possivelmente devido à competição com outros fungos, a presença da levedura em amostras advindas de todos os tanques que receberam a ração com a levedura (AC-L e BFT-L) – não tendo sido encontrada em amostras advindas dos grupos AC-C ou BFT-C – indica que o microrganismo foi capaz de colonizar o intestino, mesmo sem atingir altas contagens em placa.

Optou-se por administrar a ração suplementada com levedura uma vez ao dia na primeira alimentação, em conformidade com protocolos observados em outras espécies animais e em humanos, nos quais a administração de probióticos ocorre geralmente em dose única diária (World Gastroenterology Organisation, 2011). A primeira alimentação foi selecionada por corresponder ao momento de maior ingestão alimentar pelos peixes, caracterizando-se por ausência de sobras, conforme observado durante todo o período pré-experimental e experimental.

Embora, em teoria, possa haver risco de ingestão desigual entre os peixes devido a efeitos hierárquicos ou de dominância (Mushtaq, 2024), observações sistemáticas indicaram que todos os peixes consumiram a ração distribuída. Tal resultado foi favorecido pela densidade populacional adequada e pelo espaço disponível nos tanques (600 L úteis com diâmetro de aproximadamente 150 cm), o que tornou possível a distribuição uniforme da ração na superfície. A quantidade fornecida foi calculada com base no peso estimado dos peixes, com suplementação *ad libitum* até que todos os peixes estivessem visivelmente saciados. Além disso, considerando a realização de três tratos diários, todos os indivíduos tiveram oportunidade regular de ingestão, minimizando os impactos da competição sobre a absorção do probiótico.

Em relação às análises histológicas, a avaliação do intestino evidenciou variações significativas ($p < 0,05$) na altura das vilosidades (Tabela 10), especialmente na coleta final, com os tratamentos AC-C e BFT-C apresentando maiores valores, enquanto os tratamentos AC-L e BFT-L exibiram alturas intermediárias. As larguras das vilosidades e do epitélio intestinal não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos ou coletas ($p > 0,05$). Observacionalmente, a mucosa intestinal manteve-se íntegra, sem sinais de lesão ou inflamação, indicando boa saúde intestinal (Figura 13). A variação observada na altura das vilosidades possivelmente reflete uma resposta adaptativa normal ao sistema de cultivo, sem evidências de prejuízo estrutural ou funcional da mucosa intestinal.

O fígado apresentou intensa vacuolização de glicogênio (Figura 14), acompanhada de inclusões lipídicas discretas a moderadas (Figura 14) e focos de necrose raros (Figura 15). Tais características foram observadas em todas as coletas e tratamentos, evidenciando boa condição nutricional e metabólica dos peixes, sem sinais de comprometimento patológico.

Quando a ingestão energética supera as demandas metabólicas, seja de crescimento, reprodução ou outras necessidades fisiológicas, o fígado dos peixes tende a armazenar o excesso de energia sob a forma de glicogênio e/ou lipídios no citoplasma dos hepatócitos (Figura 14). Esse acúmulo é um fenômeno comum em peixes mantidos em cativeiro, que geralmente recebem dietas altamente energéticas e apresentam menor gasto energético. Histologicamente, esse processo se manifesta pela vacuolização citoplasmática dos hepatócitos, observada em diferentes graus de intensidade e normalmente associada a um bom estado nutricional, não sendo indicativo, por si só, de alteração patológica (Wolf *et al.*, 2015).

Tabela 10 - Médias ou medianas (Q1-Q3) das análises histológicas das vilosidades intestinais e do epitélio intestinal dos peixes por tratamento realizadas nas coletas parcial (dia 28) e final (dia 63) do experimento *in vivo*.

Parâmetro	Tratamento*				CV* ³ (%)	p* ⁴
	AC-L (T1)	AC-C (T2)	BFT-L (T3)	BFT-C (T4)		
Altura vilosidade (µm) coleta parcial	190 ^a	240 ^b	190 ^a	210 ^{ab}	22,07	0,0451
Altura vilosidade (µm) coleta final	310 ^{ab} (270 – 340)	450 ^c (380 – 550)	240 ^a (170 – 310)	370 ^{bc} (260 – 520)	-	0,001152
Largura vilosidade (µm) coleta parcial	110 ^a	110 ^a	110 ^a	110 ^a	16,44	0,9426
Largura vilosidade (µm) coleta final	140 ^a	150 ^a	140 ^a	140 ^a	17,17	0,5924
Largura epitélio intestinal (µm) coleta parcial	42,15 ^a	50,25 ^a	43,91 ^a	46,13 ^a	16,77	0,0813
Largura epitélio intestinal (µm) coleta final	57,67 ^a	59,89 ^a	58,72 ^a	57,88 ^a	19,34	0,9649

Fonte: de autoria própria, 2025.

CV: coeficiente de variação; Q1: primeiro quartil; Q3: terceiro quartil.

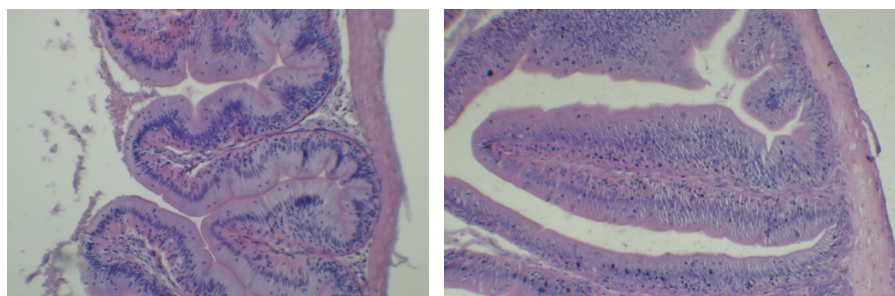
* Tratamentos: AC-L – tanques com AC que receberam ração suplementada com levedura; AC-C – controle tanques com AC; BFT-L – tanques com bioflocos que receberam ração suplementada com levedura; BFT-C – controle tanques com bioflocos.

*² As médias ou medianas com letras diferentes na mesma linha diferem de acordo com os testes ANOVA e Tukey (CV < 10%) ou Student-Newman-Keuls (CV de 10% – 15%) ou Duncan (CV > 15%) ou de acordo com os testes de Kruskal-Wallis e Conover (p < 0,05).

*³ Para os parâmetros que foi realizada análise de variância (ANOVA), foi apresentado apenas o coeficiente de variação (CV), por se tratar de uma medida de dispersão relativa, sendo que os dados apresentaram, nesse caso, homocedasticidade.

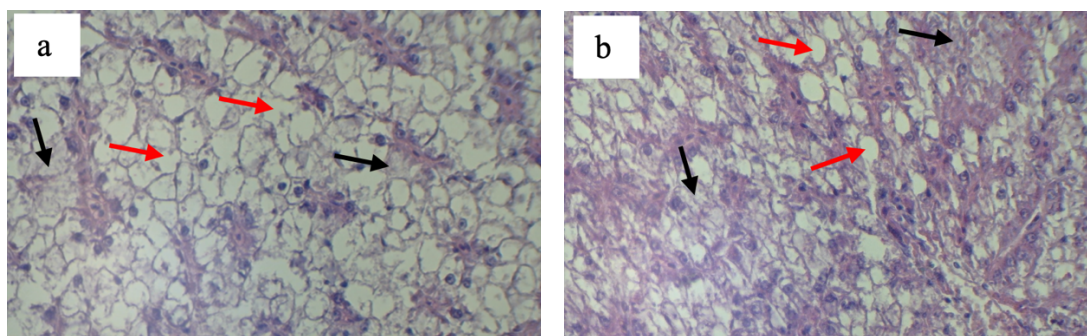
*⁴ Valor de p referente à análise de variância (ANOVA) para todos os parâmetros, com exceção de altura vilosidade coleta final, cujo valor de p é referente ao teste de Kruskal-Wallis. Para estes parâmetros, foram apresentadas as médias apenas como referência, já que a análise estatística foi realizada com base nas medianas e ranks.

Figura 13 – Micrografias ópticas de cortes histológicos intestinais (aumento x20) - demonstração da integridade da mucosa.



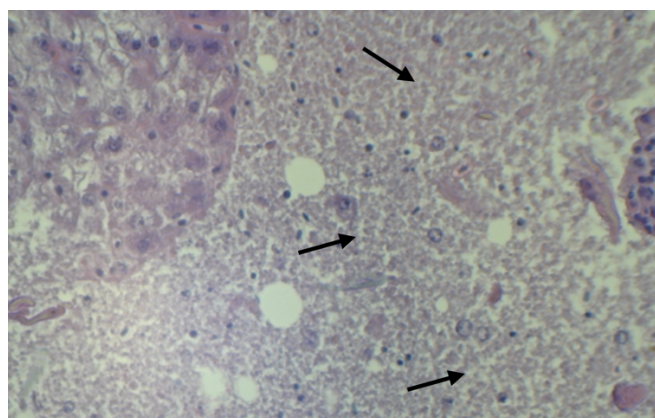
Fonte: acervo pessoal (micrografia registrada a partir do programa S-Eye), 2025.

Figura 14 - Micrografias ópticas de cortes histológicos hepáticos (aumento x40) - (a; b) inclusões de glicogênio (seta preta) e lipídicas (seta vermelha).



Fonte: acervo pessoal (micrografia registrada a partir do programa S-Eye), 2025.

Figura 15 - Micrografia óptica de corte histológico hepático (aumento x40) - foco de necrose (seta preta).

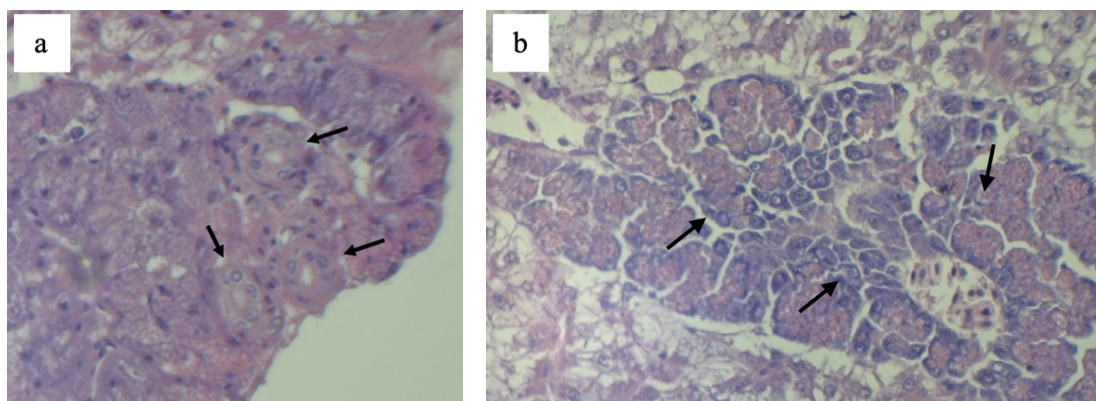


Fonte: acervo pessoal (micrografia registrada a partir do programa S-Eye), 2025.

O exame histológico hepático incluiu a observação de ductos biliares (Figura 16a) e o hepatopâncreas (Figura 16b), órgão contínuo em peixes que reúne fígado e pâncreas, permitindo avaliar a secreção de enzimas digestivas a partir da sua porção exócrina (Breccia, *et al.*, 2022). As inclusões de glicogênio e lipídios foram claramente observadas, fornecendo parâmetros visuais para a avaliação da condição metabólica e nutricional.

Em conjunto, os achados histológicos indicam uma estrutura intestinal adaptada e fígado metabolicamente ativo, com ausência de alterações patológicas significativas, reforçando os dados de hematológicos, de IHS e de IVS. A manutenção de vilosidades e integridade epitelial, associada à vacuolização hepática normal, sugere que tanto os sistemas de produção quanto a suplementação com levedura contribuíram para o equilíbrio intestinal, digestivo e metabólico das tilápias ao longo do experimento.

Figura 16 - Micrografia óptica de corte histológico hepático (aumento x40) – (a) ductos biliares (seta preta) e (b) hepatopâncreas (seta preta).



Fonte: acervo pessoal (micrografia registrada a partir do programa S-Eye), 2025.

A análise da coloração do filé, expressa pelas coordenadas L^* , a^* e b^* , evidenciou diferenças significativas entre os tratamentos na coleta final (Tabela 11; Figuras 17 e 18). O parâmetro L^* ($p < 0,05$), que representa a luminosidade do filé, apresentou valores mais elevados no tratamento BFT-C, indicando filés mais claros, enquanto os tratamentos AC-L e BFT-L apresentaram valores intermediários. Já o parâmetro a^* , relacionado à intensidade do vermelho, foi maior ($p < 0,05$) nos filés de peixes suplementados com levedura (AC-L e BFT-L) em comparação aos controles, sugerindo uma coloração avermelhada mais intensa (Figura 19). O parâmetro b^* , associado à tonalidade amarelada, não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre tratamentos, indicando uniformidade nessa dimensão da cor.

A intensificação da coloração avermelhada nos grupos AC-L e BFT-L pode ser explicada pela capacidade de *P. brasiliensis* de produzir astaxantina, pigmento alaranjado antioxidante produzido por algumas leveduras, e outros carotenoides capazes de se acumular nos tecidos musculares de peixes e reforçar a coloração natural. Em estudo com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Rahman *et al.*, 2016), foi observado que dietas contendo 0, 50, 75 e 100 mg/kg de astaxantina durante 10 semanas resultaram em redução do valor L^* (luminosidade) e aumento dos valores a^* (vermelho) e b^* (amarelo) no músculo dos peixes. Isto é, os músculos tornaram-se mais escuros e mais avermelhados/amarelados com a suplementação de astaxantina. Além disso, embora a taxa de crescimento não tenha sido significativamente diferente entre os grupos, o conteúdo de astaxantina no músculo aumentou com a dose dietética, evidenciando que o pigmento incorporado modificou a coloração tecidual.

Tabela 11 - Médias ou medianas das análises de cor do filé por tratamento realizadas na coleta final (dia 63) do experimento in vivo, a partir das coordenadas L*, a* e b*.

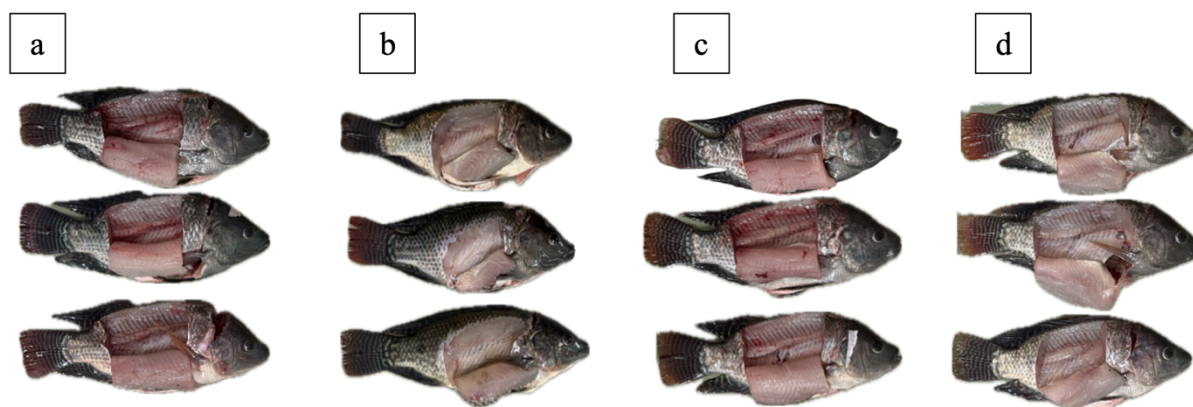
Parâmetro	Tratamento ^{I,II}				CV (%)
	AC-L (T1)	AC-C (T2)	BFT-L (T3)	BFT-C (T4)	
L*	56,27 ^b	53,85 ^c	56,72 ^{ab}	57,38 ^a	5,94
a*	11,40 ^c	10,47 ^d	13,65 ^a	13,11 ^b	21,02
b*	7,51 ^a	8,16 ^a	6,98 ^a	7,21 ^a	15,81

Fonte: de autoria própria, 2025.

^I Tratamentos: AC-L – tanques com AC que receberam ração suplementada com levedura; AC-C – controle tanques com AC; BFT-L – tanques com bioflocos que receberam ração suplementada com levedura; BFT-C – controle tanques com bioflocos.

^{II} As médias com letras diferentes na mesma linha diferem de acordo com os testes ANOVA e Tukey (CV < 10%) ou Student-Newman-Keuls (CV de 10% – 15%) ou Duncan (CV > 15%) (p < 0,05).

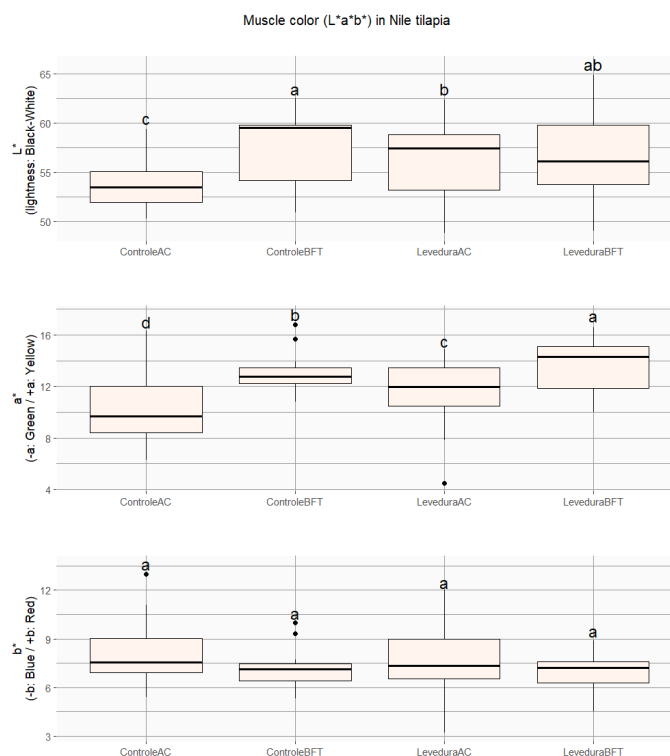
Figura 17 - Imagens analisadas para análise da coloração dos filés; peixes pertencentes aos grupos de tratamento (a) AC-L, (b) AC-C, (c) BFT-L e (d) BFT-C.



Fonte: acervo pessoal, 2025.

Outro estudo, realizado com o coral grouper *Plectropomus leopardus* (Zhang *et al.*, 2023), avaliou os efeitos de astaxantina natural e sintética em filés de peixe, no qual foi demonstrado que, embora a luminosidade (L*) não tenha sido alterada de forma significativa pelos tratamentos, os valores de a* e b* foram significativamente maiores nos peixes que receberam dietas suplementadas com astaxantina em relação ao grupo controle. Ademais, também foi realizada análise de transcriptoma e metaboloma, identificando genes associados ao metabolismo de carotenoides e deposição de pigmentos – reforçando o papel da astaxantina na coloração muscular dos peixes.

Figura 18 - Gráficos das análises de cor do filé realizadas na coleta final (dia 63) do experimento *in vivo*, a partir das coordenadas L^* , a^* e b^* .



Fonte: de autoria própria, 2025.

Esses resultados indicam que a suplementação com levedura influencia principalmente a tonalidade vermelha do filé, enquanto a luminosidade e a coloração amarelada parecem mais afetadas pelo sistema de criação ou pelo tratamento controle. Mesmo estando presente em menor quantidade relativa que outros carotenoides, como o fitoeno e β -caroteno, observa-se que a astaxantina contribui de maneira preponderante para a capacidade antioxidativa total da levedura.

Ademais, os resultados das análises de atividade antioxidativa total, como a partir do branqueamento do β -caroteno, reforçam essa correlação, pois indicam que a levedura utilizada possui capacidade antioxidativa significativa, sugerindo que a intensidade da cor avermelhada nos filés não apenas está associada à deposição de pigmentos, mas também à contribuição antioxidativa da levedura, que pode proteger os carotenoides da degradação durante o metabolismo e incorporação nos tecidos musculares.

Sendo assim, a análise da cor do filé não apenas descreve diferenças sensoriais potenciais, de interesse industrial, mas também reflete o efeito da dieta sobre a deposição de pigmentos bioativos no tecido muscular, reforçando a aplicabilidade de compostos microbianos antioxidantes na intensificação da coloração de organismos aquáticos.

6 CONCLUSÕES

Os estudos *in vitro* demonstraram que as três linhagens da levedura *P. brasiliiana* são seguras, não tendo produzido enzimas associadas a fatores de virulência, possui tolerância aos sais biliares e sensibilidade aos principais antifúngicos de primeira escolha. Além disso, possui potencial biotecnológico, com perfil de produção de antioxidantes interessante, incluindo astaxantina, β -caroteno e fitoeno, indicando que pode ser explorada em aplicações laboratoriais sem riscos à saúde ou à viabilidade celular.

Em relação aos métodos de preparo do microrganismo suplementado na ração, o *spray coating* mostrou-se o mais adequado para ensaios experimentais em peixes, preservando a viabilidade microbiana, mantendo a estabilidade da ração e oferecendo uma solução prática e escalável para uso rotineiro em laboratórios de pesquisa, principalmente pela ausência de processamento anterior à inclusão na ração, minimizando perdas pela aplicação direta *in natura*.

Em contraste, as técnicas de microencapsulamento, liofilização e *spray drying*, embora comumente empregadas em ambientes industriais, apresentaram limitações significativas em pequena escala relacionadas à recuperação microbiana, complexidade de manuseio e rendimento de biomassa – as simulações realizadas indicaram que as quantidades de material necessárias para conduzir experimentos em escala laboratorial seriam excessivamente altas ao se utilizar esses métodos.

O experimento *in vivo* com as tilápias-do-Nilo indicou resultados satisfatórios em desempenho zootécnico e análises hematológicas, com impacto positivo de *P. brasiliiana* nos biomarcadores de estresse quando comparados aos seus respectivos controles, sendo plausível que esses efeitos estejam relacionados à astaxantina produzida pela levedura. Além disso, os índices biológicos e dados histológicos hepáticos e intestinais apresentaram-se dentro da normalidade. Colônias características da levedura foram detectadas em ambas as coletas, demonstrando que o microrganismo resistiu ao processamento, armazenamento e consumo, estabelecendo-se de forma transitória, provavelmente, na microbiota intestinal sem causar disbiose.

A análise da cor do filé confirmou a atividade de produção de antioxidantes pigmentados (astaxantina e β -caroteno) pela levedura e sua absorção via ração, evidenciando a intensificação visível e estatisticamente significativa da coloração avermelhada (a^*) nos grupos suplementados com *P. brasiliiana*.

Em suma, a linhagem *P. brasiliiana* UFMG-CM-Y6497 mostrou-se segura e biotecnologicamente promissora, com benefícios observáveis na saúde e pigmentação das tilápias, não tendo sido observadas diferenças significativas entre os sistemas quanto ao

aproveitamento dos efeitos da levedura administrada. Estudos futuros devem explorar as doses seguras para administração da levedura, avaliando se há efeito dose-dependente, principalmente nos parâmetros relacionados à astaxantina, como a cor do filé produzido, além de investigar sua aplicação em sistemas de produção de larga escala, contribuindo para a otimização da aquicultura com o uso de microrganismos funcionais.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-HACK, M. E.; EL-SAADONY, M. T.; NADER, M. M.; SALEM, H. M.; EL-TAHAN, A. M.; SOLIMAN, S. M.; KHAFAGA, A. F. Effect of environmental factors on growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Biometeorology**, [s. l.], v. 66, n. 11, p. 2183–2194, 2022.
- ABD EL-NABY, A. S.; EL ASELY, A. M.; HUSSEIN, M. N.; KHATTABY, A. E.-R. A.; SABRY, E. A.; ABDELSALAM, M.; SAMIR, F. Effects of dietary fermented *Saccharomyces cerevisiae* extract (Hilyses) supplementation on growth, hematology, immunity, antioxidants, and intestinal health in Nile tilapia. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 12583, 2024.
- ABDEL-TAWWAB, M.; OMAR, A. A.; KHALIL, R. H.; SELEMA, T. A. M. A.; ELSAMANOUDY, Salma. I.; EL-SAFTAWY, H. A. M.; SABRY, E. A.; FAWZY, R. M.; ABDEL-RAZEK, N. Influences of thermal stress on the growth biometrics, stress indicators, oxidative stress biomarkers, and histopathological alterations in European seabass, *Dicentrarchus labrax*, juveniles. **Fish Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 70, 2025.
- ABREU, JS.; MARZOCCHI-MACHADO, CM.; URBACZEK, AC.; FONSECA, LM.; URBINATI, EC. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 1133–1139, 2009.
- ABU-ELALA, N. M.; ALI, T. E.-S.; RAGAA, N. M.; ALI, S. E.; ABD-ELSALAM, R. M.; YOUNIS, N. A.; ABDEL-MONEAM, D. A.; HAMDEN, A. H.; BONATO, M.; DAWOOD, M. A. O. Analysis of the Productivity, Immunity, and Health Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Broodstock-fed Dietary Fermented Extracts Sourced from *Saccharomyces cerevisiae* (Hilyses): A Field Trial. **Animals**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 815, 2021.
- ABU-ELALA, N.; MARZOUK, M.; MOUSTAFA, M. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 21–29, 2013.
- ACUFF, H. L.; ALDRICH, C. G. Effects of extrusion specific mechanical energy and dryer conditions on the survival of *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 for commercial pet food applications. **Animal Feed Science and Technology**, v. 290, p. 115290, ago. 2022.
- AGBOOLA, J. O.; ROCHA, S. D. C.; MENSAH, D. D.; HANSEN, J. Ø.; ØYÅS, O.; LAPEÑA, D.; MYDLAND, L. T.; ARNTZEN, M. Ø.; HORN, S. J.; ØVERLAND, M. Effect of yeast species and processing on intestinal microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed soybean meal-based diets in seawater. **Animal Microbiome**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 21, 2023.
- AHMAD, I.; BABITHA RANI, A. M.; VERMA, A. K.; MAQSOOD, M. Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. **Aquaculture International**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 1215–1226, 2017.
- AHMAD.H, I.; VERMA, A. K.; BABITHA RANI, A. M.; RATHORE, G.; SAHARAN, N.; GORA, A. H. Growth, non-specific immunity and disease resistance of *Labeo rohita* against

Aeromonas hydrophila in biofloc systems using different carbon sources. **Aquaculture**, [s. l.], v. 457, p. 61–67, 2016.

ALKALBANI, N. S.; OSAILI, T. M.; AL-NABULSI, A. A.; OLAIMAT, A. N.; LIU, S.-Q.; SHAH, N. P.; APOSTOLOPOULOS, V.; AYYASH, M. M. Assessment of Yeasts as Potential Probiotics: A Review of Gastrointestinal Tract Conditions and Investigation Methods. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 365, 2022.

ALVARENGA, É. R. de; ALVES, G. F. de O.; FERNANDES, A. F. A.; COSTA, G. R.; DA SILVA, M. A.; TEIXEIRA, E. de A.; TURRA, E. M. Moderate salinities enhance growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings in the biofloc system. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 49, n. 9, p. 2919–2926, 2018.

ALVAREZ, S. C. V.; PENDÓN, M. D.; BENGEOA, A. A.; LEIVA ALANIZ, M. J.; MATURANO, Y. P.; GARROTE, G. L. Probiotic Potential of Yeasts Isolated from Fermented Beverages: Assessment of Antagonistic Strategies Against *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 878, 2024.

ALY, S. M.; FATHI, M. Advancing aquaculture biosecurity: a scientometric analysis and future outlook for disease prevention and environmental sustainability. **Aquaculture International**, v. 32, n. 7, p. 8763–8789, 3 dez. 2024.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. **Gelatin Hydrolysis Test Protocol**. [s.l: s.n.].

AMILLANO-CISNEROS, J. M.; FUENTES-VALENCIA, M. A.; LEYVA-MORALES, J. B.; SAVÍN-AMADOR, M.; MÁRQUEZ-PACHECO, H.; BASTIDAS-BASTIDAS, P. de J.; LEYVA-CAMACHO, L.; DE LA TORRE-ESPINOSA, Z. Y.; BADILLA-MEDINA, C. N. Effects of Microorganisms in Fish Aquaculture from a Sustainable Approach: A Review. **Microorganisms**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 485, 2025.

AMOAHA, K.; TAN, B.; ZHANG, S.; CHI, S.; YANG, Q.; LIU, H.; YANG, Y.; ZHANG, H.; DONG, X. Host gut-derived *Bacillus* probiotics supplementation improves growth performance, serum and liver immunity, gut health, and resistive capacity against *Vibrio harveyi* infection in hybrid grouper (♀*Epinephelus fuscoguttatus* × ♂*Epinephelus lanceolatus*). **Animal Nutrition**, [s. l.], v. 14, p. 163–184, 2023.

ANEE, I. J.; ALAM, S.; BEGUM, R. A.; SHAHJAHAN, R. M.; KHANDAKER, A. M. The role of probiotics on animal health and nutrition. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 52, 2021.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos**. [s.l: s.n.].

APPANA, B.; QUEEN, N. J.; CAO, L. Protocol to minimize the confounding effect of cold stress on socially isolated mice using thermoneutral housing. **STAR Protocols**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 102533, 2023.

APHA (American Public Health Association). (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. **American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation**.

ARACATI, M. F.; OLIVEIRA, S. L.; RODRIGUES, L. F.; COSTA, C. C.; CONDE, G.; CAVALLI, B. J.; SILVA, H. C. P.; IBELLI, B. C. C.; SCARABEL, V. L.; SILVA, I. C.; BELO, M. A. A. Effect of dietary supplementation with astaxanthin on the hematological and biochemical response of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ars Veterinaria**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 285–291, 2021.

ARACATI, M. F.; RODRIGUES, L. F.; DE OLIVEIRA, S. L.; RODRIGUES, R. A.; CONDE, G.; CAVALCANTI, E. N. F.; BORBA, H.; CHARLIE-SILVA, I.; FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; DE ANDRADE BELO, M. A. Astaxanthin improves the shelf-life of tilapia fillets stored under refrigeration. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 102, n. 10, p. 4287–4295, 2022.

ARISTOTELI, L. P.; WILLCOX, M. D. P. Mucin Degradation Mechanisms by Distinct *Pseudomonas aeruginosa* Isolates *In Vitro*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 71, n. 10, p. 5565–5575, 2003.

ASHA, A. A.; HAQUE, M. M.; HOSSAIN, Md. K.; HASAN, Md. M.; BASHAR, A.; HASAN, Md. Z.; SHOHAN, M. H.; FARIN, N. N.; SCHNEIDER, P.; BABLEE, A. L. Effects of Commercial Probiotics on the Growth Performance, Intestinal Microbiota and Intestinal Histomorphology of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Reared in Biofloc Technology (BFT). **Biology**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 299, 2024.

ASLINIA, F.; MAZZA, J. J.; YALE, S. H. Megaloblastic Anemia and Other Causes of Macrocytosis. *Clinical Medicine & Research*, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 236–241, 2006.

ASSOCIAÇÃO CEARENSE DE AQUICULTORES (ACEAQ). **Manual de boas práticas de manejo na tilapicultura em tanques redes no Ceará**. Fortaleza. 2013.

AVNIMELECH, Y. (2006). Bio-filters: The need for an new comprehensive approach. **Aquacultural Engineering**, 34(3), 172–178.

AVNIMELECH, Y. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. **Aquaculture**, v. 264, n. 1–4, p. 140–147, abr. 2007.

AVNIMELECH, Y. Biofloc technology. **A practical guide book**. [s.l.] : The World Aquaculture Society, 2009.

AVNIMELECH, Y. Biofloc technology – A Practical Guide Book: Control os microbial activity in aquaculture systems: active suspension ponds. 2º ed. [s.l.]: **The World Aquaculture Society**, 2012.

AZIM, M. E.; LITTLE, D. C. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 283, n. 1–4, p. 29–35, out. 2008.

BALLA, K. M.; LUGO-VILLARINO, G.; SPITSBERGEN, J. M.; STACHURA, D. L.; HU, Y.; BAÑUELOS, K.; ROMO-FEWELL, O.; AROIAN, R. V.; TRAVER, D. Eosinophils in the zebrafish: prospective isolation, characterization, and eosinophilia induction by helminth determinants. **Blood**, [s. l.], v. 116, n. 19, p. 3944–3954, 2010.

BAVIA, L.; DA SILVA, A. P.; CARNEIRO, M. C.; KMECICK, M.; POZZAN, R.; ESQUIVEL-MUELBERT, J.; ISAAC, L.; PRODOCIMO, M. M. Health status biomarkers

and hemato-biochemical indices in Nile tilapia. **Comparative Immunology Reports**, [s. l.], v. 7, p. 200168, 2024.

BELLINATE, B. K. A., FARIAS, K. N. N., SILVA, A. L. do Nascimento, SIQUEIRA, M. S., POVH, J. A., FRANCO-BELUSSI, L., & FERNANDES, C. E. (2023). Intestinal morphometry and cell density features in tropical farmed fish: A methodological approach. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, 52(3), 448–459.

BENDSCHNEIDER, K., & ROBINSON, R. J. (1952). A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. **Journal of Marine Research**, 11, 87–96.

BENTZON-TILIA, M.; SONNENSCHNEIN, E. C.; GRAM, L. Monitoring and managing microbes in aquaculture – Towards a sustainable industry. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 576–584, 24 set. 2016.

BERTOLO, A. P., BIZ, A. P., KEMPKA, A. P., RIGO, E., & CAVALHEIRO, D. (2019). Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): evaluation of cellular disruption processes, chemical composition, functional properties and digestibility. **Journal of Food Science and Technology**, 56(8), 3697–3706.

BITTENCOURT, N. D. L. R.; MOLINARI, L. M.; SCOARIS, D. D. O.; PEDROSO, R. B.; NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. U.; ABREU FILHO, B. A. De; DIAS FILHO, B. P. Valores hematológicos e bioquímicos em tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* cultivada em sistema semi-intensivo. Acta Scientiarum. **Biological Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 2, 2003.

BOLLA, P. A., SERRADELL, M. de los Angeles, de URRAZA, P. J., & DE ANTONI, G. L. (2011). Effect of freeze-drying on viability and *in vitro* probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. **Journal of Dairy Research**, 78(1), 15–22.

BOWSER, P. R.; WOOSTER, G. A.; GETCHELL, R. G.; TIMMONS, M. B. *Streptococcus iniae* Infection of Tilapia *Oreochromis niloticus* in a Recirculation Production Facility. **Journal of the World Aquaculture Society**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 335–339, 1998.

BOYD, C. E. Prof. Boyd: Proper management most important aspect of aquaculture pond water quality management. **Global Seafood Alliance**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://www.globalseafood.org/advocate/dissolved-oxygen-dynamics/?utm_source=chatgpt.com>. Acesso em: 8 nov. 2025.

BRANDE, M. da R.; SANTOS, D. F. L.; FIALHO, N. S.; PROENÇA, D. C.; OJEDA, P. G.; GODÓI, F. C. M.; ROUBACH, R.; BUENO, G. W. Economic and financial risks of commercial tilapia cage culture in a neotropical reservoir. **Heliyon**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. e16336, 2023.

BRECCIA, A.; PALMIERI, M. A.; DI YORIO, M. P.; BATTISTA, A. G.; VISSIO, P. G.; PÉREZ SIRKIN, D. I. Anatomy and histology of the digestive tract and immunolocalization of Npy (orexigenic peptide) in the fish *Cichlasoma dimerus* (Cichliformes: Cichlidae). **Revista de Biología Tropical**, [s. l.], v. 70, n. 1, 2022.

BRENDLER, T.; WILLIAMSON, E. M. Astaxanthin: How much is too much? A safety review. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 12, p. 3090–3111, dez. 2019.

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. **Carotenoids Handbook**. Basel, Switzerland: Birkhauser Publishing, 2004.

BUBPHASAWAN, S.; SANSATCHANON, K.; PROMDONKOY, P.; WATCHARAWIPAS, A.; TANAPONGPIPAT, S.; KHAMWACHIRAPITHAK, P.; RUNGUPHAN, W.; KOCHARIN, K. Sustainable β -carotene production by engineered *S. cerevisiae* using sucrose and agricultural by-products. **Bioresources and Bioprocessing**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 96, 2025.

CAMMAROTA, M.; DE ROSA, M.; STELLAVATO, A.; LAMBERTI, M.; MARZAIOLI, I.; GIULIANO, M. In vitro evaluation of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 12028 as a probiotic: Emphasis on innate immunity. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 135, n. 2, p. 90–98, 2009.

CAO, J.; WANG, W. Effects of astaxanthin and esterified glucomannan on hematological and serum parameters, and liver pathological changes in broilers fed aflatoxin- <scp>B</scp> 1-contaminated feed. **Animal Science Journal**, [s. l.], v. 85, n. 2, p. 150–157, 2014.

CARDONA, E.; GUEGUEN, Y.; MAGRÉ, K.; LORGEUX, B.; PIQUEMAL, D.; PIERRAT, F.; NOGUIER, F.; SAULNIER, D. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 157, 2016.

CAVALCANTE, D. D. H.; LIMA, F. R. D. S.; REBOUÇAS, V. T.; SÁ, M. V. do C. Integration between bioflocs and periphyton in Nile tilapia culture tanks. **Acta Scientiarum. Technology**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 601, 2017.

CHANDRALEKHA, A., RANI, A., TAVANANDI, H. A., AMRUTHA, N., HEBBAR, U., & RAGHAVARAO, K. S. M. S. (2017). Role of carrier material in encapsulation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by spray drying. **Drying Technology**, 35(8), 1029–1042.

CHANG-FUNG-MARTEL, J.; HARRISON, M. T.; BROWN, J. N.; RAWNSLEY, R.; SMITH, A. P.; MEINKE, H. Negative relationship between dry matter intake and the temperature-humidity index with increasing heat stress in cattle: a global meta-analysis. **International Journal of Biometeorology**, [s. l.], v. 65, n. 12, p. 2099–2109, 2021.

CHEN, Y.-J.; ZHANG, T.-Y.; CHEN, H.-Y.; LIN, S.-M.; LUO, L.; WANG, D.-S. Simultaneous stimulation of glycolysis and gluconeogenesis by feeding in the anterior intestine of the omnivorous GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Biology Open**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 818–824, 2017.

CLSI. (2017). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m27/>

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pes- quisa científica / Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**. Brasília: [s.n.].

COSTA, R. A.; CONDE AMORIM, L. M. M.; ARAÚJO, R. L.; SILVA DOS FERNANDES VIEIRA, R. H. Multiple enzymatic profiles of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from oysters. **Revista Argentina de Microbiología**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 267–270, 2013.

COUTINHO, J. O. P. A.; PEIXOTO, T. S.; DE MENEZES, G. C. A.; CARVALHO, C. R.; OGAKI, M. B.; GOMES, E. C. Q.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H.; ARANTES, R. M. E.; NICOLI, J. R.; TIAGO, F. C. P.; MARTINS, F. S. *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of the Probiotic Potential of Antarctic Yeasts. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1338–1354, 2021.

COUTO JUNIOR, E. de B. (2009). **Abordagem não-paramétrica para cálculo do tamanho da amostra com base em questionários ou escalas de avaliação na área de saúde** [Universidade de São Paulo]. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5144/tde-22022010-175431/>

CUI, N.; PERRÉ, P.; MICHIELS, E.; POZZOBON, V. A Novel Strategy to Enhance Antioxidant Content in *Saccharomyces Cerevisiae* Based on Oxygen Pressure. **Bioengineering**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 246, 2023.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 767–778, 2007.

DAVANI-DAVARI, D.; NEGAHDARIPOUR, M.; KARIMZADEH, I.; SEIFAN, M.; MOHKAM, M.; MASOUMI, S.; BERENJIAN, A.; GHASEMI, Y. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. **Foods**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 92, 2019.

DAWOOD, M. A. O.; EWEEDAH, N. M.; MOUSTAFA, E. M.; SHAHIN, M. G. Synbiotic Effects of *Aspergillus oryzae* and β -Glucan on Growth and Oxidative and Immune Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 172–183, 2020.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 13, p. 5062–5072, 2007.

DEFAIX, R.; LOKESH, J.; CALO, J.; BIASUTTI, S.; SURGET, A.; TERRIER, F.; SOENGAS, J. L.; PANSEERAT, S.; RICAUD, K. Rapid adaptation of the rainbow trout intestinal microbiota to the use of a high-starch 100% plant-based diet. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 371, 2024.

DI BELLA, S.; MARINI, B.; STROFFOLINI, G.; GEREMIA, N.; GIACOBBE, D. R.; CAMPANILE, F.; BARTOLETTI, M.; ALLOISIO, G.; DI RISIO, L.; VIGLIETTI, G.; PRINCIPE, L.; COSTANTINO, V.; Buseti, M.; ZERBATO, V.; MEARELLI, F.; BIOLO, G.; NUNNARI, A.; CAFIERO, C. M.; DI MASI, A. The virulence toolkit of *Staphylococcus aureus*: a comprehensive review of toxin diversity, molecular mechanisms, and clinical implications. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s. l.], v. 44, n. 8, p. 1797–1816, 2025.

DI RIENZO, J. A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M. G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C. W. InfoStat, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, 2015. Disponível em: <<http://www.infostat.com.ar>>. Acesso em: 30 out. 2025.

DIAS, S. D. C.; COSTA, L. R. M.; BUIATTE, A. B. G.; COSSI, M. V. C.; NERO, L. A.; YAMATOGLI, R. S.; BERSOT, L. dos S.; PEREIRA, J. G. *Escherichia coli* as a sentinel in

the assessment of antimicrobial resistance in the tilapia production chain: from production environment to the final product. **Frontiers in Antibiotics**, [s. l.], v. 3, 2024.

DUCHE, R. T.; SINGH, A.; WANDHARE, A. G.; SANGWAN, V.; SIHAG, M. K.; NWAGU, T. N. T.; PANWAR, H.; EZEUGU, Lewis. I. Antibiotic resistance in potential probiotic lactic acid bacteria of fermented foods and human origin from Nigeria. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 142, 2023.

DUFOSSÉ, L. Microbial Production of Food Grade Pigments. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 313–321, 2006.

EBELING, J. M.; TIMMONS, M. B.; BISOGNI, J. J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. **Aquaculture**, [s. l.], v. 257, n. 1–4, p. 346–358, 2006.

EIDAROOS, N. H.; ALGAMMAL, A. M.; MOHAMADEN, W. I.; ALENZI, A. M.; ALGHAMDI, S.; KABRAH, A.; EL-MAHALLAWY, H. S.; EID, H. M.; ALGWAD, A. A.; ASFOR, S. A.; NEUBAUER, H.; MOAWAD, A. A.; EL-TARABILI, R. M. Virulence traits, agr typing, multidrug resistance patterns, and biofilm ability of MDR *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical mastitis in dairy cows. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 155, 2025.

EKASARI, J.; CRAB, R.; VERSTRAETE, W. Primary Nutritional Content of Bio-Flocs Cultured with Different Organic Carbon Sources and Salinity. HAYATI **Journal of Biosciences**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 125–130, 2010.

EL-GANINY, A. M.; E. YOSSEF, N.; A. KAMEL, H. Prevalence and antifungal drug resistance of nosocomial *Candida* species isolated from two university hospitals in Egypt. **Current Medical Mycology**, [s. l.], 2021.

EL-SAYED. **Tilapia culture**. UK: CABI Publishing, 2006.

ELWAN, H. A. M.; ELNESR, S. S.; ABDALLAH, Y.; HAMDY, A.; EL-BOGDADY, A. H. Red yeast (*Phaffia rhodozyma*) as a source of Astaxanthin and its impacts on productive performance and physiological responses of poultry. **World's Poultry Science Journal**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 273–284, 2019.

EMAM, W.; LAMBERT, H.; BROWN, C. The welfare of farmed Nile tilapia: a review. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 12, 2025.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 297–300, 2000.

FAO. **FAO Technical Guidelines for Responsible Fisher**. Rome. 2001.

FAO. **Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation**. Rome: [s.n.]. _____. **Simple Methods for Aquaculture**. Disponível em: <https://www.fao.org/fishery/docs/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6708e/x6708e01.htm#top>. Acesso em: 3 out. 2025.

FAO. **In Brief to The State of World Fisheries and Aquaculture 2024**. Rome: [s.n.].

FLECKENSTEIN, L. J.; TIERNEY, T. W.; RAY, A. J. Results show that hybrid systems tend to perform better in all metrics. **Global Seafood Alliance**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://www.globalseafood.org/advocate/comparing-biofloc-clear-water-hybrid-ras-tilapia-nurseries/?utm_source=chatgpt.com>. Acesso em: 8 nov. 2025.

FLORES-MÉNDEZ, L. C.; LIZÁRRAGA-VELÁZQUEZ, C. E.; SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, E. Y.; ARRIZON, J.; LEYVA-LÓPEZ, N.; HERNÁNDEZ, C. Study of the Effect of Dietary Agavin Supplementation in Blood Parameters and Antioxidant Enzymes of Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) under Stress Conditions. **Fishes**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 340, 2022.

FREITAS, L. E. L. De; LUNDSTEDT, L. M.; MORO, G. V.; RODRIGUES, A. P. O. **Práticas para avaliação da qualidade física em rações para peixes**. Palmas. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1068269/1/CNPASA2016ct3.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2025.

GALLARDO-COLLÍ, A.; PÉREZ-ROSTRO, C. I.; HERNÁNDEZ-VERGARA, M. P. Reuse of water from biofloc technology for intensive culture of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): effects on productive performance, organosomatic indices and body composition. **International Aquatic Research**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 43–55, 2019.

GAO, J.; KOSHIO, S.; ISHIKAWA, M.; YOKOYAMA, S.; MAMAUAG, R. E. P. Interactive effects of vitamin C and E supplementation on growth performance, fatty acid composition and reduction of oxidative stress in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed dietary oxidized fish oil. **Aquaculture**, [s. l.], v. 422–423, p. 84–90, 2014.

GASBARRINI, G.; BONVICINI, F.; GRAMENZI, A. Probiotics History. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 50, p. S116–S119, 1 dez. 2016.

GENEROSO, J. S.; GIRIDHARAN, V. V.; LEE, J.; MACEDO, D.; BARICHELLO, T. The role of the microbiota-gut-brain axis in neuropsychiatric disorders. **Brazilian Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 293–305, 2021.

GODÓI, F. C. M. De. Modelagem do crescimento corporal da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para previsão de safras e gestão ágil nas operações aquícolas. 2024. **Universidade Estadual Paulista (UNESP)**, Jaboticabal, 2024.

GRZELAK, A. K.; DAVIS, D. J.; CARAKER, S. M.; CRIM, M. J.; SPITSBERGEN, J. M.; WIEDMEYER, C. E. Stress Leukogram Induced by Acute and Chronic Stress in Zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative medicine**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 263–269, 2017.

GUARINO, M.; JACOBSON, L. D.; JANNI, K. A. Dust reduction from oil-based feed additives. **Applied Engineering in Agriculture**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 329–332, 2007.

GULCIN, İ. Antioxidants: a comprehensive review. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 99, n. 5, p. 1893–1997, 2025.

GULCIN, İ.; ALWASEL, S. H. DPPH Radical Scavenging Assay. **Processes**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 2248, 2023.

- HAI, N. V. The use of probiotics in aquaculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 4, p. 917–935, out. 2015.
- HAMDAN, A. M.; EL-SAYED, A. F. M.; MAHMOUD, M. M. Effects of a novel marine probiotic, *Lactobacillus plantarum* AH 78, on growth performance and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 120, n. 4, p. 1061–1073, 2016.
- HAN, B.; LONG, W.; HE, J.; LIU, Y.; SI, Y.; TIAN, L. Effects of dietary *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunological parameters, intestinal morphology and resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 225–231, 2015.
- HARGREAVES, J. A. Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. **Aquacultural Engineering**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 344–363, 2006.
- HOLDEMAN, L. V.; CATO, E. P.; MOORE, W. E. C. **Anaerobic Laboratory Manual**. 4. ed. Blacksburg: Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.
- HOSSAIN, M. N.; AFRIN, S.; HUMAYUN, S.; AHMED, M. M.; SAHA, B. K. Identification and Growth Characterization of a Novel Strain of *Saccharomyces boulardii* Isolated From Soya Paste. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 7, 2020.
- HUICAB-PECH, Z. G.; LANDEROS-SÁNCHEZ, C. Current State of Bacteria Pathogenicity and their Relationship with Host and Environment in Tilapia *Oreochromis niloticus*. **Journal of Aquaculture Research & Development**, [s. l.], v. 07, n. 05, 2016.
- JANTZEN, M.; GÖPEL, A.; BEERMANN, C. Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 115, n. 4, p. 1029–1036, 2013.
- JEFFRIES, C. D.; HOLTMAN, D. F.; GUSE, D. G. RAPID METHOD FOR DETERMINING THE ACTIVITY OF MICROORGANISMS ON NUCLEIC ACIDS. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 590–591, 1957.
- JEONG, J. S.; KIM, I. H. Effect of astaxanthin produced by *Phaffia rhodozyma* on growth performance, meat quality, and fecal noxious gas emission in broilers. **Poultry Science**, [s. l.], v. 93, n. 12, p. 3138–3144, 2014.
- JIANG, Q.; BHATTARAI, N.; PAHLOW, M.; XU, Z. Environmental sustainability and footprints of global aquaculture. **Resources, Conservation and Recycling**, [s. l.], v. 180, p. 106183, 2022.
- JIMÉNEZ, M. S. E.; TAGLIAPIETRA, B. L.; RICHARDS, N. S. P. dos S. Microencapsulação e avaliação da viabilidade de microrganismos probióticos utilizando um agente protetor. Em: **Gestão, qualidade e segurança em alimentação 2**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020.
- JOHNSON, E. A.; ECHAVARRI-ERASUN, C. Yeast Biotechnology. Em: **The Yeasts**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 21–44.

JONSSON, P.; LINDBERG, M.; HARALDSSON, I.; WADSTRÖM, T. Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: studies of alpha hemolysin, coagulase, and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 765–769, 1985.

JU, Z. Y.; FORSTER, I.; CONQUEST, L.; DOMINY, W.; KUO, W. C.; DAVID HORGAN, F. Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 118–133, 2008.

KELESIDIS, T.; POTHOUKAKIS, C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 5, n. 2, p. 111–125, 11 mar. 2012.

KHANJANI, M. H.; SHARIFINIA, M.; EMERENCIANO, M. G. C. Biofloc Technology (BFT) in Aquaculture: What Goes Right, What Goes Wrong? A Scientific-Based Snapshot. **Aquaculture Nutrition**, v. 2024, n. 1, 11 jan. 2024.

KHANJANI, M. H.; SHARIFINIA, M.; HAJIREZAEI, S. Recent progress towards the application of biofloc technology for tilapia farming. **Aquaculture**, [s. l.], v. 552, p. 738021, 2022.

KOCH, J. F. A.; OLIVEIRA, C. A. F.; ZANUZZO, F. S. Dietary β -glucan (MacroGard®) improves innate immune responses and disease resistance in Nile tilapia regardless of the administration period. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 112, p. 56–63, maio 2021.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 3–13, 2003.

KUBITZA, F. Manejo na produção de peixes, Parte 4 - Manejo nutricional e alimentar. **Revista Panorama da Aquicultura**, [s. l.], p. 14–27, 2009.

KUBITZA, F. Questões frequentes dos produtores sobre a qualidade dos alevinos de tilápia. **Panorama da Aquicultura**, [s. l.], 2006. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/questoes-frequentes-dos-produtores-sobre-a-qualidade-dos-alevinos-de-tilapia/>. Acesso em: 8 nov. 2025.

KUNLASAK, K.; CHITMANAT, C.; WHANGCHAI, N.; PROMYA, J.; LEBEL, L. Relationships of Dissolved Oxygen with Chlorophyll-a and Phytoplankton Composition in Tilapia Ponds. **International Journal of Geosciences**, [s. l.], v. 04, n. 05, p. 46–53, 2013.

KUSDARWATI, R.; AMIN, M.; WARDANA, A. B. DNase and Gelatinase Activities Of β -Hemolysin *Aeromonas hydrophila* Isolated from Catfish (*Clarias batrachus*). **Journal of Aquaculture and Fish Health**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 331, 2021.

LATIF, A.; SHEHZAD, A.; NIAZI, S.; ZAHID, A.; ASHRAF, W.; IQBAL, M. W.; REHMAN, A.; RIAZ, T.; AADIL, R. M.; KHAN, I. M.; ÖZOGUL, F.; ROCHA, J. M.; ESATBEYOGLU, T.; KORMA, S. A. Probiotics: mechanism of action, health benefits and their application in food industries. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 14, 2023.

LEE, H. J.; PARK, B.-R.; CHEWAKA, L. S. A Comparative Study of Composition and Soluble Polysaccharide Content between Brewer's Spent Yeast and Cultured Yeast Cells. **Foods**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1567, 2024.

LEE, S.-J.; NOH, D.-I.; LEE, Y.-S.; HASAN, M. T.; HUR, S. W.; LEE, S.; JEONG, S.-M.; LEE, J. M.; LEE, E.-W.; KIM, K.-W.; JANG, W. J. Effects of host-associated low-temperature probiotics in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) aquaculture. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 2134, 2024.

LEONARD, J. N.; SKOV, P. V. Capacity for thermal adaptation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effects on oxygen uptake and ventilation. **Journal of Thermal Biology**, v. 105, p. 103206, abr. 2022.

LI, B.; TIAN, F.; LIU, X.; ZHAO, J.; ZHANG, H.; CHEN, W. Effects of cryoprotectants on viability of *Lactobacillus reuteri* CICC6226. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 609–616, 2011.

LIAQAT, H.; PARVEEN, A.; KIM, S. Y. Neuroprotective Natural Products' Regulatory Effects on Depression via Gut–Brain Axis Targeting Tryptophan. **Nutrients**, v. 14, n. 16, p. 3270, 10 ago. 2022.

LIN, W.; PENG, Y.; XIANG, B.; FANG, J.; YE, J.; GUO, P. Prevalence and molecular basis of resistance to echinocandins among clinical *Candida glabrata* isolates in Guangdong province, China. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 521, 2025.

LUKIĆ, I.; IVKOVIĆ, S.; MITIĆ, M.; ADŽIĆ, M. Tryptophan metabolites in depression: Modulation by gut microbiota. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 16, 2022.

LYONS, T. P.; JACQUES, K. A.; DAWSON, K. A. Miscellaneous Products from Yeast. *Em: The Yeasts*. [s.l.] Elsevier, 1993. p. 293–324.

MA, W.; ZENG, W.; ZHANG, D.; ZHOU, Y.; HUANG, Y.; HONG, Y. Oxidative Stress in Aquaculture: Pathogenic Mechanisms and Preventive Strategies in Farmed Aquatic Animals. **Current Issues in Molecular Biology**, [s. l.], v. 47, n. 11, p. 873, 2025.

MACIEL-FIUZA, M. F.; MULLER, G. C.; CAMPOS, D. M. S.; DO SOCORRO SILVA COSTA, P.; PERUZZO, J.; BONAMIGO, R. R.; VEIT, T.; VIANNA, F. S. L. Role of gut microbiota in infectious and inflammatory diseases. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 14, 2023.

MADUREIRA, E. R. Expressão gênica intestinal de uma vacina de DNA via oral utilizando dois métodos de proteção em Tilápia-do-Nilo. 2020. **Universidade Federal de Minas Gerais**, Montes Claros, 2020.

MAKKY, E. A.; ALMATAR, M.; MAHMOOD, M. H.; TING, O. W.; QI, W. Z. Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Ethyl Acetate Extract of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 127–136, 2021.

MANDUCA, L. G.; DA SILVA, M. A.; ALVARENGA, É. R. De; ALVES, G. F. de O.; FERNANDES, A. F. de A.; ASSUMPÇÃO, A. F.; CARDOSO, C. C.; DE SALES, S. C. M.; TEIXEIRA, E. de A.; SILVA, M. de A. e; TURRA, E. M. Effects of a zero exchange biofloc

system on the growth performance and health of Nile tilapia at different stocking densities. **Aquaculture**, [s. l.], v. 521, p. 735064, 2020.

MANDUCA, L. G.; SILVA, M. A. Da; ALVARENGA, É. R. De; ALVES, G. F. de O.; FERREIRA, N. H.; TEIXEIRA, E. de A.; FERNANDES, A. F. A.; SILVA, M. de A. e; TURRA, E. M. Effects of different stocking densities on Nile tilapia performance and profitability of a biofloc system with a minimum water exchange. **Aquaculture**, [s. l.], v. 530, p. 735814, 2021.

MAPELLI-BRAHM, P.; CORTE-REAL, J.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; BOHN, T. Bioaccessibility of phytoene and phytofluene is superior to other carotenoids from selected fruit and vegetable juices. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 229, p. 304–311, 2017.

MARIUTTI, L. R. B.; PEREIRA, D. M.; MERCADANTE, A. Z.; VALENTÃO, P.; TEIXEIRA, N.; ANDRADE, P. B. Further Insights on the Carotenoid Profile of the Echinoderm *Marthasterias glacialis* L. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1498–1510, 2012.

MÁRQUEZ, L.; ALMANSA, E.; RUIZ DÍAZ, N. E.; DÍAZ, M.; MOYANO, F. J. Relationships between the specific growth rate and the thermal-unit growth coefficient applied to cultured juvenile fish. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 11, 2024.

MARTINEZ-PORCHAS, M.; PRECIADO-ÁLVAREZ, A.; VARGAS-ALBORES, F.; GRACIA-VALENZUELA, M. H.; CICALA, F.; MARTINEZ-CORDOVA, L. R.; MEDINA-FÉLIX, D.; GARIBAY-VALDEZ, E. Microbiota plasticity in tilapia gut revealed by meta-analysis evaluating the effect of probiotics, prebiotics, and biofloc. **PeerJ**, [s. l.], v. 11, p. e16213, 2023.

MARTINS, F. S.; ELIAN, S. D. A.; VIEIRA, A. T.; TIAGO, F. C. P.; MARTINS, A. K. S.; SILVA, F. C. P.; SOUZA, É. L. S.; SOUSA, L. P.; ARAÚJO, H. R. C.; PIMENTA, P. F.; BONJARDIM, C. A.; ARANTES, R. M. E.; TEIXEIRA, M. M.; NICOLI, J. R. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. **International Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 301, n. 4, p. 359–364, 2011.

MARTINS, P. M. M.; BATISTA, N. N.; SANTOS, L. D.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Microencapsulation of epiphytic coffee yeasts by spray drying using different wall materials: Implementation in coffee medium. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 379, p. 109839, 2022.

MASHHADIZADEH, N.; KHEZRI, S.; ESFAHANI, D. E.; MOHAMMADZADEH, S.; AHMADIFAR, E.; AHMADIFAR, M.; MOGHADAM, M. S.; EL-HAROUN, E. Enhancing growth performance, antioxidant defense, immunity response, and resistance against heat stress in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed *Saccharomyces boulardii* and/or *Bifidobacterium bifidum*. **Aquaculture Reports**, [s. l.], v. 39, p. 102462, 2024.

MATHAN MUTHU, C. M.; VICKRAM, A. S.; BHAVANI SOWNDHARYA, B.; SARAVANAN, A.; KAMALESH, R.; DINAKARKUMAR, Y. A comprehensive review on the utilization of probiotics in aquaculture towards sustainable shrimp farming. **Fish & Shellfish Immunology**, [s. l.], v. 147, p. 109459, 2024.

MIAO, L.-L.; CHI, S.; HOU, T.-T.; LIU, Z.-P.; LI, Y. The damage and tolerance mechanisms of *Phaffia rhodozyma* mutant strain MK19 grown at 28 °C. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 5, 2021.

MONSEES, H.; KLATT, L.; KLOAS, W.; WUERTZ, S. Chronic exposure to nitrate significantly reduces growth and affects the health status of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) in recirculating aquaculture systems. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 48, n. 7, p. 3482–3492, 2017.

MONTEIRO, M. I. C.; FERREIRA, F. N.; DE OLIVEIRA, N. M. M.; ÁVILA, A. K. Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 477, n. 1, p. 125–129, 2003.

MONTGOMERY, D. C. Introduction to statistical quality control. [s.l.] : **John Wiley & Sons, Inc.**, 2009.

MU, W.; WANG, J.; ZHOU, Y.; FENG, S.; HUANG, Y.; LI, Q. Behavioral, Hematological, Histological, Physiological Regulation and Gene Expression in Response to Heat Stress in Amur Minnow (*Phoxinus lagowskii*). **Fishes**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 335, 2025.

MUNGUTI, J. M.; NAIRUTI, R.; ITEBA, J. O.; OBIERO, K. O.; KYULE, D.; OPIYO, M. A.; ABWAO, J.; KIRIMI, J. G.; OUTA, N.; MUTHOKA, M.; GITHUKIA, C. M.; OGELLO, E. O. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) culture in Kenya: Emerging production technologies and socio-economic impacts on local livelihoods. **Aquaculture, Fish and Fisheries**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 265–276, 2022.

MUNNI, M. J.; AKTHER, K. R.; AHMED, S.; HOSSAIN, M. A.; ROY, N. C. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics as an Alternative to Antibiotics on Growth and Blood Profile of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 2023, p. 1–12, 2023.

MUSHTAQ, S. T. Aggression in aquatic environments and its relevance in aquaculture and conservation efforts. **Discover Animals**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 28, 2024.

NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 1150–1154, 2000.

NANKERVIS, L.; PHILLIPS, M. J.; PICKERING T.; SAMMUT J.; NOINEY J.; PANT J.; HAROHAU D.; HEWAVITHARANE C.; WAQAIRATU S.; ALLAN G. Barriers to tilapia aquaculture in Papua New Guinea, Solomon Islands and Timor-Leste, **Australian Centre for International Agricultural Research**. Canberra. Disponível em: <https://www.aciar.gov.au/sites/default/files/2025-05/ACIAR_TR103_Barriers-tilapia-aquaculture_web.pdf?utm_source=chatgpt.com>. Acesso em: 8 nov. 2025.

NIKINMAA, M. Environmental regulation of the function of circulating erythrocytes via changes in age distribution in teleost fish: Possible mechanisms and significance. **Marine Genomics**, [s. l.], v. 49, p. 100717, 2020.

OFEK, T.; LALZAR, M.; IZHAKI, I.; HALPERN, M. Intestine and spleen microbiota composition in healthy and diseased tilapia. **Animal Microbiome**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 50, 2022.

OMAR, A. A.; GADO, M. S.; KANDEL, H. E.; FARRAG, F. A.; SHUKRY, M. Probiotic Efficacy in Aquaculture: The Role of Technospore® (*Bacillus coagulans*) in Improving Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Performance and Disease Resistance: a Study on Gut Health, Immunological Response, and Gene Expression. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. l.], 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA (OMG). **Diretrizes Mundiais da Organização de Gastroenterologia - Probióticos e prebióticos Clinical Gastroenterology and Hepatology**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-portuguese>>. Acesso em: 27 ago. 2024

O’SULLIVAN, M. G.; THORNTON, G.; O’SULLIVAN, G. C.; COLLINS, J. K. Probiotic bacteria: myth or reality? **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 3, p. 309–314, 1992.

PANDEY, B. Pellet technical quality of feeds for Atlantic salmon. 2018. **Norwegian University of Life Sciences**, [s. l.], 2018.

PELIĆ, D. L.; RADOSAVLJEVIĆ, V.; PELIĆ, M.; BALOŠ, M. Ž.; PUVAČA, N.; JUG-DUJAKOVIĆ, J.; GAVRILOVIĆ, A. Antibiotic Residues in Cultured Fish: Implications for Food Safety and Regulatory Concerns. **Fishes**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 484, 2024.

PETRARIU, O.-A.; BARBU, I. C.; NICULESCU, A.-G.; CONSTANTIN, M.; GRIGORE, G. A.; CRISTIAN, R.-E.; MIHAESCU, G.; VRANCIANU, C. O. Role of probiotics in managing various human diseases, from oral pathology to cancer and gastrointestinal diseases. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 14, 2024.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; BOSCOLO, W. R.; CYRINO, J. E. P.; FURUYA, V. R. B.; FEIDEN, A. Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias. Toledo: **GFM**, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/item/001997206>>. Acesso em: 8 nov. 2025.

PRAJAPATI, K.; BISANI, K.; PRAJAPATI, H.; PRAJAPATI, S.; AGRAWAL, D.; SINGH, S.; SARAF, M.; GOSWAMI, D. Advances in probiotics research: mechanisms of action, health benefits, and limitations in applications. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 386–406, 2024.

QIU, Z.; XU, Q.; LI, S.; ZHENG, D.; ZHANG, R.; ZHAO, J.; WANG, T. Effects of Probiotics on the Water Quality, Growth Performance, Immunity, Digestion, and Intestinal Flora of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in the Biofloc Culture System. **Water**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 1211, 2023.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing, **R Foundation for Statistical Computing**, 2024. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 30 out. 2025.

RAHAYU, S.; AMOAH, K.; HUANG, Y.; CAI, J.; WANG, B.; SHIJA, V. M.; JIN, X.; ANOKYEWAA, M. A.; JIANG, M. Probiotics application in aquaculture: its potential effects, current status in China and future prospects. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 11, 2024.

RAHMAN, M. M.; KHOSRAVI, S.; CHANG, K. H.; LEE, S.-M. Effects of Dietary Inclusion of Astaxanthin on Growth, Muscle Pigmentation and Antioxidant Capacity of Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Preventive Nutrition and Food Science**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 281–288, 2016.

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

RATHOUR, D.; SHAH, S.; KHAN, S.; SINGH, P. K.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, S. B.; KHATRI, D. K. Role of gut microbiota in depression: Understanding molecular pathways, recent research, and future direction. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 436, p. 114081, 2023.

RAVINDRANATH, R.; PERIASAMY, A. P.; ROY, P.; CHEN, Y.-W.; CHANG, H.-T. Smart app-based on-field colorimetric quantification of mercury via analyte-induced enhancement of the photocatalytic activity of TiO₂-Au nanospheres. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 410, n. 18, p. 4555–4564, 2018.

RAY, A.; DRURY, T.; CECIL, A. A look at nutritional contributions and shrimp production. **Global Seafood Alliance**, [s. l.], 2017. Disponível em: <https://www.globalseafood.org/advocate/comparing-biofloc-clear-water-ras/?utm_source=chatgpt.com>. Acesso em: 8 nov. 2025.

RAZA, B.; ZHENG, Z.; YANG, W. A Review on Biofloc System Technology, History, Types, and Future Economical Perceptions in Aquaculture. **Animals**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 1489, 2024.

REIS, G. P. A. Recria e engorda de rã-touro (*Lithobates catesbaianus*) em sistema de produção semi-inundado e inundado. 2021. **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2021.

REIS, G. P. A.; DOS SANTOS, N. N.; BEZERRA, V. M.; ASSIS, Y. P. A. S.; DA SILVA, T. P. M.; PAWLOWSKI, V. R.; GONÇALVES, L. A.; BRAGA, N. G.; LANA, M.; CAMPELO, D. A. V.; DE ALVARENGA, É. R.; VERAS, G. C. Rearing American bullfrog tadpoles in different tank colors: Effect on metamorphosis, performance, and biochemistry responses. **Aquaculture**, [s. l.], v. 590, p. 740994, 2024.

RIBEIRO, G. B.; MARQUES, R. de C. G.; ALBUQUERQUE, D. M. Combinação de fertilizante ovino e probiótico melhoram desempenho zootécnico de tilápia do Nilo. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. e11614548850, 2025.

RIVERA, S. M.; CHRISTOU, P.; CANELA-GARAYOA, R. Identification of carotenoids using mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 353–372, 2014.

RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Reproduction and embryogenesis. Em: *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. [s.l.] : Elsevier, 2020. p. 287–313.

ROBINSON, C. V.; ELKINS, M. R.; BIALKOWSKI, K. M.; THORNTON, D. J.; KERTESZ, M. A. Desulfurization of mucin by *Pseudomonas aeruginosa*: influence of sulfate in the lungs of cystic fibrosis patients. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 12, p. 1644–1653, 2012.

- ROBLES-PORCHAS, G. R.; GOLLAS-GALVÁN, T.; MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; MARTÍNEZ-CORDOVA, L. R.; MIRANDA-BAEZA, A.; VARGAS-ALBORES, F. The nitrification process for nitrogen removal in biofloc system aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 2228–2249, 2020.
- ROUSSEL, C.; SIVIGNON, A.; DE VALLÉE, A.; GARRAIT, G.; DENIS, S.; TSILIA, V.; BALLEST, N.; VANDEKERCKOVE, P.; VAN DE WIELE, T.; BARNICH, N.; BLANQUET-DIOT, S. Anti-infectious properties of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 on enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) strain H10407. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 102, n. 14, p. 6175–6189, 2018.
- RUBEN, M. O.; AKINSANOLA, A. B.; OKON, M. E.; SHITU, T.; JAGUNNA, I. I. Emerging challenges in aquaculture: Current perspectives and human health implications. **Veterinary World**, [s. l.], p. 15–28, 2025.
- RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.
- SALAR, R. K.; CERTIK, M.; BREZOVA, V.; BRLEJOVA, M.; HANUSOVA, V.; BREIEROVÁ, E. Stress influenced increase in phenolic content and radical scavenging capacity of *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26. 3 **Biotech**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 53–60, 2013.
- SALOMÃO, R. A. S.; SANTOS, V. B. Dos; MARECO, E. A. Influence of rearing temperature on muscle growth and adipose tissue in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) strains. **Animal Sciences**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://www.redalyc.org/journal/3031/303158407045/html/?utm_source=chatgpt.com>. Acesso em: 8 nov. 2025.
- SANAHUJA, I.; RUIZ, A.; FIRMINO, J. P.; REYES-LÓPEZ, F. E.; ORTIZ-DELGADO, J. B.; VALLEJOS-VIDAL, E.; TORT, L.; TOVAR-RAMÍREZ, D.; CEREZO, I. M.; MORIÑO, M. A.; SARASQUETE, C.; GISBERT, E. *Debaryomyces hansenii* supplementation in low fish meal diets promotes growth, modulates microbiota and enhances intestinal condition in juvenile marine fish. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 90, 2023.
- SÁNCHEZ-RANGEL, J. C.; BENAVIDES, J.; HEREDIA, J. B.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. **Analytical Methods**, [s. l.], v. 5, n. 21, p. 5990, 2013.
- SANTOS, J. F.; SOARES, K. L. S.; ASSIS, C. R. D.; GUERRA, C. A. M.; LEMOS, D.; CARVALHO, L. B.; BEZERRA, R. S. Digestive enzyme activity in the intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) under pond and cage farming systems. **Fish Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 1259–1274, 2016.
- SANTOS, A. R. O.; AIRES, A.; PONTES, A.; SILVA, M.; BRITO, P. H.; GROENEWALD, M.; MELO, C. G. S.; LACHANCE, M.-A.; SAMPAIO, J. P.; ROSA, C. A. *Phaffia brasiliensis* sp. nov., a yeast species isolated from soil in a Cerrado–Atlantic Rain Forest ecotone site in

Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 71, n. 11, 2021.

SANTOS, D. K. M.; KOJIMA, J. T.; SANTANA, T. M.; DE CASTRO, D. P.; SERRA, P. T.; DANTAS, N. S. M.; DA FONSECA, F. A. L.; MARIÚBA, L. A. M.; GONÇALVES, L. U. Farming tambaqui (*Colossoma macropomum*) in static clear water versus a biofloc system with or without *Bacillus subtilis* supplementation. **Aquaculture International**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 207–218, 2021.

SANTOS, T. C. **Identificação e Avaliação do Potencial Probiótico de Leveduras Isoladas de Frutos Amazônicos para Aplicação em Alimentos**. Palmas: Universidade Federal do Tocantins, 2023.

SAUBENOVA, M.; RAPOPORT, A.; VENKATACHALAM, M.; DUFOSSÉ, L.; YERMEKBAY, Z.; OLENIKOVA, Y. Production of Carotenoids by Microorganisms. Fermentation, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 502, 2024.

SCHROEDER, B. O.; BÄCKHED, F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. **Nature Medicine**, v. 22, n. 10, p. 1079–1089, 6 out. 2016.

SELVARAJ, S.; GURUMURTHY, K. An overview of probiotic health booster-kombucha tea. **Chinese Herbal Medicines**, v. 15, n. 1, p. 27–32, jan. 2023.

SHARMA, N.; KANG, D.-K.; PAIK, H.-D.; PARK, Y.-S. Beyond probiotics: a narrative review on an era of revolution. **Food Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 413–421, 2023.

SHENG, Y. H.; HASNAIN, S. Z. Mucus and Mucins: The Underappreciated Host Defence System. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2022.

SHI, L.; CHEN, L.; JIANG, S.; WU, Z.; ZHOU, Y.; XU, Q. Hematogenesis Adaptation to Long-Term Hypoxia Acclimation in Zebrafish (*Danio rerio*). **Fishes**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 98, 2022.

SILVA, S. M. R. e; EWBANK, A. C.; STREFEZZI, R. D. F.; ALVARADO, G.; SACRISTAN, C.; PAULA, C. D. De; CATÃO-DIAS, J. L. Comparative leukocyte morphometric analysis between endemic Anurans from Brazil and the invasive species *Lithobates catesbeianus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 159, 2017.

SILVA, M. A.; ALVARENGA, É. R.; COSTA, F. F. B. Da; TURRA, E. M.; ALVES, G. F. de O.; MANDUCA, L. G.; SALES, S. C. M.; LEITE, N. R.; BEZERRA, V. M.; MORAES, S. G. da S.; TEIXEIRA, E. de A. Feeding management strategies to optimize the use of suspended feed for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultivated in bioflocs. **Aquaculture Research**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 605–615, 2020.

SILVA, V. V.; GONÇALVES, G. S.; SANTOS, V. B. Dos. Influência do Armazenamento da ração sob refrigeração na viabilidade de microrganismos probióticos. Em: **XII REUNIÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO DE PESCA 2017**, São Paulo. Anais.

SINGH, B. K.; THAKUR, K.; KUMARI, H.; MAHAJAN, D.; SHARMA, D.; SHARMA, A. K.; KUMAR, S.; SINGH, B.; PANKAJ, P. P.; KUMAR, R. A review on comparative analysis

of marine and freshwater fish gut microbiomes: insights into environmental impact on gut microbiota. **FEMS Microbiology Ecology**, [s. l.], v. 101, n. 1, 2025.

SMALL, B. C.; HARDY, R. W.; TUCKER, C. S. Enhancing fish performance in aquaculture. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 4, p. 42–49, 1 out. 2016.

STAVROU, G.; KOTZAMPASSI, K. The Expanding Role of Probiotics in Human Health. **Nutrients**, v. 17, n. 7, p. 1116, 24 mar. 2025.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. **A Practical Handbook of Seawater Analysis**. 2. ed. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, 1972. Disponível em: <<https://repository.oceanbestpractices.org/handle/11329/1994>>. Acesso em: 30 out. 2025.

SVOBODOVÁ, Z.; LLOYD, R.; MÁCHOVÁ, J.; VYKUSOVÁ, B. Water quality and fish health. **FAO**. Roma.

SWADE, F. R.; MOLAVI, F.; DOLAT-ABADI, S. Synergistic Effect of Silver Nanoparticles and Probiotic *Lactobacillus Plantarum* on the Expression of MexA Component Gene of Pump Efflux System in Drug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates. 2022.

SZAJEWSKA, H.; KOŁODZIEJ, M. Systematic review with meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 42, n. 7, p. 793–801, 27 out. 2015.

TANG, Y.; LOU, X.; YANG, G.; TIAN, L.; WANG, Y.; HUANG, X. Occurrence and human health risk assessment of antibiotics in cultured fish from 19 provinces in China. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2022.

TERAO, J. Revisiting carotenoids as dietary antioxidants for human health and disease prevention. **Food & Function**, [s. l.], v. 14, n. 17, p. 7799–7824, 2023.

THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). **The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoints for interpretation of MICs and zone diameters**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.eucast.org>>. Acesso em: 30 out. 2025.

TORRES, D. E.; MANCILHA, I. M. Avaliação da viabilidade de microrganismos probióticos incorporados em ração de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 72, n. 6, p. 2381–2386, 2020.

TORRES-MARAVILLA, E.; PARRA, M.; MAISEY, K.; VARGAS, R. A.; CABEZAS-CRUZ, A.; GONZALEZ, A.; TELLO, M.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G. Importance of Probiotics in Fish Aquaculture: Towards the Identification and Design of Novel Probiotics. **Microorganisms**, [s. l.], v. 12, n. 3, 2024.

TURRA, E. M.; TORAL, F. L. B.; ALVARENGA, É. R. De; RAIDAN, F. S. S.; FERNANDES, A. F. de A.; ALVES, G. F. de O.; SALES, S. C. M. De; TEIXEIRA, E. de A.; MANDUCA, L. G.; BRITO, T. S. De; SILVA, M. A. Da; SILVA JÚNIOR, A. F. Da; ALMEIDA, L. F. C. De; SANTOS, C. R. Dos; SILVA, M. de A. e. Genotype×environment interaction for growth traits of Nile tilapia in biofloc technology, recirculating water and Cage systems. **Aquaculture**, [s. l.], v. 460, p. 98–104, 2016.

UNESCO. **Chemical methods for use in marine environmental monitoring**. Paris.

VAISHNAVI, V. V. K.; BANIK, U.; SABESAN, G. S.; ADHIKARY, A. K.; PARASURAMAN, S. Evaluation of Acute and Sub-Chronic Toxicity of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Sprague-Dawley Rats. **Advanced Biomedical Research**, [s. l.], v. 13, n. 1, 2024.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, [s. l.], v. 32, n. 9, p. 2429–2436, 2009.

VENCES, A.; RIVAS, A. J.; LEMOS, M. L.; HUSMANN, M.; OSORIO, C. R. Chromosome-Encoded Hemolysin, Phospholipase, and Collagenase in Plasmidless Isolates of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* Contribute to Virulence for Fish. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 83, n. 11, 2017.

VERDEGEM, M.; BUSCHMANN, A. H.; LATT, U. W.; DALSGAARD, A. J. T.; LOVATELLI, A. The contribution of aquaculture systems to global aquaculture production. **Journal of the World Aquaculture Society**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 206–250, 2023.

VERGIS, E. N.; SHANKAR, N.; CHOW, J. W.; HAYDEN, M. K.; SNYDMAN, D. R.; ZERVOS, M. J.; LINDEN, P. K.; WAGENER, M. M.; MUDER, R. R. Association between the Presence of Enterococcal Virulence Factors Gelatinase, Hemolysin, and Enterococcal Surface Protein and Mortality among Patients with Bacteremia Due to *Enterococcus faecalis*. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 570–575, 2002.

WAHEED, A.; NAZ, H.; WAJID, M.; KHAN, M. S. Impact of isolation on growth performance, behavior, and stress responses in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Latin American Journal of Aquatic Research**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 483–490, 2023.

WAHMAN, D. G.; PRESSMAN, J. G. Nitrification in Chloraminated Drinking Water Distribution Systems: Factors Affecting Occurrence. Em: **Comprehensive Water Quality and Purification**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 283–294.

WAIHO, K.; ABD RAZAK, M. S.; ABDUL RAHMAN, M. Z.; ZAID, Z.; IKHWANUDDIN, M.; FAZHAN, H.; SHU-CHIEN, A. C.; LAU, N.-S.; AZMIE, G.; ISHAK, A. N.; SYAHNON, M.; KASAN, N. A. A metagenomic comparison of clearwater, probiotic, and Rapid BFT TM on Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* cultures. **PeerJ**, [s. l.], v. 11, p. e15758, 2023.

WANG, W.; LIU, M.; FAWZY, S.; XUE, Y.; WU, M.; HUANG, X.; YI, G.; LIN, Q. Effects of Dietary Phaffia rhodozyma Astaxanthin on Growth Performance, Carotenoid Analysis, Biochemical and Immune-Physiological Parameters, Intestinal Microbiota, and Disease Resistance in *Penaeus monodon*. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021.

WANG, M.; FAN, Z.; ZHANG, Z.; YI, M.; LIU, Z.; KE, X.; GAO, F.; CAO, J.; LU, M. Effects of Diet on the Gut Microbial Communities of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Across Their Different Life Stages. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 9, 2022.

WATERHOUSE, A. L. Determination of Total Phenolics. Em: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003.

WEDEMEYER, G. A. **Physiology of Fish in Intensive Culture Systems**. Boston, MA: Springer US, 1996.

WHEELER, K. M.; CÁRCAMO-OYARCE, G.; TURNER, B. S.; DELLOS-NOLAN, S.; CO, J. Y.; LEHOUX, S.; CUMMINGS, R. D.; WOZNIAK, D. J.; RIBBECK, K. Mucin glycans attenuate the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in infection. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. 2146–2154, 2019.

WICKHAM, H.; AVERICK, M.; BRYAN, J.; CHANG, W.; MCGOWAN, L.; FRANÇOIS, R.; GROLEMUND, G.; HAYES, A.; HENRY, L.; HESTER, J.; KUHN, M.; PEDERSEN, T.; MILLER, E.; BACHE, S.; MÜLLER, K.; OOMS, J.; ROBINSON, D.; SEIDEL, D.; SPINU, V.; TAKAHASHI, K.; VAUGHAN, D.; WILKE, C.; WOO, K.; YUTANI, H. Welcome to the Tidyverse. **Journal of Open Source Software**, [s. l.], v. 4, n. 43, p. 1686, 2019.

WIDANARNI; TANBIYASKUR. Application of Probiotic, Prebiotic and Synbiotic for the Control of Streptococcosis in Tilapia *Oreochromis niloticus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 2, p. 59–66, 1 fev. 2015.

WITESKA, M.; KONDERA, E.; BOJARSKI, B. Hematological and Hematopoietic Analysis in Fish Toxicology—A Review. **Animals**, [s. l.], v. 13, n. 16, p. 2625, 2023.

WOLF, J. C.; BAUMGARTNER, W. A.; BLAZER, V. S.; CAMUS, A. C.; ENGELHARDT, J. A.; FOURNIE, J. W.; FRASCA, S.; GROMAN, D. B.; KENT, M. L.; KHOO, L. H.; LAW, J. M.; LOMBARDINI, E. D.; RUEHL-FEHLERT, C.; SEGNER, H. E.; SMITH, S. A.; SPITSBERGEN, J. M.; WEBER, K.; WOLFE, M. J. Nonlesions, Misdiagnoses, Missed Diagnoses, and Other Interpretive Challenges in Fish Histopathology Studies. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 297–325, 2015.

WYBAN, J.; WALSH, W. A.; GODIN, D. M. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 138, n. 1–4, p. 267–279, dez. 1995.

XIA, W.; TANG, N.; KORD-VARKANEH, H.; LOW, T. Y.; TAN, S. C.; WU, X.; ZHU, Y. The effects of astaxanthin supplementation on obesity, blood pressure, CRP, glycemic biomarkers, and lipid profile: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 161, p. 105113, 2020.

XU, W.; ZHANG, D.; SU, H.; XU, Y.; HU, X.; WEN, G.; CAO, Y. Impact of Biochar Addition on Biofloc Nitrifying Bacteria and Inorganic Nitrogen Dynamics in an Intensive Aquaculture System of Shrimp. **Microorganisms**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 2581, 2024.

YADAV, N. K.; PAUL, S.; PATEL, A. B.; MAHANAND, S. S.; BISWAS, P.; CHOUDHURY, T. G.; BAIDYA, S.; MEENA, D. K. The role of biofloc technology in sustainable aquaculture: nutritional insights and system efficiency. **Blue Biotechnology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 7, 2025.

YIGIT, N.; AKTAS, E.; DAGISTAN, S.; AYYILDIZ, A. Investigating Biofilm Production, Coagulase and Hemolytic Activity in *Candida* Species Isolated From Denture Stomatitis Patients. **The Eurasian Journal of Medicine**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 27–32, 2011.

YING, D. Y.; PHOON, M. C.; SANGUANSRI, L.; WEERAKKODY, R.; BURGAR, I.; AUGUSTIN, M. A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship

of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 75, n. 9, 2010.

YU, Y.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y.; SIMPSON, B. K.; CHEN, S.; WANG, Y.; LI, C.; WANG, D.; PAN, C. Recent advances in the effects of protein oxidation on aquatic products quality: mechanism and regulation. **International Journal of Food Science & Technology**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 1968–1978, 2024.

ZHANG, J.; TIAN, C.; ZHU, K.; LIU, Y.; ZHAO, C.; JIANG, M.; ZHU, C.; LI, G. Effects of Natural and Synthetic Astaxanthin on Growth, Body Color, and Transcriptome and Metabolome Profiles in the Leopard Coralgrouper (*Plectropomus leopardus*). **Animals**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 1252, 2023.

APÊNDICE A - Protocolo histologia

Após a obtenção dos cortes histológicos, os tecidos foram fixados em Líquido de Bouin (solução de ácido pícrico 71,4%, formaldeído puro 23,8%, ácido acético glacial 4,8%) por 24 h, sendo os cassetes com as amostras transferidos para recipiente com álcool 70%. Em seguida, foi realizada técnica de inclusão em parafina, a qual é precedida das seguintes etapas de desidratação e clarificação:

- Álcool 85% - durante 1 h;
- Álcool 95% - durante 1 h;
- Álcool 100% - durante 1 h;
- Álcool 100% - durante 1 h;
- Álcool 100% - durante 1 h;
- Xilol - durante 30 min;
- Xilol - durante 30 min;
- Infiltração em parafina - durante 20 min;
- Infiltração em parafina - durante 20 min;

Após a infiltração em parafina, os tecidos foram cortados novamente com bisturi e ajustados para posicionamento correto durante o processo de inclusão em parafina. As amostras incluídas foram submetidas à microtomia, utilizando-se micrótomo ZEISS (Hyrax M 15) pertencente ao Laboratório de Histopatologia e Imunohistoquímica da Escola de Veterinária da UFMG.

Para montagem das lâminas, foram realizados cortes histológicos de 4 µm, sendo preparadas duas lâminas por amostra, com cerca de dois a três cortes cada. A partir de solução com álcool etílico PA (99,5%), os cortes foram adicionados às lâminas e fixados ligeiramente no banho-maria (50-60° C). Após secagem, as lâminas foram levada à estufa (70° C) para remoção do excesso de parafina.

Posteriormente, foi realizada a Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) das lâminas, também no Laboratório de Histopatologia e Imunohistoquímica da Escola de Veterinária da UFMG, seguindo o protocolo:

- Xilol - durante 25 min;

- Álcool 99,5%% 1 - durante 5 min;
- Álcool 99,5%% 2 - durante 5 min;
- Álcool 99,5%% 3 - durante 5 min;
- Álcool 90% - durante 5 min;
- Álcool 80% - durante 5 min;
- Água destilada - durante 3 min;
- Hematoxilina - durante 1 min;
- Água destilada - durante 15 min;
- Eosina - durante 5-10 s;
- Água destilada - durante 10 s;
- Álcool 80% - mergulhado rapidamente;
- Álcool 90% - mergulhado rapidamente;
- Álcool 99,5%% 1 - mergulhado rapidamente;
- Álcool 99,5%% 2 - durante 10 min;
- Álcool 99,5%% 3 - durante 10 min;
- Xilol - durante 3 min.

Ao final do processo, as lâminas foram montadas com lamínulas e Entellan™ (Sigma-Aldrich), sendo deixadas em repouso por 18 h para secagem total.

ANEXO A - Protocolo CEUA #65/2025**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 65/2025

Título do projeto: Administração de suplementação dietética de *Phaffia brasiliana* para Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*): avaliação da segurança e do potencial probiótico

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Flaviano dos Santos Martins

Unidade: Instituto de Ciencias Biologicas

Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 24/03/2025. Validade: 24/03/2025 à 23/03/2030.
Belo Horizonte, 25/03/2025.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br