

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**USO DE ADITIVOS FUNCIONAIS PARA CONTROLE DE
FRANCISELOSE EM TILÁPIA *Oreochromis niloticus* (L.)**

Elielma Lima de Sousa

Bióloga

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**USO DE ADITIVOS FUNCIONAIS PARA CONTROLE DE
FRANCISELOSE EM TILÁPIA *Oreochromis niloticus* (L.)**

Discente: Elielma Lima de Sousa

Orientadora: Fabiana Pilarski

Co-orientador: Giovani Sampaio Gonçalves

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Doutora em Microbiologia Agropecuária.

2024

S725u Sousa, Elielma Lima de
Uso de aditivos funcionais para controle de franciselose em
tilápia *Oreochromis niloticus* (L.) / Elielma Lima de Sousa. --
Jaboticabal, 2024
80 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Fabiana Pilarski
Coorientador: Giovani Sampaio Gonçalves

1. Fitoativos. 2. Imunomoduladores. 3. Planta. 4. Saúde.
5. Suplementação dietética. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: USO DE ADITIVOS FUNCIONAIS PARA CONTROLE DE FRANCISELOSE EM
TILÁPIA *Oreochromis niloticus* (L.)

AUTORA: ELIELMA LIMA DE SOUSA

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

COORDENADOR: GIOVANI SAMPAIO GONÇALVES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Microbiologia
Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI (Participação Virtual)
Centro de Aquicultura da UNESP / CAUNESP

Documento assinado digitalmente
FABIANA PILARSKI
Data: 07/10/2024 10:40:46-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Pós-Doutorando NYCOLAS LEVY PEREIRA (Participação Virtual)
FZEA USP / Pirassununga/SP

Documento assinado digitalmente
NYCOLAS LEVY PEREIRA
Data: 07/10/2024 15:11:00-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. MARGARIDA MARIA BARROS (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente
MARGARIDA MARIA BARROS
Data: 04/10/2024 11:04:07-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. ADEMIR CALVO FERNANDES JÚNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente
ADEMIR CALVO FERNANDES JÚNIOR
Data: 04/10/2024 07:40:14-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. MARITA VEDOVELLI CARDOZO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
MARITA VEDOVELLI CARDOZO
Data: 04/10/2024 10:14:44-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 30 de agosto de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Elielma Lima de Sousa – nascida em São Luis, Estado do Maranhão. Ingressou no Curso de Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado) em 2011 na Universidade Estadual do Maranhão– Câmpus Paulo VI, obtendo o título de bióloga em 2017. Possui Graduação com período sanduiche de 1 ano e 4 meses (2013-2014) na Universidade de Alberta, Canadá. Como estudante de graduação realizou intercambio de idioma na Argentina financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Maranhão (FAPEMA). A vida acadêmica científica como pesquisador teve início no segundo ano de graduação (2012) quando executou o primeiro trabalho de Iniciação científica (2012-2013), onde pesquisou “Biomarcadores comportamentais associados aos aspectos reprodutivos de *Colossoma macropomum* da APA do Maracanã, São Luís-MA”. Após este trabalho tornou-se bolsista de Incitação científica por mais dois anos (2015-2017) atuando em pesquisas com ensaios ecotoxicológicos para avaliação da qualidade ambiental. Os trabalhos de pesquisa desenvolvidos resultaram em artigos e resumos apresentados e publicados em anais de eventos científicos locais e internacionais. Participou como membro da comissão organizadora de eventos científicos. Realizou três estágios extracurriculares. O primeiro deles foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da UEMA, desenvolvendo atividades de investigação sobre qualidade microbiológica da água e alimentos. Posteriormente, durante o período sanduiche em Universidade Canadense, estagiou no Laboratório do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de Alberta, nesse trabalhou com pesquisas na área de toxicologia ambiental. cursou mestrado de 2018 a 2020 no programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Câmpus Jaboticabal). Ingressou no curso de doutorado em agosto de 2020, no programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Câmpus Jaboticabal).

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus pela minha existência e pelas experiências vividas.

À minha família, especialmente aos meus amados pais Maria Nivia e Pedro, minha irmã e o Diego, pelo apoio, amor e confiança.

Agradeço a Professora. Dra. Fabiana Pilarski pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, por ter acreditado e confiado no meu trabalho. Obrigada pela orientação e por fazer parte da construção de minha formação profissional.

Agradeço ao Dr. Giovani Gonçalves pela co-orientação, suporte e disponibilidade de tempo sempre apresentada de muito bom grado em todos os momentos que necessitei.

Aos professores membros da banca examinadora pelo seu tempo e contribuição.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos (LaPOA) por toda ajuda, pelo apoio e suporte técnico.

Ao Instituto de Pesca de São José do Rio Preto, em especial ao Miguel por todo apoio e suporte no desenvolvimento dos experimentos.

A Prevet – Sanidade Aquícola, em especial a Andressa e o Breno que ajudaram tornar esse trabalho ser possível.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária e a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp.

À PHIBRO Animal Health Corporation® pelo apoio e condução desta pesquisa.

À (CAPES) pela bolsa de estudos.

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

Aos funcionários do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP). E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Obrigada a todos!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iiv
ABSTRACT	iv
CAPITULO 1 – Considerações gerais	6
1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 Aquicultura Mundial	7
2.2 Aquicultura brasileira: Crescimento x Desafios	8
2.3 Sistema imunológico dos peixes	10
2.4 Bacterioses na Produção de Tilápia.....	13
2.5 Franciselose em tilápia do Nilo.....	15
2.6 Uso de antimicrobianos no Controle de Bacterioses	16
2.7 Aditivos.....	19
REFERÊNCIAS.....	23
CAPÍTULO 2 – Plant derived feed additive improves immune response and resistance to <i>Francisella orientalis</i> in Nile tilapia	34
Abstract	34
1.INTRODUCTION.....	36
2.MATERIAL AND METHODS	37
2,1 Animals, additives, and bacterial strain	37
2.2 Growth condions of <i>F. orientalis</i>	38
2.3 Diet preparation	38
2.4 Experimental design	39
2.5 Biochemical and immunological analysis	40
2.6 Bacterial challenge	41

2.7 Histopathological assessment	41
2.8 Bacterial re-isolation	42
2.9 Statistical analysis	42
3.RESULTS.....	42
3.1 Biochemical and Immunological analysis	42
3.2 Survival after <i>F. orientalis</i> infection.....	44
3.3 Histopathological findings.....	46
3.4 Bacterial recovery of <i>F. orientalis</i> in surviving fish.....	47
4. DISCUSSION	47
5. CONCLUSIONS	54
REFERENCES.....	54
CAPITULO 3 - Efeitos da suplementação dietética com <i>Y. schidigera</i> e <i>Q. saponaria</i> no desempenho produtivo e saúde de tilápia-do-nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	59
Resumo	59
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1 Aquisição dos Peixes	61
2.2. Condições experimentais	61
2.3 Dietas e Delineamento Experimental	62
2.4 Desempenho produtivo	63
2.5 Análise hematológica, bioquímica e imunológica	64
2.6 Análise histológica.....	65
2.7 Análise estatística.....	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.1 Desempenho produtivo	66
3.2 Análise hematológica, bioquímica e imunológica	66

3.3 Alterações histológicas.....	66
4. DISCUSSÃO:	70
REFERÊNCIAS:.....	75

USO DE ADITIVOS FUNCIONAIS PARA CONTROLE DE FRANCISELOSE EM TILÁPIA *Oreochromis niloticus* (L.)

RESUMO - A busca pelo controle e prevenção de franciselose em tilápia é uma prática importante para uma produção economicamente viável. Os aditivos funcionais têm sido cada vez mais explorados na aquicultura como alternativas mais seguras e sustentáveis para promover a saúde dos peixes e aumentar sua resistência a doenças. Fitoativos como imunomoduladores são frequentemente utilizados para manter a saúde dos peixes e prevenir doenças bacterianas. Sendo assim, uma alternativa que pode garantir a saúde dos peixes, a segurança alimentar e a sustentabilidade da produção aquícola. O objetivo nesta pesquisa foi avaliar os efeitos da suplementação alimentar com aditivos na resistência da tilápia do nilo à franciselose. Diferentes doses de yucca e quillaja combinadas (2g/kg e 1g/kg), extrato de quillaja (0,5g/kg) e um produto à base de levedura (3g/kg) foram examinadas como aditivos alimentares quanto à sua influência na saúde e na resistência de tilápia a infecção causada por *francisella orientalis*. O estudo consistiu em experimentos de 30, 60 e 90 dias de suplementação dietética onde as tilápias foram alimentadas com uma dieta basal suplementada com aditivos. Após sessenta dias de alimentação suplementada, os aditivos influenciaram a concentração de proteína total e globulina. As taxas de sobrevivência foram significativamente maiores que as do controle no grupo alimentado com extrato de quillaja. Consequentemente, a sobrevivência em resposta à infecção foi marcadamente maior nos peixes que receberam aditivos em comparação com o grupo de controle. O uso de saponinas por mais 60 dias pode gerar danos a atividade respiratória dos leucócitos. Estas descobertas implicam que os aditivos funcionais têm o potencial de melhorar o sistema imunológico e melhorar a sobrevivência contra a infecção por franciselose, particularmente na suplementação dietética por 60 dias.

Palavras-chave: Fitoativos, imunomoduladores, planta, saúde, sobrevivência, suplementação dietética

USE OF FUNCTIONAL ADDITIVES TO CONTROL FRANCISELLOSIS IN TILAPIA *Oreochromis niloticus* (L.)

ABSTRACT - The quest for controlling and preventing francisellosis in tilapia is an important practice for economically viable production. Nutritional additives have increasingly been explored in aquaculture as safer and more sustainable alternatives to promote fish health and enhance their resistance to diseases. Phytoactives such as immunomodulators are often used to maintain fish health and prevent bacterial diseases. It is an alternative that can ensure fish health, food safety, and aquaculture production sustainability. The aim of this research was to evaluate the effects of dietary supplementation with additives on Nile tilapia resistance to francisellosis. Different doses of saponin (2g/Kg and 1g/Kg), Quillaja extract (0.5 g/Kg), and a yeast-based product (3kg/ton) were examined as feed additives regarding their influence on the survival of tilapia challenged with *Francisella orientalis* (Fo). The study consisted of two experiments where tilapia were fed a basal diet mixed with feed additives; the first lasting for 60 days and the second extended to 90 days of dietary supplementation. After sixty days of supplemented feeding, the additives influenced the concentration of total protein, globulin, and the innate immune system response. Survival rates were significantly higher than those of the control in the group fed with Quillaja extract. Consequently, survival in response to infection was markedly higher in fish receiving additives compared to the control group. The use of saponins for long time can cause damage to the respiratory activity of leukocytes. These findings imply that food additives have the potential to enhance the immune system and improve survival against francisellosis infection, particularly in 60-day dietary supplementation.

KeyWords: Dietary supplementation, health, phytoactives, plant, survival



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Inclusão de aditivos na alimentação de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): efeitos no desempenho, parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos e, sobrevivência após desafio bacteriano com *Francisella orientalis***", protocolo n.º 003928/23, sob a responsabilidade da Profa. Dra. FABIANA PILARSKI, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP.

Vigência do Projeto	27/07/2023 a 27/10/2023
Espécie / Linhagem	Tilápia, <i>Oreochromis niloticus</i>
Nº de animais	1010
Peso / Idade	15 g
Sexo	Macho
Origem	Piscicultura comercial

Jaboticabal, 14 de junho de 2023.

Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Vice-coordenadora em exercício – CEUA FCAV

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fcav.unesp.br

Capítulo 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies mais proeminentes na aquicultura, sendo cultivada em diversas regiões do mundo devido à sua adaptabilidade, crescimento rápido e carne de alta qualidade (Munguti et al., 2022). No entanto, a aquicultura enfrenta desafios sanitários que prejudicam a produtividade desses peixes.

A franciselose, causada pela bactéria *Francisella*, é uma doença que afeta diversas espécies de peixes, incluindo a tilápia do Nilo. A disseminação da franciselose tem gerado crescente preocupação, uma vez que pode levar a sérios impactos econômicos nas operações aquícolas (Soto et al., 2009; Leal et al., 2014).

O controle de doenças na aquicultura desempenha um papel crucial na manutenção da saúde e na sustentabilidade dos sistemas aquícolas. As infecções bacterianas representam uma ameaça significativa para os peixes cultivados (Teixeira-Alves et al., 2020; Ferreira et al., 2021; Bouwmeester et al., 2022). A importância desse controle consiste não apenas na proteção da saúde dos peixes, mas também na preservação do equilíbrio ecológico dos ecossistemas aquáticos. As bacterioses podem se espalhar rapidamente em ambientes de cultivo, afetando negativamente a qualidade da água, a eficiência do crescimento dos peixes e rentabilidade da produção aquícola (Chiew et al., 2019; Mzula et al., 2021).

A prevenção e o controle das bacterioses na aquicultura contribuem para a minimização do uso de antibióticos, uma prática que pode levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana. A resistência bacteriana e produção de resíduos representam uma ameaça global à saúde pública e ambiental, destacando a importância de estratégias sustentáveis de controle de doenças na aquicultura (Assane et al., 2019; Assane et al., 2022).

Técnicas de controle de bacterioses na aquicultura incluem medidas de biossegurança, práticas de manejo adequadas, uso responsável de agentes antimicrobianos e implementação de estratégias de vacinação (Freitas et al., 2020;

Scarfe et al., 2020. Além disso, a promoção da saúde dos peixes através do uso de aditivos pode fortalecer a resistência natural dos peixes contra patógenos bacterianos (Fazlolahzadeh et al., 2011; Harikrishnan et al., 2011).

Portanto, é essencial compreender e desenvolver estratégias eficazes para controlar a franciselose, a fim de garantir a sustentabilidade da produção de tilápia. O uso de aditivos alimentares pode ajudar a garantir a produção de peixes saudáveis, minimizando riscos na cadeia produtiva. Nesse contexto, o objetivo nesta pesquisa foi avaliar os efeitos da inclusão de aditivos na alimentação de tilápia do Nilo para o controle da franciselose.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aquicultura Mundial

A aquicultura tem apresentado um crescimento notável nas últimas décadas, tornando-se uma das produções de alimentos de mais rápido crescimento no mundo. Isso se deve à crescente demanda por proteína animal e ao avanço das técnicas de cultivo (FAO, 2022). Essa atividade não se limita apenas à produção de peixes. Ela abrange uma variedade de organismos aquáticos, incluindo camarões, moluscos (como ostras e mexilhões), algas, crustáceos, e até mesmo espécies marinhas ornamentais (IBGE, 2022).

No âmbito da segurança alimentar a aquicultura desempenha um papel crucial, fornecendo uma fonte confiável de proteína de alta qualidade. Com a população mundial em constante crescimento, a produção de alimentos provenientes da pesca e da aquicultura se tornou fundamental para garantir que as necessidades alimentares sejam atendidas (Chen et al., 2020; Rosa et al., 2020; Norman et al., 2019).

A produção de peixes não apenas fornece alimentos, mas também tem um impacto econômico significativo. Ela gera empregos em áreas costeiras e rurais, impulsionando a economia local e nacional (Mulokozi et al., 2020; Siqueira, 2021). Além disso, a exportação de produtos aquícolas é uma importante fonte de receita

em muitos países (Boyd et al., 2020; Sampantamit et al., 2020; Mugimba et al., 2021; Young et al., 2019) .

Por tanto, a aquicultura é uma produção com rápido crescimento que desempenha um papel crítico na segurança alimentar, na economia global e na preservação de recursos naturais. Para um crescimento sustentável e a mitigação dos impactos ambientais, a pesquisa, a regulamentação eficaz e a inovação tecnológica são essenciais para enfrentar os desafios e garantir um futuro alimentar seguro e sustentável.

2.2 Aquicultura brasileira: Crescimento x Desafios

A aquicultura no Brasil é um setor em expansão com grande importância na produção de alimentos e no desenvolvimento econômico do país. Com um vasto litoral, rios extensos e uma rica biodiversidade aquática, o Brasil possui condições ideais para a expansão da aquicultura, o que tem resultado em um crescimento notável ao longo dos anos (Marques et al., 2020; Nobile et al., 2020; Valenti et al., 2021).

O Brasil é um dos líderes da aquicultura na América Latina e ocupa uma posição destacada no cenário mundial. O setor tem crescido significativamente nas últimas décadas, impulsionado por um aumento na demanda por proteína animal, a diversificação da produção aquícola e os investimentos em tecnologia e infraestrutura (PEIXEBR, 2022).

A aquicultura brasileira é caracterizada por uma diversidade de espécies cultivadas. Além da tilápia, que é a espécie mais produzida, outros organismos aquáticos, como camarões, trutas, pacus, tambaquis e moluscos, também são cultivados em diferentes regiões do país. Isso contribui para a variedade de produtos aquáticos disponíveis no mercado brasileiro (Calixto et al., 2020; Louis et al., 2022).

A tilápia, especialmente a tilápia do Nilo, é uma das espécies de peixe mais amplamente cultivadas em sistemas de piscicultura brasileira (Magouz et al., 2019; Nobrega et al., 2020). A produção de tilápia no Brasil alcançou 550.060 toneladas, o

que representa 63,93% da produção nacional de peixes de cultivo em 2022. Com essas demandas interna e global, a tendência é a expansão se intensificar (PEIXEBR 2023). Essa produção destaca-se como um dos setores de cultivo de peixes mais prósperos do país.

Nos últimos anos, a produção de tilápia tem experimentado altas taxas de crescimento. A facilidade de cultivo, o rápido crescimento e a capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais tornam a tilápia uma escolha atraente para os piscicultores (FAO, 2022). Esse crescimento é evidenciado pela crescente procura de tilápia no mercado nacional e internacional.

A tilapicultura está distribuída de Sul a Nordeste, com destaque para os dois maiores produtores da espécie o Paraná (187.800 toneladas) e São Paulo (77.300 toneladas) (PEIXEBR, 2023). Isso demonstra a adaptabilidade da tilápia a diferentes condições climáticas e geográficas, bem como a capacidade de atender à demanda de diferentes regiões do país.

O mercado interno para a tilápia continua a crescer, com a tilápia se tornando uma opção procurada para os consumidores brasileiros. Além disso, o Brasil exporta tilápia para diversos países (a espécie representa 88% das exportações brasileiras de pescado), consolidando sua posição como quarto maior produtor e um dos principais exportadores dessa espécie (PEIXEBR, 2023).

Nesse cenário, a aquicultura brasileira tem um futuro promissor, mas também desafiador. À medida que a demanda continua a crescer, o setor tem a oportunidade de alavancar no desenvolvimento econômico. No entanto, é fundamental que o crescimento seja sustentável, equilibrando as necessidades de produção com a conservação dos recursos aquáticos (Valenti et al., 2021).

O desafio para o setor é garantir que esse crescimento seja sustentável, adotando práticas responsáveis e inovadoras. Com um compromisso contínuo com a sustentabilidade, a produção de tilápia no Brasil pode continuar a ser um pilar importante na oferta de alimentos e na economia do país.

2.3 Sistema imunológico dos peixes

O sistema imunológico da tilápia é um mecanismo de defesa complexo e altamente coordenado que desempenha um papel crucial na proteção desses peixes contra patógenos e na manutenção de sua saúde. O sistema imunológico é composto por componentes (imunidade inata e adaptativa) e mecanismos (Fagocitose, citocinas e quimiocinas, anticorpos e sistema complemento) (Ranzani-Paiva et al., 2013; Kordon et al., 2018; Sahoo et al., 2020). Compreender os componentes e mecanismos do sistema imunológico, bem como os fatores que o influenciam, é crucial para a produção saudável de tilápia.

A imunidade da tilápia é influenciada por fatores ambientais, nutrição, variação genética e enfermidades. Ambientalmente, a má qualidade da água pode enfraquecer a resposta imunológica dos peixes, tornando-os mais suscetíveis a doenças (Bille e Takahashi, 2018; Moynihan e Cohen, 2018; Urbinati et al., 2020). A nutrição adequada é essencial para o desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico (Hoseini et al., 2020; Mendivil, 2021). A presença de patógenos (bactérias, vírus e parasitas) pode estimular o sistema imunológico. Em meio a tudo, a seleção genética para resistência a doenças tem sido uma abordagem essencial para aumentar a capacidade imunológica geral de tilápias cultivadas (Abo-Al-Ela, 2018; Sudhagar et al., 2018).

O sistema imunológico dos peixes é um complexo conjunto de componentes que desempenham um papel fundamental na defesa contra patógenos e na manutenção da saúde geral (Biller-Takahashi, 2014). O sistema imunológico inato dos peixes é uma linha de defesa fundamental que atua de maneira rápida e não específica contra patógenos, fornecendo uma barreira eficaz desde o primeiro contato com agentes invasores. Diferentemente do sistema imunológico adaptativo, o inato não requer exposição prévia aos patógenos e age de maneira generalizada (Yano, 1996; Kubitza e Kubitza, 2013)..

A primeira linha de defesa são a pele e as mucosas, que formam uma barreira física essencial. A pele, além de ser um escudo físico, contém células especializadas, como células de muco, que produzem substâncias antimicrobianas,

auxiliando na prevenção da entrada de patógenos no organismo (Biller-Takahashi e Urbinati, 2014).

As brânquias também desempenham um papel crucial no sistema imunológico inato dos peixes, pois representam uma interface importante com o ambiente aquático. Elas são equipadas com células imunes, como macrófagos e células semelhantes a mastócitos, que atuam na fagocitose e na resposta inflamatórias (Dalmo et al., 1997; Koppang et al., 2015; Salinas, 2015).

As células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, são peças-chave do sistema inato, englobando e destruindo patógenos invasores. Essas células reconhecem padrões moleculares associados a patógenos, desencadeando uma resposta imunológica rápida e não específica (Magnadóttir, 2006; Uribe et al., 2011; Silva et al., 2012; Monteith et al., 2021).

O sistema complemento, composto por uma série de proteínas plasmáticas, também contribui para o sistema imunológico inato dos peixes. Ele pode ser ativado por diferentes vias e desencadeia reações que resultam na opsonização e lise de patógenos, auxiliando na remoção eficaz desses invasores (Holland e Lambris, 2002; Boshra et al., 2006).

Células NK (células assassinas naturais) representam outra linha de defesa importante. Essas células têm a capacidade de identificar e destruir células infectadas por vírus, contribuindo para a resposta antiviral dos peixes (García-Valtananen et al., 2017; Sahoo et al., 2021)..

Além disso, os peixes possuem células fagocíticas inespecíficas, como os trombócitos, que desempenham funções multifuncionais na resposta imunológica, incluindo fagocitose e liberação de mediadores inflamatórios. (Biller-Takahashi e Urbinati, 2014; Esteban et al., 2015; Stosik et al., 2019).

O sistema imunológico inato dos peixes reflete a adaptação evolutiva desses organismos aquáticos às pressões do ambiente aquático, fornecendo uma resposta imunológica eficiente e imediata contra uma ampla variedade de patógenos. Essa

complexa rede de defesa contribui significativamente para a sobrevivência e saúde dos peixes em seu habitat natural e em sistemas de aquicultura (Jorgensen, 2014).

Diferentemente dos mamíferos, os peixes apresentam um sistema imunológico adaptativo menos desenvolvido, mas o sistema inato deles é robusto e eficaz. Esse sistema representa uma forma mais especializada e específica de resposta a patógenos, diferenciando-se do sistema imunológico inato por sua capacidade de reconhecimento preciso e memória imunológica. Esse sistema evoluiu para permitir uma resposta mais específica a organismos invasores e aumentar a eficácia da defesa imunológica ao longo do tempo (Secombes e Belmonte, 2016).

Uma das principais características do sistema imunológico adaptativo dos peixes é a presença de linfócitos B e T, células especializadas na resposta imune adaptativa. Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos, moléculas que se ligam especificamente a antígenos, marcadores encontrados na superfície de patógenos. Esses anticorpos ajudam a neutralizar e eliminar os patógenos do organismo do peixe (Scapigliati, 2013; Scapigliati et al., 2018).

Os linfócitos T desempenham um papel crucial na resposta imune celular. Eles reconhecem antígenos específicos e coordenam a resposta imune, direcionando a eliminação de células infectadas. Essas células também estão envolvidas na formação de uma memória imunológica, permitindo uma resposta mais rápida e eficaz em exposições subsequentes ao mesmo patógeno (Scapigliati et al., 2018; Tian et al., 2022).

A tilápia produz várias citocinas e quimiocinas, como interleucinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferons, para regular as respostas imunológicas. Essas moléculas sinalizadoras auxiliam no recrutamento e ativação de células imunológicas (Zou e Secombes, 2016; Li et al., 2023)..

A especificidade do sistema imunológico adaptativo é essencial para garantir uma resposta direcionada a patógenos específicos. O processo de seleção clonal permite que as células do sistema imunológico adaptem-se e proliferem em resposta à exposição a antígenos específicos, desenvolvendo uma memória imunológica

duradoura (Secombes e Wang, 2012; Kordon et al., 2021). Diferentes subclasses de anticorpos podem ser geradas para atender a uma variedade de desafios patogênicos. Essa capacidade de resposta flexível é crucial para enfrentar a complexidade e a diversidade de patógenos no ambiente aquático (Kordon et al., 2021).

2.4 Bacterioses na Produção de Tilápia

A produção de tilápia enfrenta uma série de desafios, dos quais as enfermidades são particularmente preocupantes (De Pádua e Da Cruz, 2014). Bacterioses são doenças causadas por bactérias patogênicas que afetam os peixes em diferentes estágios de crescimento, representando uma ameaça à saúde dos peixes e à produtividade da aquicultura (Irshath et al., 2023).

Várias espécies de patógenos são responsáveis por bacterioses em tilápias. Alguns dos patógenos mais comuns incluem *Streptococcus* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacterium* spp e *Francisella* spp. Essas bactérias podem causar uma série de sintomas, incluindo lesões na pele, úlceras, deformações nas nadadeiras, inchaço abdominal e, em casos graves, a morte dos peixes (Dong et al., 2017; Assane et al., 2019; Delphino et al., 2019; Rodrigues et al., 2019; Pulpipat et al., 2019; Haenen et al., 2023; Irshath et al., 2023).

Streptococcus é um gênero de bactérias Gram-positivas pertencentes à família Streptococcaceae. A estreptococose em peixes é causada principalmente por cepas de *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae* e *Streptococcus dysgalactiae*. Estas bactérias podem infectar várias espécies de peixes de água doce e salgada, incluindo tilápias, trutas, salmões e bagres (Romalde et al., 2008; Bethke et al., 2017; Laith et al., 2017; El-Noby et al., 2021; Nikolaisen et al., 2021; Zhang et al., 2021).

Os sinais da estreptococose em peixes podem variar dependendo da espécie afetada e da cepa específica de *Streptococcus* envolvida. No entanto, os sinais clínicos comuns incluem lesões na pele, como úlceras e erupções cutâneas,

hemorragias internas, ascite, exoftalmia e letargia (El-Noby et al., 2021; Sudpraseart et al., 2021).

Aeromonas spp. é uma bactéria Gram-negativa amplamente distribuída em ambientes aquáticos. Algumas cepas de *Aeromonas* podem ser patogênicas para peixes, causando infecções graves, como a aeromonose. Os sintomas incluem úlceras na pele, hemorragias e mortalidade (Beaz-Hidalgo e Figueras, 2013; Menanteau-Ledouble et al., 2016; Mzula et al., 2019; Assane et al., 2021; Thirumalaikumar et al., 2021)

Flavobacterium spp. é um grupo de bactérias Gram-negativas pertencentes à família Flavobacteriaceae. Essas bactérias são comumente encontradas no ambiente aquático, incluindo água doce e salgada, sedimentos. Algumas espécies de *Flavobacterium* são conhecidas por serem patogênicas para peixes, causando a flavobacteriose (Kumru et al., 2020; Lee et al., 2023).

A flavobacteriose é uma doença que pode afetar uma variedade de espécies de peixes cultivados em sistemas aquícolas. Os sinais da flavobacteriose podem variar dependendo da espécie de peixe, da cepa bacteriana envolvida e das condições ambientais. No entanto, os sinais clínicos comuns incluem lesões na pele, como úlceras e manchas escuras, hemorragias internas e inflamação das brânquias e letargia (Orieux et al., 2013; Hai et al., 2020; Elgendy et al., 2022; Lee et al., 2023).

A ocorrência de bacterioses é influenciada por uma série de fatores, incluindo estresse ambiental, qualidade da água, densidade de estocagem, temperatura e a presença de portadores assintomáticos dos patógenos. Os surtos de doenças bacterianas são frequentemente desencadeados por mudanças nas condições de criação (Reid et al., 2019; Lieke et al., 2020).

A transmissão das bacterioses entre os peixes pode ocorrer de várias maneiras, incluindo contato direto entre indivíduos infectados, água contaminada, consumo de alimentos contaminados e ferimentos na pele dos peixes. Fatores como superpopulação, estresse ambiental, má qualidade da água e nutrição inadequada podem aumentar o risco de infecção (Irshath et al., 2023).

As bacterioses representam um desafio significativo para a produção de tilápia, uma vez que podem resultar em perdas substanciais de peixes, causando prejuízos econômicos. O controle das bacterioses na produção de tilápia envolve uma série de estratégias preventivas e terapêuticas. A manutenção de boas práticas de manejo, como o monitoramento constante das condições de criação, a melhoria da qualidade da água, a redução do estresse e a alimentação balanceada, são fundamentais para prevenir doenças (Ghosh et al., 2020; Lieke et al., 2020; Mondal e Thomas, 2022).

2.5 Franciselose em tilápia do Nilo

A franciselose, uma doença bacteriana causada pela bactéria *Francisella orientalis* (*F. orientalis*), emergiu como um desafio na aquicultura, especialmente na produção de tilápia. O impacto econômico e ecológico dessa enfermidade a torna uma questão de importância crescente no setor. A franciselose é uma doença que tem despertado crescente preocupação na produção de tilápia do Nilo (Soto et al., 2009; Leal et al., 2014; Soto et al., 2019; Ramirez-Paredes et al., 2020).

F. orientalis é uma espécie do filo das Proteobactérias e da família Francisellaceae. É uma bactéria cocobacilo pleomórfico, apresentando dimensões que variam entre 0,2-0,4 µm e 0,4-1,7 µm, gram-negativo, estritamente aeróbio, imóvel, com metabolismo dependente de cisteína, com resultado fracamente positivo no teste de catalase, positivo no teste de gelatinase, negativo no teste de citocromo oxidase e incapaz de metabolizar D-alanina como fonte de carbono. Suas colônias exibem uma textura mucosa e podem variar em coloração, indo de branca-acinzentada a cinza-esverdeada (Birkbeck et al., 2011; Ramirez-Paredes et al., 2020).

Classificada antes como *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, em 2020 passou a ser *Francisella orientalis* após reclassificação com base em parâmetros genômicos, fenotípicos (fingerprint metabólico) e quimiotaxonômicos (ácidos graxos celulares, quinonas) (Ramirez-Paredes et al., 2020).

F. orientalis é um patógeno intracelular, o que significa que podem infectar células hospedeiras, evitando a resposta imunológica e tornando o tratamento mais desafiador. A patogenia envolve a invasão das células hospedeiras e a destruição dos tecidos afetados (Soto et al. 2009).

A franciselose é caracterizada por sinais que podem variar em gravidade, mas frequentemente incluem apatia, natação errática, perda de peso, úlceras cutâneas, hemorragias internas e, em estágios avançados, uma taxa alarmante de mortalidade. Os impactos nos peixes afetados são devastadores, resultando em perdas econômicas. Além disso, a doença pode comprometer a qualidade da carne dos peixes afetados, prejudicando a comercialização dos produtos (Soto et al., 2009; Soto et al., 2013).

A alta mortalidade associadas à franciselose pode levar além de perdas econômicas, um desequilíbrio no ecossistema aquático onde esses peixes são cultivados, afetando a biodiversidade e a saúde geral do ambiente. A disseminação da doença de sistemas de cultivo para a fauna aquática natural é uma preocupação, uma vez que *Francisella* é uma ameaça para a vida selvagem aquática (Soto et al., 2013). Portanto, o controle eficaz dessa doença não é apenas crucial para a produção de tilápia do Nilo, mas também para a preservação do equilíbrio ecológico nas áreas de cultivo.

Tilápias podem ser acometidas por franciselose em todas as fases de cultivo, mas principalmente peixes jovens durante os meses de outono e inverno, quando a temperatura da água diminui, situando-se entre 22-24°C. Isso resulta em elevadas taxas de mortalidade, chegando a atingir até 80% dos lotes. (Soto et al., 2009; Ramirez-Paredes et al., 2017). A gravidade dos sinais, os prejuízos econômicos e os impactos ambientais fazem da franciselose uma doença de grande relevância na tilapicultura.

2.6 Uso de antimicrobianos no Controle de Bacterioses

Os peixes estão suscetíveis a doenças devido à alta densidade em que são criados e às condições de estresse a que são submetidos (Guardabassi e Kruse, 2010). Para controlar os surtos de enfermidades, o uso de antimicrobianos tem se

destacado como uma estratégia. Esses antimicrobianos consistem em substâncias químicas ou produtos farmacêuticos que visam tratar e prevenir a propagação de doenças (Okocha et al., 2018).

Antimicrobianos são amplamente empregados no tratamento de bacterioses na produção aquícola. No entanto, o uso indiscriminado dessas substâncias pode acarretar diversos problemas para os animais cultivados, o meio ambiente e a promoção de cepas resistentes (Preena et al., 2020). No Brasil, apenas duas substâncias, a tetraciclina e o florfenicol, são legalizadas para esse fim. Além disso, o tratamento de enfermidades bacterianas, quando identificado em produções comerciais, apresenta desafios significativos em termos de manejo e custos econômicos elevados (Tavares-Dias e Martins, 2017).

Os antibióticos são as substâncias mais utilizadas para tratar peixes doentes e reduzir a disseminação da infecção. Antibióticos como a oxitetraciclina e florfenicol são utilizados no tratamento de infecções na aquicultura (Soltan et al., 2013). No entanto, somente florfenicol é licenciado para a tilapicultura brasileira. O uso responsável e monitorado de antimicrobianos é fundamental para evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana (Moreira, 2012; Assane et al., 2022).

As duas formas mais comuns de administrar antimicrobianos em peixes incluem a incorporação em rações medicadas e a adição direta na água (conhecida como terapia de imersão), ambas recomendadas no tratamento dos animais. Contudo, é importante notar que alguns antimicrobianos não são totalmente metabolizados pelos peixes e são eliminados diretamente no ambiente através das fezes. Aproximadamente 75% dos antibióticos administrados na ração dos peixes são excretados na água (Romero e Feijoó, 2012).

Adicionalmente, observa-se a aplicação de uma variedade de quimioterápicos, antiparasitários, vermícidias e fungicidas em campo, muitas vezes sem supervisão técnica adequada ou respaldo científico sobre os métodos de aplicação. Isso acarreta riscos para a saúde dos animais, consumidores e o meio ambiente (Lunestad e Samuelsen, 2008; De Freitas et al., 2024).

É importante destacar que o uso de substâncias terapêuticas na aquicultura requer um alto nível de responsabilidade. O uso indiscriminado dessas moléculas podem ter consequências negativas, como resíduo no filé, contaminação ambiental e o desenvolvimento de resistência microbiana (Read e Fernandes, 2003; Tavechio et al., 2009; BurrIDGE et al., 2010; Assane et al., 2024).

Os antimicrobianos ainda são a principal ferramenta para o controle de doenças. No entanto, a utilização destes deve ser cautelosa para evitar danos na segurança alimentar e no meio ambiente. A presença de resíduos de antimicrobianos nos produtos aquáticos representa um risco para a saúde humana quando esses produtos são consumidos (Wang et al., 2022; De Freitas et al., 2023; Li et al., 2023; Assane et al., 2024). Além disso, a liberação desses compostos na água pode causar impactos negativos no meio ambiente, incluindo a contaminação de ecossistemas aquáticos e a seleção de cepas de bactérias resistentes em ambientes naturais.

Uma das preocupações mais discutidas é a resistência microbiana. O uso inadequado de antimicrobianos na aquicultura tem contribuído para o desenvolvimento de bactérias resistentes a esses compostos. Isso não apenas torna o tratamento de infecções mais difícil, mas também representa uma ameaça significativa à saúde humana, pois cepas resistentes podem ser transferidas da aquicultura para a cadeia alimentar humana (Smith, 2008; Romero et al., 2012).

Os meios pelos quais as bactérias desenvolvem resistência aos antimicrobianos compreendem a desativação do antibiótico através da síntese de enzimas, como as β -lactamases. Além disso, a resistência pode ocorrer pela redução da concentração intracelular, alcançada através da diminuição da permeabilidade da membrana externa em bactérias Gram-negativas ou pelo uso de bombas de efluxo. Outra estratégia de resistência envolve a modificação do local ativo, onde ocorre a ação do antibiótico. Esses mecanismos são adaptações que as bactérias desenvolvem para enfrentar a pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos, resultando na resistência a essas substâncias antimicrobianas (Nested et al., 1998; Kocsis et al., 2013).

Para lidar com essas preocupações, é crucial promover o uso responsável de antimicrobianos na aquicultura. Isso envolve a aplicação de dosagens adequadas e o monitoramento rigoroso dos resíduos de antimicrobianos nos produtos de consumo (Assane et al., 2024; De Freitas et al., 2023). Além disso, é essencial buscar alternativas sustentáveis, como uso de aditivos nutricionais, vacinação, práticas de manejo eficazes e o desenvolvimento de sistemas de cultivo que reduzam a necessidade de tratamentos químicos (Yamashita et al., 2017; Assane et al., 2019; Barnes et al., 2021; De Sousa et al., 2021).

A busca de antimicrobianos terapêuticos continua a explorar novas substâncias e abordagens para o controle de doenças, visando reduzir a dependência de antibióticos e produtos químicos. Alternativas sustentáveis, como vacinas, aditivos nutricionais e técnicas de manejo eficazes, estão sendo desenvolvidas para combater doenças de maneira mais segura e responsável.

2.7 Aditivos

O fortalecimento do sistema imunológico da tilápia desempenha um papel fundamental e uma abordagem eficaz envolve a utilização de aditivos alimentares na dieta (Ahmadifar et al., 2021; Liu et al., 2022; Acunha et al., 2023). A busca por estratégias de controle de bacterioses pode promover o desenvolvimento de práticas mais sustentáveis na aquicultura (Harikrishnan et al., 2011; Assefa e Abunna, 2018; Opiyo et al., 2018).

O uso de aditivos funcionais na aquicultura, visando o aprimoramento do sistema imunológico de tilápias e o controle de bacterioses representa uma abordagem eficaz para promover a saúde e a resistência desses peixes em ambientes de cultivo. Diversos aditivos comerciais são formulados para fortalecer as defesas naturais das tilápias, contribuindo para uma resposta imunológica mais robusta (Kord et al., 2022; Cornélio, 2023)

A utilização de aditivos imunomoduladores não apenas visa fortalecer as defesas imunológicas, mas também pode ter impactos positivos na taxa de crescimento, na eficiência alimentar e na sobrevivência das tilápias. Além disso, ao

promover um ambiente aquático mais saudável, esses aditivos contribuem para a sustentabilidade da aquicultura, reduzindo a necessidade de tratamentos antibióticos e minimizando os riscos associados à resistência bacteriana (Amlashi et al., 2011; Chakraborty et al., 2014; Reverter et al., 2014; Vanderzwalmen et al., 2019).

Existem diversos tipos de aditivos comerciais entre os quais os de origem vegetal. Os extratos vegetais são boas fontes de compostos bioativos (fenólicos, alcaloides, polifenóis, polipeptídeos e lectinas). Esses aditivos resultaram em melhor saúde e desempenho de crescimento de várias espécies (Coutteau et al., 2011). Fitogênicos são produtos de origem vegetal que são incorporados à ração com o objetivo de melhorar estado de saúde e melhoria do crescimento dos animais. Estes são usados como aditivos na produção de rações para gado, e recentemente estão sendo utilizados na fabricação de rações para aquicultura (Citarasu, 2010). Além dos fitogênicos, os prebióticos estão entre os aditivos promissores da aquicultura.

A inclusão de prebióticos na alimentação da tilápia desempenha um papel importante na promoção do equilíbrio da microbiota intestinal. Um microbioma saudável está diretamente relacionado a um sistema imunológico mais forte (Yuji-Sado et al., 2015; Amillano-Cisneros et al., 2023). Prebióticos são ingredientes que não são digeridos pelas enzimas digestivas do hospedeiro, mas que são fermentado pela microbiota do trato digestivo dos animais, contribuindo para o seu equilíbrio (De Mesquita e Andrade, 2021).

Os componentes ativos da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*/ SC) são compostos principalmente de β -Glucano, Mananligossacarídeos (MOS), glicoproteína e quitina. A parede celular de levedura destaca-se como uma fonte rica em beta-glucanos, que são conhecidos por estimular o sistema imunológico das tilápias. Essa estimulação imunológica não apenas fortalece as defesas naturais dos peixes contra patógenos, mas também contribui para uma resposta mais eficaz durante desafios infecciosos (Bowman e Free, 2006; Bzducha-Wróbel et al., 2014; Zhang et al., 2020).

A inclusão desses aditivos na dieta das tilápias também visa melhorar a saúde intestinal, estimulando o crescimento de bactérias benéficas no trato

gastrointestinal. Um sistema digestivo saudável favorece a absorção eficiente de nutrientes, resultando em um melhor aproveitamento da dieta e, conseqüentemente, em um crescimento mais eficaz das tilápias (Yilmaz et al. 2007).

Outro ponto relevante é a contribuição para a resposta antioxidante. Componentes presentes na parede celular de levedura têm propriedades antioxidantes que ajudam a proteger as células das tilápias contra o estresse oxidativo, promovendo assim a resistência a condições adversas (Zhang et al., 2012 ; Dawood et al. 2017).

Os antioxidantes desempenham um papel importante na proteção das células das tilápias contra o estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode comprometer a eficácia do sistema imunológico, e os antioxidantes auxiliam na neutralização de radicais livres, promovendo a saúde celular e a resposta imunológica (Lu et al., 2019; Dawood et al., 2020; Fath El-Bab et al., 2022).

Os fitogênicos à base de saponinas têm se destacado como uma alternativa promissora na alimentação de peixes, apresentando diversos benefícios para sua saúde e desempenho em sistemas de aquicultura. As saponinas são glicosídeos encontrados em diversas plantas, conhecidas por suas propriedades biológicas, incluindo atividades imunomoduladoras e anti-inflamatórias (Behboudi e Morein, 1999; Francis et al., 2005; Fleck et al., 2019).

Yucca schidigera (*Y. schidigera* / YS) pertence à família Asparagaceae e tem sido amplamente utilizada devido às suas propriedades farmacológicas e nutricionais. A planta é rica em saponinas, polifenóis e esteróis. Outra planta rica em saponinas é a *Quillaja saponaria* Molina (*Q. saponaria* / QS), uma árvore medicinal tradicional nativa da região dos Andes, têm sido extensivamente investigadas para possíveis aplicações medicinais (Abozeid et al., 2021; Daí et al., 2023).

A inclusão de saponinas na dieta de peixes pode desencadear respostas imunológicas positivas. Essas substâncias têm a capacidade de modular o sistema imunológico, fortalecendo as defesas naturais dos peixes contra patógenos. Esse reforço imunológico contribui para uma resistência a doenças mais robusta,

reduzindo a suscetibilidade a infecções bacterianas e virais (Fernandes, 2014; Sannasimuthu et al., 2014; Cortés et al., 2023).

As saponinas melhoram a imunidade da tilápia do Nilo e resistência contra *Aeromonas hydrophila* com a adição de YS (0,1%) na água (NJAGI et al., 2017). Resultados semelhantes foram obtidos por Reham et al. (2019) para hematologia de tilápia do Nilo após uma implementação de YS em água por 93 dias. Amoah et al. (2017) relataram aumento da imunidade inata de bagres (*Silurus asotus*) com suplementação de 0,05% de YS por 8 semanas. Da mesma forma, Güroy et al. (2014) concluíram que a incorporação dietética de YS (0,15%) melhorou parâmetros hematológicos de *P. hypophthalmus*. Fayed et al. (2019) descobriram que a presença de YS (0,75 mg/L) na água melhora o perfil sanguíneo e a imunidade de juvenis de robalo europeu. E efeitos positivos das saponinas de QS foram observados nas respostas imunológicas de *Cyprinus carpio* var. *Jian* (Wang et al., 2015).

Além disso, as saponinas podem influenciar a resposta inflamatória nos peixes. Sua ação anti-inflamatória pode ser benéfica na mitigação do estresse oxidativo, proporcionando um ambiente interno mais equilibrado. Reduzir a inflamação também está associado a uma melhoria na eficiência alimentar e no crescimento dos peixes, contribuindo para uma produção mais eficaz (Cortés et al., 2023).

Outro aspecto relevante é a potencial influência das saponinas na melhoria da digestibilidade dos nutrientes. A promoção da saúde intestinal é essencial para a absorção eficiente de nutrientes, e as saponinas podem desempenhar um papel nesse contexto, estimulando o desenvolvimento de uma microbiota intestinal favorável (Johnson et al., 1986). Estudos relatam efeitos benéficos de saponinas na microbiota intestinal para melhorar a função imunológica em peixes (Angeles et al., 2017; Ma et al., 2017; Abozeid et al., 2021; Daí et al., 2023).

A incorporação de aditivos à base de levedura e saponinas na dieta da tilápia do Nilo visa otimizar o funcionamento do sistema imunológico, tornando os peixes mais resistentes a infecções e doenças. Isso não apenas resulta em uma taxa de

sobrevivência mais alta, mas também reduz a necessidade de tratamentos terapêuticos, como antibióticos.

REFERÊNCIAS

Abozeid AM, Abdel-Rahim MM, Abouelenien F, Elkaradawy, A, Mohamed RA (2021) *Quillaja saponaria* and/or *Yucca schidigera* ameliorate water quality, growth performance, blood health, intestine and gills histomorphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture Research** 52: 6117-6131.

Abu-Elala NM, Younis NA, Abubakr HO, Ragaa NM, Borges LL, Bonato MA (2018) Efficacy of dietary yeast cell wall supplementation on the nutrition and immune response of Nile tilapia. **The Egyptian Journal of Aquatic Research** 44: 333-341.

Acunha RMG, De Souza Sanches D, Dos Santos Almeida RG, Oliveira FC, Soares MP, Davalo MRS, De Campos CM (2023) O uso de imunomoduladores na alimentação de peixes: Uma revisão. **Research, Society and Development** 12: e11312440964 - e11312440964.

Amillano-Cisneros JM, Fuentes-Valencia MA, Leyva-Morales JB, Davizón YA, Marquéz-Pacheco H, Valencia-Castañeda G et al. (2023) Prebiotics in global and Mexican fish aquaculture: A review. **Animals** 13: 3607.

Amlashi AS, Falahatkar B, Sattari M, Gilani TMH (2011) Effect of dietary vitamin E on growth, muscle composition, hematological and immunological parameters of sub-yearling beluga (*Huso huso* L.). **Fish and Shellfish Immunology** 30: 807-814.

Angels IJ, Gallego LM, Navarro MAM, Chien Yew HCY (2017) Dietary effects of *Quillaja saponaria* and *Yucca schidigera* extract on rearing performance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. and its antioxidant capacity and metabolic response following hypoxic stress. **Journal of Aquaculture** 18: 403-414.

Assane IM, Gozi KS, Valladão GMR, Pilarski F (2019) Combination of antimicrobials as an approach to reduce their application in aquaculture: emphasis on the use of thiamphenicol/florfenicol against *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture** 507: 238–245.

Assane IM, Santos-Filho NA, Sousa EL, Arruda Brasil MCO, Cilli E M, Pilarski F (2021) Cytotoxicity and antimicrobial activity of synthetic peptides alone or in combination with conventional antimicrobials against fish pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology** 131: 1762–1774.

Assane IM, De Oliveira Neto RR, De Abreu DRF, Do Vale AO, Hashimoto DT, Pilarski F (2022) Genetic diversity, virulence, antimicrobial resistance genes, and antimicrobial susceptibility of Group B *Streptococcus* (GBS) linked to mass mortalities of cultured Nile tilapia in Brazil. **BioRxiv** 521911.

Assane IM, Damaceno MA, Campanharo SC, Da Silva AFB, De Sousa EL, Do Vale OA, De Abreu DRF, Kotzent S, De Jesus RB, Da Paz DJF, Paschoal JA R, Pilarski F (2024) Thiamphenicol and florfenicol combination in Nile tilapia: Simultaneous detection and quantification in plasma and muscle plus skin samples, and pharmacokinetics following single oral administration. **Aquaculture** 577: 739978.

Barnes AC, Silayeva O, Landos M, Dong HT, Lusiastuti A, Phuoc LH, Delamare Deboutteville J (2021) Autogenous vaccination in aquaculture: a locally enabled solution towards reduction of the global antimicrobial resistance problem. **Reviews in Aquaculture** 14: 907–918.

Beaz-Hidalgo R, Figueras MJ (2013) *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. **The Journal of Fish Diseases** 36: 371–388.

Bethke J, Avendaño-Herrera R (2017) Comparative genome analysis of two *Streptococcus phocae* subspecies provides novel insights into pathogenicity. **Marine Genomics** 31:53–61.

Birkbeck TH, Feist SW, Verner-Jeffreys DW (2011) Francisella infections in fish and shellfish. **Journal of Fish Diseases** 34: 173–187.

Bowman SM, Free SJ (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays** 28: 799–808, 2006.

Burridge L, Weis JS, Cabello F, Pizarro J, Bostick K (2010) Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture** 306: 7–23, 2010.

Bzducha-Wróbel SBA, Kawarska A, Stasiak-Róžańska L, Gientka I, Majewska E (2014) Evaluation of the efficiency of different disruption methods on yeast cell wall preparation for β -glucan isolation. **Molecules** 19: 20941–20961.

Chakraborty SB, Horn P, Hancz C (2014) Application of phytochemicals as growth promoters and endocrine modulators in fish culture. *Reviews in Aquaculture* 6: 1–19.

Chen W, Ali QH, Mai KS, Xu W, Liufu ZG, Zhang WB, Cai YH (2011) Effects of dietary soybean saponins on feed intake, growth performance, digestibility and intestinal structure in juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture** 318: 95-100.

Chern RS, Chao CB (1994) Outbreaks of a disease caused by rickettsia-like organism in cultured tilapias in Taiwan. **Fish Pathology** 29: 61–71.

Cornélio JPS (2023) Os benefícios do uso de aditivos na alimentação e saúde de peixes: uma revisão descritiva. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação** 2675–3375.

Cortés H, Castillo-Ruiz M, Cañon-Jones H, Schlotterbeck T, Martín RS, Padilla L (2023) In vivo efficacy of purified Quillaja saponin extracts in protecting against *Piscirickettsia salmonis* infections in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Animals** X: 2845.

Coutteau P, Van Halteren A, Ceulemans S (2011) Botanical extracts improve productivity of shrimp, *Pangasius*. **Global Aquaculture Advocate** 90-92.

Cruz PM, Ibáñez AL, Monroy Hermosillo AO, Ramírez Saad HC (2012) Use of probiotics in aquaculture. **ISRN Microbiology** 16: 916845.

Dai Z, Wang H, Liu J, Zhang H, Li Q, Yu X et al. (2023) Comparison of the effects of Yucca saponin, *Yucca schidigera*, and *Quillaja saponaria* on growth performance, immunity, antioxidant capability, and intestinal flora in broilers. **Animals** 13: 1447.

Dawood MAO, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, Basuini MF, Hossain MS, Nhu TH, Moss AS, Dossou S, Wei H (2017) Dietary supplementation of β -glucan improves growth performance, the innate immune response, and stress resistance of red sea bream (*Pagrus major*). **Aquaculture Nutrition** 23: 148–159.

Dawood MAO, Eweedah NM, Moustafa EM, Shahin MG (2020) Synergetic effects of *Aspergillus oryzae* and β -glucan on growth and oxidative and immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Probiotics and Antimicrobial Proteins** 12: 389–399.

De Freitas LVP, Da Mota Júnior CAA, Damaceno MA, Silveira JGF, Portela AC V, Campanharo SC, Da Silva AFB, Assane IM, Pilarski F, Sasanya JJ, Paschoal JAR (2023) Residue depletion profile and estimation of withdrawal period for sulfadimethoxine and ormetoprim in edible tissues of Nile tilapia (*Oreochromis sp.*) on medicated feed. **Animals** 13: 2499.

De Freitas LVP, Silveira JGF, Damaceno MA, Campanharo SC, Da Silva AF B, Da Silva JJM, Portela ACV, De Jesus RB, Sasanya JJ, Pilarski F, Rath S, Paschoal JAR (2024) Evaluating the persistence of malachite green residues in tilapia and pacu fish. **Environmental Toxicology and Pharmacology** 104382.

De Mesquita EDFM, Andrade FA (2021) Probiotics and prebiotics in fish aquaculture. **Probiotics and prebiotics in foods** 263, 2021.

De Sousa EL, Assane IM, Santos-Filho NA, Cilli EM, De Jesus RB, Pilarski F (2021) Haematological, biochemical and immunological biomarkers, antibacterial activity, and survival in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after treatment using antimicrobial peptide LL-37 against *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture** 533: 736181.

Delphino MKVC, Leal CAG, Gardner IA, Assis GBN, Roriz GD, Ferreira F, Figueiredo HCP, Gonçalves VSP (2019) Seasonal dynamics of bacterial pathogens of Nile tilapia farmed in a Brazilian reservoir. **Aquaculture** 498: 100–108.

Dong HT, Techatanakitarnan C, Jindakittikul P, Thaiprayoon A, Taengphu S, Charoensapsri W, Khunrae P, Rattanarojpong T, Senapin S (2017) *Aeromonas*

jandaei and *Aeromonas veronii* caused disease and mortality in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Journal of Fish Diseases** 40: 1395–1403.

Elgendy MY, Abdelsalam M, Mohamed AS, Ali SE (2022) Molecular characterization, virulence profiling, antibiotic susceptibility, and scanning electron microscopy of *Flavobacterium columnare* isolates retrieved from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture International** 30: 845–862.

El-Keredy, MAS, Naena NAA (2020) Yucca plant as treatment for *Pseudomonas aeruginosa* infection in Nile tilapia farms with emphasis on its effect on growth performance. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences** . 66: 64.

El-Noby A, Hassanin G, El-Hady M, Aboshabana MS (2021) *Streptococcus*: a review article on an emerging pathogen of farmed fishes. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries* 25: 123–139.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2022) **The state of world fisheries and aquaculture 2022: Towards blue transformation**. FAO, Rome, IT.

Fath El-Bab AF, Majrashi KA, Sheikh HM, Shafi ME, El-Ratel IT, Narmat-Allah ANF, El-Raghi AA, Abd Elazem AY, Abd Elghany MF, Abdelnour AS, Abduh MS, Jaremko M, NAIEL MAE (2022) Dietary supplementation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with β -glucan and/or *Bacillus coagulans*: Synergistic impacts on performance, immune response, redox status and expression of some related genes. **Frontiers in Veterinary Science** 9: 1011715.

Fazlolahzadeh F, Keramati K, Nazifi S, Shirian S, Seifi S (2011) Effect of garlic (*Allium sativum*) on hematological parameters and plasma activities of ALT and AST of rainbow trout in temperature stress. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences** 5: 84–90.

Fernandes RDN (2014) Uso de saponina de quilaia (*Quillaja saponaria* Molina) em juvenis de pacu. [S.l.: s.n.]. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, [UNESP]. Aleph 103.

Francis G, MAKKAR HPS, BECKER K (2001) Effects of Quillaja saponins on growth, metabolism, egg production, and muscle cholesterol in individually reared Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 129: 105-114.

Francis G, Makkar HPS, Becker K (2002) Dietary supplementation with a *Quillaja* saponin mixture improves growth performance and metabolic efficiency in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 203: 311–320.

Guardabassi L, Kruse H (2010) Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais. **Guia de antimicrobianos em veterinária** 17–30.

Hai LD, Chockmangmeepisan P, Sakulworakan R, Dong HT, Kayansamruaj P, Rung-Ruangkijkrui T, Rodkhum C (2020) Virulence properties and pathogenicity of *Flavobacterium columnare* in hybrid red tilapia (*Oreochromis* sp.). **The Thai Journal of Veterinary Medicine** 50: 103–108.

Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS (2011) Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture* 317: 1–15.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da aquicultura. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/>. Acesso em: 25 jan. 2024.

Irshath AA, Rajan AP, Vimal S, Prabhakaran VS, Ganesan R (2023) Bacterial pathogenesis in various fish diseases: Recent advances and specific challenges in vaccine development. **Vaccines** 11: 470.

Johnson IT, Gee JM, Price K, Curl C, Fenwick GR (1985) Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport in vitro. **The Journal of Nutrition** 116: 2270–2277.

Kocsis B, Mazzariol A, Kocsis E, Koncan R, Fontana R, Cornaglia G (2013) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* strains isolated in North-East Italy. **Antimicrobial Original Research Paper** 21: 36–40.

Kumru S, Tekedar HC, Blom J, Lawrence ML, Karsi A (2020) Genomic diversity in flavobacterial pathogens of aquatic origin. **Microbial Pathogenesis** 142: 104053.

Laith AA, Ambak MA, Hassan M, Sheriff SM, Nadirah M, Draman AS, Wahab W, Ibrahim WN, Aznan AS, Jabar A (2017) Molecular identification and histopathological study of natural *Streptococcus agalactiae* infection in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Veterinary World** 10: 101–111.

Leal CA, Tavares GC, Figueiredo HC (2014) Outbreaks and genetic diversity of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* isolated from farm-raised Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Brazil. **Genetic and Molecular Research** 13: 5704–5712.

Lee BH, Nicolas P, Saticioglu IB, Fradet B, Bernardet JF, Rigau deau D, Duchaud E (2023) Investigation of the genus *Flavobacterium* as a reservoir for fish-pathogenic bacterial species: the case of *Flavobacterium collinsii*. **Applied and Environmental Microbiology** 89: e02162-22.

Li Q, Ji K, Tang N, Li Y, Gu X, Tang K (2023) Vortex-ultrasonic assisted dispersive liquid-liquid microextraction for seven sulfonamides of fish samples based on hydrophobic deep eutectic solvent and simultaneous detecting with HPLC-PDA. **Microchemical Journal** 185: 108269.

Loddi MM, Gonzales E, Takita TS, Mendes AA, Roça RO (2000) Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia** 29: 1124–1131.

Lu DL, Limbu SM, Lv HB, Ma Q, Chen LQ, Zhang LM, Du ZY (2019) The comparisons in protective mechanisms and efficiencies among dietary α -lipoic acid, β -glucan and L-carnitine on Nile tilapia infected by *Aeromonas hydrophila*. **Fish and Shellfish Immunology** 86: 785–793.

Luo X, Liao G, Liu C, Jiang X, Lin M, Zhao C, Tao J, Huang Z (2018) Characterization of bacteriophage HN48 and its protective effects in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus agalactiae* infections. **Journal of Fish Diseases** 41: 1477–1484.

Menanteau-Ledouble S, Kumar G, Saleh M, El-Matbouli M (2016) *Aeromonas salmonicida*: Updates on an old acquaintance. **Diseases of Aquatic Organisms** 120: 49–68, 2016.

Moreira RPL (2012) *Desenvolvimento e validação de métodos multirresíduos para determinação de medicamentos veterinários em alimentos e em ração utilizando CL-EM/EM*. 188 p. Tese (Doutorado em Ciências – Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Mzula A, Wambura PN, Mdegela RH, Shirima GM (2019) Current state of modern biotechnological-based *Aeromonas hydrophila* vaccines for aquaculture: A systematic review. **BioMed Research International** 2019: 3768948.

Nested EW, Roberts CE, Pearsall NN, Anderson DG, Nester MT (1998) Antimicrobial medicine. In: TERRANCE, S., editor. *Microbiology: a human perspective*. 2. ed. New York: McGraw-Hill 447–470.

Nikolaisen NK, Lindegaard M, Lyhs U, Strube ML, Hansen MS, Struve T, Chriél M, Jensen LB, Pedersen K (2021) First finding of *Streptococcus phocae* infections in mink (*Neovison vison*). **Research in Veterinary Science** 139: 145–151.

Orieux N, Douet DG, Le Hénaff M, Bourdineaud JP (2013) Prevalence of *Flavobacterium psychrophilum* bacterial cells in farmed rainbow trout: Characterization of metallothionein A and interleukin-1 β genes as markers overexpressed in spleen and kidney of diseased fish. **Veterinary Microbiology** 162: 127–135.

PEIXE BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. *Anuário Peixe BR da piscicultura*, 2023. Disponível em: <www.peixebr.com.br/anuario2023>. Acesso em: 27 jan. 2024.

Pilarski F, Ferreira de Oliveira CA, Darpossulo de Souza FPB, Zanuzzo, FS (2017) Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology** 70: 25–29.

Ramirez-Paredes JG, Thompson KD, Metselaar MSK, Soto E, Richards RH, Penman DJ, Colquhoun DJ, Adams AA (2017) polyphasic approach for phenotypic and genetic characterization of the fastidious aquatic pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. **Frontiers in Microbiology** 8: 2324.

Ramirez-Paredes JG, Larsson P, Thompson KD, Penman DJ, Busse H, Öhrma C, Sjödin A, Soto E, Richards RH, Adams A, Colquhoun DJ (2020) Reclassification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* as *Francisella orientalis* sp. nov., *Francisella noatunensis* subsp. *chilensis* subsp. nov. and emended description of *Francisella noatunensis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 70: 2034–2048.

Read P, Fernandes T (2003) Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. **Aquaculture** 226: 139–163.

Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal P (2014) Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. **Aquaculture** 433: 50–61.

Romalde JL, Ravelo C, Valdés I, Magariños B, De La Fuente E, Martín CS, Avendaño-Herrera R, Toranzo AE (2008) *Streptococcus phocae*, an emerging pathogen for salmonid culture. **Veterinary Microbiology** 130: 198–207.

Romero J, Feijoó C, Navarrete, P (2012) Antibiotics in aquaculture – Use, abuse and alternatives. In: Carvalho, E., editor. **Health and Environment in Aquaculture**. InTech.

Sannasimuthu A, Brindha P, Chandrasekar S, Mariappan P, Antony A, Velanganni AJ, Harikrishnan, R (2014) Effects of saponin supplementation diet on immune response in *Cyprinus carpio* against *Aeromonas hydrophila*. In: **Proceedings of the 7th national symposium on advance research in biosciences**, Thanjavur, India, 2014.

Smith PR (2008) Guidelines for antimicrobial use in aquaculture. In: Guardabassi L, Jensen LB, Kruse H, editors. **Guide to antimicrobial use in animals** 207–218.

Soto E, Hawke JP, Fernandez D, Morales JÁ (2009) *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in Costa Rica. **Journal of Fish Diseases** 32: 713–722.

Soto E, Bowles K, Fernandez D, Hawke JP (2010) Development of a real-time PCR assay for identification and quantification of the fish pathogen *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. **Diseases of Aquatic Organisms** 89: 199–207.

Soto E, Illanes O, Hilchie D, Morales JÁ, Sunyakumthorn P, Hawke JP, Goodwin A E, Riggs A, Yanong RP, Pouder DB, Francis-Floyd R, Arauz M, Bogdanovic L, Castillo-Alcalá F (2012) Molecular and immunohistochemical diagnosis of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 24: 840–845.

Soto E, Primus AE, Pouder DB, Eorg RH, Gerlach TJ, CASSLE SE, Johnson T, Boyd S, Handsel T, Yanong RP (2014) Identification of *Francisella noatunensis* in novel host species French grunt (*Haemulon flavolineatum*) and Caesar grunt (*Haemulon carbonarium*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 45: 727–731.

Sudpraseart C, Wang PC, Chen SC (2021) Phenotype, genotype and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* isolated from cultured tilapia (*Oreochromis* spp.) in Taiwan. **Journal of Fish Diseases** 44: 747–756.

Tavechio W, Guidelli G, Portz L (2009) Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. **Boletim do Instituto de Pesca** 35: 335–341.

Thirumalaikumar E, Lelin C, Sathishkumar R, Vimal S, Anand SB, Babu MM, Citarasu T (2021) Oral delivery of PVAX-OMP and PVAX-Hly DNA vaccine using chitosan-tripolyphosphate (Cs-TPP) nanoparticles in rohu (*Labeo rohita*) for protection against *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & Shellfish Immunology** 115: 189–197.

Wang L, Niu J, Wei P, Feng Y, Ding M, He C, Ma Y, Zhu Y, Li J, Huang L, Zhang X (2022) Rapid determination of 2,4-diaminopyrimidine residues through sample

pretreatment using immunomagnetic bead purification along with HPLC–UV. **Food Chemistry** 376: 131835.

Xia Y, Wang M, Gao F, Lu M, Chen G (2020) Effects of dietary probiotic supplementation on the growth, gut health and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Animal Nutrition** 6: 69–79.

Yamashita MM, Pereira SA, Cardoso L, De Araújo AP, Oda CE, Schmidt C, Bouzon Z L, Martins ML, Mourinho JLP (2017) Probiotic dietary supplementation in Nile tilapia as prophylaxis against streptococcosis. **Aquaculture Nutrition** 23: 1235–1243.

Yilmaz MA, Gencl EG (2007) Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh** 59: 192–199.

Yuji-Sado, R, Raulino-Domanski F, Freitas PFD, Baioco-Sales F (2015) Crecimiento, estado inmunológico y morfología intestinal de la tilapia del Nilo alimentadas con prebióticos (Mananoligosacáridos-MOS) en la dieta. **Latin American Journal of Aquatic Research** 43: 944-952.

Zhang J, Liu Y, Tian L, Yang H, Llang G, Xu D (2012) Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology** 33: 1027–1032.

Zhang P, Yang F, Hu J, Han D, Liu H, Jin J, Yang Y, Yi J, Zhu X, Xie S (2020) Optimal form of yeast cell wall promotes growth, immunity and disease resistance in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). **Aquaculture Reports** 18: 100465.

Zhang Z (2021) Research advances on Tilapia streptococcosis. **Pathogens** 10: 558.

Capítulo 2 – Plant derived feed additive improves immune response and resistance to *Francisella orientalis* in Nile tilapia

Abstract

Feed additives have been reported to improve the immune system and health of tilapia. This research aimed to assess the impact of dietary supplementation with additives on the resistance of Nile tilapia to franciselosis. The effect of two different doses of Yucca and Quillaja blend, Quillaja extract, and a yeast-based product was evaluated on the immune status and survival of Nile tilapia challenged with *Francisella orientalis*. Five groups (YQ, YQS, QS, SC and CG)) were employed in this experiment, encompassing four diets, besides the control groups (challenged and unchallenged). The study consisted of two phases where Nile tilapias were fed a basal diet mixed with feed additives. The first phase lasted 30 days, and the second extended to 60 days of dietary supplementation. At the end of the first phase, the lowest cumulative mortality rate was observed in groups YQ (52%) and QS (50%). After 60 days of supplemented feeding, the additives impacted enhanced the concentration of total protein, globulin, and the innate immune system response. At the conclusion of the second phase, fish from the groups challenged with bacteria exhibited over than 50 % of mortality, whereas groups YQ and QS presented less than 50 % mortality. The survival rates were significantly higher in the group fed with quillaja extract than those in the challenged control ($p < 0.05$). These findings imply that feed additives have the potential to enhance the innate immune system and improve survival against franciselosis infection, particularly after sixty days of dietary supplementation.

Keywords: Dietary supplementation; fish health; Infection; Survival.

1 Introduction

The aquaculture play a fundamental role in the production of quality food for a population in constantly growing. However, intensive systems favors a stressful condition for fish, leading to more intense and frequent diseases outbreaks.(Ng and Koh, 2017). One of the greatest challenges for the development of aquaculture in line with the one health concept is the occurrence of bacterial diseases, such as francisellosis, caused by *Francisella orientalis* (*F. orientalis*). *F. orientalis* is a fastidious facultative intracellular bacterial pathogen that affects tilapia and its hybrids. This Gram-negative pathogen causes disease characterized by granulomatous inflammation with mortality rates that can exceed 80 % (Soto et al., 2009).

Francisellosis have a large economic impact in fingerlings and juveniles of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) aquaculture in the world and especially in Brazil in the winter months, when the water temperature in the South and Southeast regions is lower than 24 °C (Sebastião et al., Soto et al., 2009; Oliveira et al., 2022). Consistent with their intracellular nature, isolates of *F. orientalis* are resistant to the standard protocols for treatment. Thus, innovative and sustainable approaches are necessary for Francisellosis control.

The elective therapeutic strategy for francisellosis outbreaks is antibiotic therapy. However, its indiscriminate use may leads to antibiotic-resistant strains and poses potential risks to environment, which are global concerns (Han et al., 2020; Mo et al., 2020; Okeke et al., 2022) Additionally, commercial vaccines are still absent for prevention of francisellosis. Thus, the pursuit of preventive measures that are less harmful and more eco-friendly is of major importance for development of tilapia sustainable farming.

Nutritional additives enhance fish immunity and reduce the need for antibiotics, thus mitigate the risks associated with the development of bacterial resistance, adverse environmental impacts and issues regarding the consumer's health. Components such as

probiotics, prebiotics, and antioxidants work synergistically to modulate the immune response, promoting natural resistance against pathogens, including *F. orientalis* (Jacela et al., 2009). In addition to strength the immune defenses of fish, some nutritional additives can play direct effects on *F. orientalis*. Yeast extracts and saponins are commercial additives with potential to inhibit bacterial growth (Abdel-Tawwab et al., 2021; Cortés et al., 2023; Taoka et al., 2006), contributing to the effective control of francisellosis. However, the knowledge of intrinsic properties regarding the influence of these additives in the immune system of fish are limited. The combination of a compound which is immunostimulant and bactericidal seems to be an efficient and reliable alternative to antibiotics for control of *F. orientalis*. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of dietary supplementation with additives on the immune system and resistance of Nile tilapia against francisellosis.

2 Material and Methods

2.1 Animals, additives, and bacterial strain

The Nile tilapia (16.7 ± 0.8 g) were sourced from a commercial fish farm and stocked in tanks (500 L/ 25 ± 1.5 °C) for acclimatization during two weeks. A subsample of the population (n=10) was confirmed negative for parasites and bacteria by complete clinical analysis.

The additives QS (purified extract from *Q. saponaria*), SC (yeast cell wall of *S. cerevisiae*), YQ (compounds of *Y. schidigera* and *Q. saponaria* extract) and YQS (combination of YQ and SC) used in this research were produced and supplied by a health animal company, São Paulo, Brazil.

The strain of *F. orientalis* (Genbank OR514621) was isolated from a mortality outbreak on a tilapia farm and it is stored at the bank collection of the Laboratory of Microbiology and Parasitology of Aquatic Organisms (LAPOA).

The experimental procedures comply with the guidelines and were approved by the Ethics Committee for Animal Use of the Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences – UNESP (protocol no. 003928/23).

2.2 Growth condions of *F. orientalis*

The strain of *F. orientalis* was grown on modified Muller Hinton agar (MMH) supplemented with fetal bovine serum (3 %), glucose (1 %), and L-cysteine chloride (0.1 %) for 72 hours at 24 °C. Subsequently, a pure colony was transfered to MMH broth. Broth cultures was grown for 36 hours at 24 °C in a shaker at 170 rpm. After bacterial growth, the culture was centrifuged (3000 g/4 °C/10 min). The inoculum was adjusted to 0.5 at OD₆₂₅, and the concentration was confirmed through counting of serial dilutions (1:9, inoculum/sterile phosphate buffered saline PBS).

2.3 Diet preparation

The experimental diet was formulated to meet the nutritional requirements of the species (Table 1). The experimental diets were prepared at the Fisheries Institute in São José do Rio Preto, São Paulo. The diet was produced by the extrusion of the feeds, the ingredients were first ground together in a hammer mill (Viera MCS 350, Tatuí, SP, Brazil), then mixed in a horizontal mixer (Imbramaq), and extruded (extruder Ferraz E62, Ribeirão Preto, SP, Brazil) to a size of 3mm in diameter. The temperature during the extrusion process was maintained between 90 and 100°C, and after extrusion, they were dried in a continuous tubular dryer (Ferraz) for 15 minutes at a temperature ranging from 100 to 110°C.

The extrusion conditions were tested and adjusted in advance. Following extrusion, the feed was dried in an oven at 50°C for 4 hours, followed by packaging and storage at -4°C

until use. During the experimental period, the feed was provided four times a day (8:00 AM, 11:00 AM, 2:00 PM, and 5:00 PM) until apparent satiety.

Four diets were prepared by supplementing additives in the formulated diets at YQ (2g Kg), YQS (1g Kg), QS (0.5g Kg) and SC (3g Kg). A basal diet without additives supplementation was used as control group (CG).

Table 1. Feed formulation of the basal diet.

Ingredients	Contents (%)
Corn	24,9
Soybean meal	18,8
Poultry by-product meal	18,0
Broken Rice	8,0
Wheat bran	7,0
Meat and bone meal	6,0
Hemoglobin	2,0
Soybean oil	2,0
Vitamin C ^{1*}	0,03
Corn gluten meal	2,0
Vitamin Premix ²	0,4
Filax antifungal	0,3
Salt	0,3
Mineral Premix ³	0,2
DL-Methionine	0,2
Banox Antioxidant ⁴	0,1
Proximate composition	
Crude protein (%)	34,00
Crude energy* (Kcal)	3238,83
Crude fiber (%)	2,78
Crude lipid (%)	7,00
Ash (%)	8,30

*Units kg⁻¹ of diet. 1 Vitamin C (35%) - Heilongjiang NHU Biotechnology CO. Ltd / China.

^{2,3} Vitamin and Mineral Supplement* - De Heus – Rio Claro-SP - Vitamins: A = 12,000 IU, D3 = 3000.00 IU, E = 150.00, K = 15.00 mg, B1 = 20.00 mg, B2 = 20.00 mg, B6 = 17.50 mg, B12 = 40.00 mcg, Folic Acid = 6.00 mg; Pantothenic acid = 50.00 mg; Biotin = 1.00 mg; Niacin = 100.00 mg; Choline = 500.00 mg; Cobalt = 0.40 mg; Inositol = 125.00 mg; Copper = 7.50 mg; Iron = 100.00 mg; Iodine = 0.80 mg; Manganese = 50.00 mg; Selenium = 0.50 mg; Zinc = 120.00 mg;

⁴ Banox Antioxidant¹⁷ - Alltech, São Pedro do Ivaí, PR/Bra: 25.00 mg..

2.4 Experimental design

Fish were kept for two weeks for acclimatization to the laboratory condition. 1440 fish (16.97 ± 0.49 g) were randomly distributed into six groups, with four replications each at a rate of 60 fish per 500 L tanks.

For the evaluation of the experimental diets, two experiments were conducted. In Experiment 1, the fish were fed the experimental diets for 30 days, after which they were challenged with *F. orientalis*. In Experiment 2, the fish were fed with experimental diets for 60 days, after which they were subjected to challenge with *F. orientalis*.

The experimental groups were divided into six treatments:

- Group 1 (CYQ): Fish fed with YQ and challenged with *F. orientalis*.
- Group 2 (CYQS): Fish fed with YQS diet and challenged with *F. orientalis*.
- Group 3 (CQS): Fish fed with QS and challenged with *F. orientalis*.
- Group 4 (CSC): Fish fed with SC and challenged with *F. orientalis*.
- Group 5 (CCG): Unsupplemented - challenged with *F. orientalis* (Positive control).
- Group 6 (UCG) - Unsupplemented – unchallenged (Negative control).

Temperature, dissolved oxygen and pH were measured daily using the Horiba U-50® multiparameter probe (Japan). Total ammonia was measured by the colorimetric method (Kit Labcon Test®, Brazil). The averages of water parameters were: temperature $25.70 \pm 1.52^{\circ}\text{C}$; dissolved oxygen $6.40 \pm 1.07 \text{ mg L}^{-1}$; pH 6.70 ± 0.5 ; total ammonia $3.25 \pm 1.35 \text{ mg L}^{-1}$.

2.5 Biochemical and immunological analysis

At the end of the experiment trials (30 or 60 days), three fish per tank were anesthetized with benzocaine (100 mg L), and the blood was withdrawn from 8 fish per experimental unit from the caudal vein. Heparinized blood was used to analyze leukocyte respiratory activity (O.D.) following protocol established by Biller-Takahashi et al. (2013).

Non-heparinized blood was allowed to coagulate for 1 h and centrifuged at 1400g for 15 min at 4 °C to obtain blood serum. The blood serum was stored (- 80 °C) until analysis. Total protein (g dL) and albumin (g dL) were measured using a commercial total protein kit

(Lab Test®). Globulin (g dL) was determined by subtracting albumin from total protein. Lysozyme activity (ng μ L) was determined according to Zanuzzo et al. (2017).

2.6 Bacterial challenge

A pathogenic *F. orientalis* strain was used to determine the LD₅₀ for experimental infection. For this, 50 fish were distributed in five tanks, with 10 fish per tank and the dosis of the inoculum for i.p challenge were from 10^4 to 10^8 CFU mL⁻¹ (0.1 mL of inoculum for each 10 grams of fish weight). At the end of the feeding trial (30 and 60 days), tilapias were used in two bacterial challenges with the selected dose LD₅₀ (3.6×10^5 CFU/ml). At experiment 1 (30 days trial), fish (79.6 ± 4.36 g) were divided into five groups, with four replications each. In experiment 2 (sixty days trial), tilapia (172.7 ± 16.6 g) from the five groups were challenged with *F. orientalis*.

Before experimental infection, fish were anesthetized in benzocaine (100 mg L). Fish of the first groups were intraperitoneally (ip) challenged inoculum. The negative control was ip injected with 0.1 mL of sterile PBS. Then, fish were evaluated for behavior changes and clinical signs. The mortality was ascertained every two hours at firt five days and posterorly six times during twenty one days after infection.

2.7 Histopathological assessment

Dead and surviving fish were subjected to a complete clinical examination The spleen from the fish that died during infection and surviving fish on day twenty one post-challenge were fixed by immersion in 10% neutral buffered formalin for 48 hr. Subsequently, they were subjected to progressive dehydration (ethanol), then, diaphanized in xylol, impregnated and included in paraffin. The blocks were sectioned (5 μ m) and stained with haematoxylin and eosin (HE) for histopathological examination under an optical microscope (Nikon Eclipse

E200[®]) connected to a camera (Moticam[®] 2300). Slides were analysed, and photomicrographs were captured and used for histological description.

2.8 Bacterial re-isolation

Recently dead fish from each treatment during infection and surviving fish from all experimental groups post twenty one days were euthanized (benzocaine overdose dose) for re-isolation of the bacteria from spleen and kidney. Spleen and head kidney were collected and homogenized in sterile PBS using glass beads. The resulting homogenized was streaked on MMH media and BHI incubated at 24°C for 72 hr / 28°C for 48 hs, respectively. After incubation pure cultures were subjected to gram staining to morphologically verify *F. orientalis* and confirmed using molecular identification by conventional PCR (16s)

2.9 Statistical analysis

Comparing lethal dose ratios was analyzed using probit regression with arbitrary slopes (Lei and Sun, 2018). Cumulative mortality and survival percentage data were analyzed using the Kaplan-Meier method (Log-Rank test). Multiple comparisons were performed using the Holm-Sidak method to isolate different groups. The remaining data were subjected to the Shapiro-Wilk and Levene tests to verify normality and homoscedasticity respectively. The data were subjected to a one-factor analysis of variance and when significant differences were verified, it were subjected to comparison using the Tukey test with a significance of 5%.

3 Results

3.1 Biochemical and Immunological analysis

The average of total protein, albumin, and globulins in the serum blood of the tilapia are shown in Table 1. An increase in the concentration of total proteins and globulins was observed after 60 days of feeding with the experimental diets in all groups. The concentration of total proteins was higher in fish fed with additives compared to fish fed with feed without

supplementation, with a statistical difference between YQ, YQS, QS, SC and the control group ($p < 0.05$).

The albumin concentration did not show a significant difference between the treatments (Table 2). A higher concentration of globulins was observed in all supplemented groups after 60 days of feeding, differing significantly from the control group ($p < 0.05$).

Table 2 – Serum concentration of total protein (TP), albumin (ALB) and globulin (GLOB) of Nile tilapia fed with commercial additives. Values are means $\pm$ standard deviation.

Gp*	30 days			60 days		
	TP (g dl ⁻¹)	ALB (g dl ⁻¹)	GLOB (g dl ⁻¹)	TP (g dl ⁻¹)	ALB (g dl ⁻¹)	GLOB (g dl ⁻¹)
CG	3.07 $\pm$ 0.66	1.61 $\pm$ 0.32	1.76 $\pm$ 0.83	3.56 $\pm$ 0.4 ^a	1.76 $\pm$ 0.05	1.48 $\pm$ 0.39 ^a
YQ	3.49 $\pm$ 0.35	1.53 $\pm$ 0.23	2.09 $\pm$ 0.35	4.55 $\pm$ 0.11 ^b	1.72 $\pm$ 0.06	2.83 $\pm$ 0.11 ^b
YQS	3.29 $\pm$ 0.20	1.47 $\pm$ 0.21	2.17 $\pm$ 0.33	4.57 $\pm$ 0.18 ^b	1.78 $\pm$ 0.07	2.82 $\pm$ 0.19 ^b
QS	3.53 $\pm$ 0.35	1.62 $\pm$ 0.18	2.03 $\pm$ 0.33	4.53 $\pm$ 0.28	1.77 $\pm$ 0.08	2.79 $\pm$ 0.23 ^b
SC	3.49 $\pm$ 0.42 ^a	1.39 $\pm$ 0.27	2.15 $\pm$ 0.45	4.77 $\pm$ 0.22 ^b	1.85 $\pm$ 0.04	2.42 $\pm$ 0.21 ^b

*Groups: CG: Unsupplemented; YQ: Fish fed with *Y. schidigera* and *Q. saponaria*; YQS: Fish fed with combination saponin blend and *S. cerevisiae*; QS: Fish fed with *Q. saponaria*; SC: Fish fed with yeast cell wall.

The innate immune response was not influenced by the supplemented diet in the groups fed for thirty or 60 days (Figure 1).

The respiratory activity of leukocytes in groups YQ, YQS, QS and SC no differed significantly from the control after 60 days of supplementation ($p > 0.05$). As well, the concentration of the serum lysozyme activity of Nile tilapia was not influenced by the administration of 30 and 60 days of diet with additives at any time ($p > 0.05$).

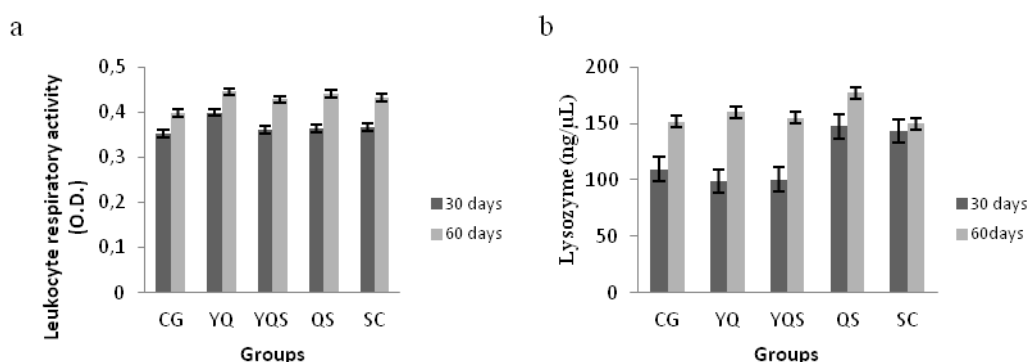


Figure 1. Leukocyte respiratory activity (a) and serum lysozyme levels (b) in Nile tilapia supplemented with additives for 30 and 60 days.

3.2 Survival after *F. orientalis* infection

No mortalities or behaviour abnormalities were observed in fish from unchallenged group. After feeding for 30 days with the experimental diets and bacterial challenge, the first deaths were observed four days after inoculation of the bacteria in all challenged groups.

The first signs of infection to appear were lethargy and lack of appetite, bleeding at the base of the fins (pelvic and pectoral). After the fourth day, other clinical signs preceded the death of infected fish, such as loss of balance and reduced opercular movements, in addition to unilateral and bilateral exophthalmia. Internally, the most notable gross pathological alteration observed was the presence of numerous multifocal white nodules scattered throughout the anterior kidney and spleen, accompanied by splenomegaly, hepatomegaly and renomegaly (Figure 2).

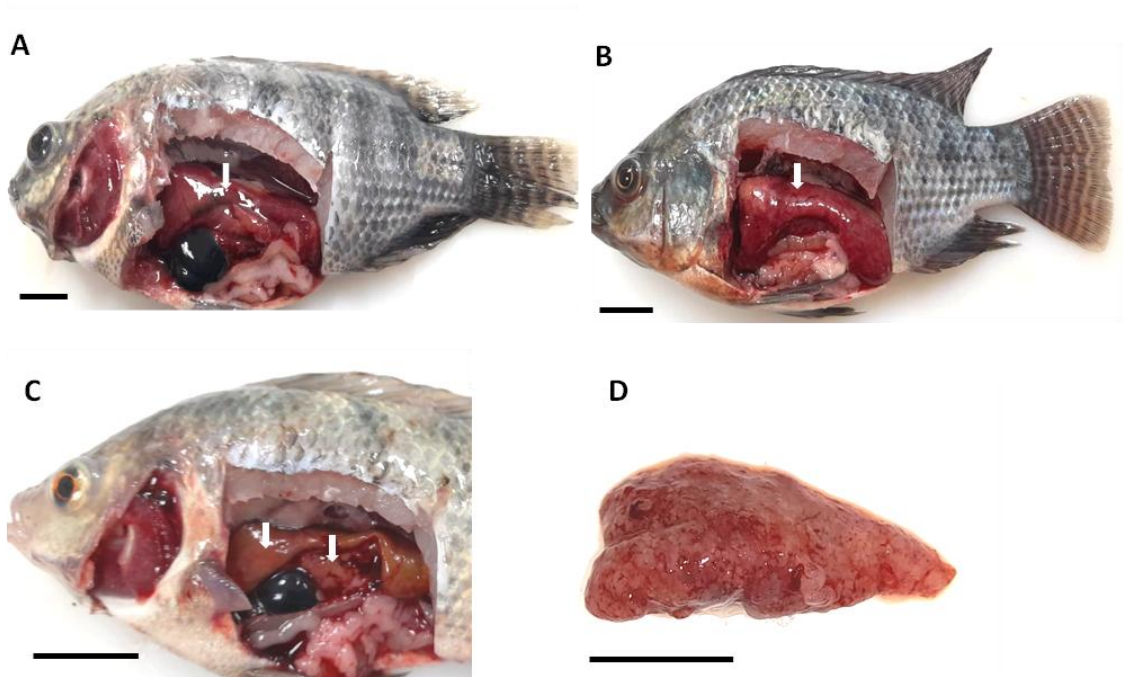


Figure 2. Tilapia with the gross signs of the Francisellosis disease. A – Fish from treatment group showing hepatomegaly. B and C – fish from challenged control group, tilapia with white nodules in the spleen, splenomegaly and hepatomegaly (arrows). D - white nodules throughout the spleen. Bar = 3 cm.

During the observation of behavior and clinical signs, it was found that CYQ and CQS, after the fifth day of infection, recovered first from the infection than others, which was confirmed by the reduction in clinical signs and recovery of feed intake.

Regarding the cumulative mortality of tilapia fed with the experimental diets for 30 days, no fish died in the unchallenged group. Fish of the challenged control group had the mortality rate (64%), followed by fish of CYQS (60%), CSC (59%), CYQ (52%) and CQS (50%) (Figure 3a). However, no statistical difference was observed between all groups ($p > 0.05$).

Mortality of fish fed for 60 days was higher in the challenged control (55.6%), followed by CYQS (53.4%), CSC (52.2%), CYQ (47.7%) and CQS (31.8%). CQS presented the lowest mortality than CCG with a significant difference ($p > 0.05$) over the 21 days after the challenge (Figure 3b). Mortality has stopped first in groups CYQ and CQS, which also had the highest number of surviving fish.

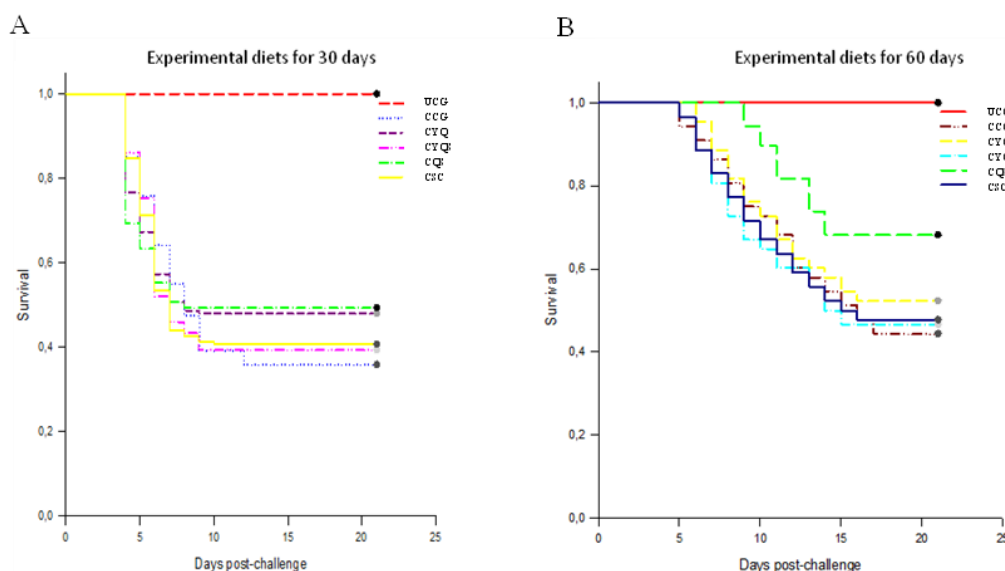


Figure 3. Survival of Nile tilapia fed with experimental diets for 30 (A) and 60 days (B) and challenged with bacteria.

3.3 Histopathological findings

Histopathological analysis showed the control group injected with PBS did not show any granulomatous lesions in the spleen. The tissue sections from the surviving fish on day twenty one post-challenge showed granulomas. Multiple granulomas were observed all over the splenic tissues of the fish that died on infection period (Figure 4). An increased menalo-macrophage centers (MMCs) and few granulomas were found in the spleen of survivors fish from CQS. The CCG, CYQ, CYQS and CSC tissues presented many granulomas. The granulomas were present at different levels of development.

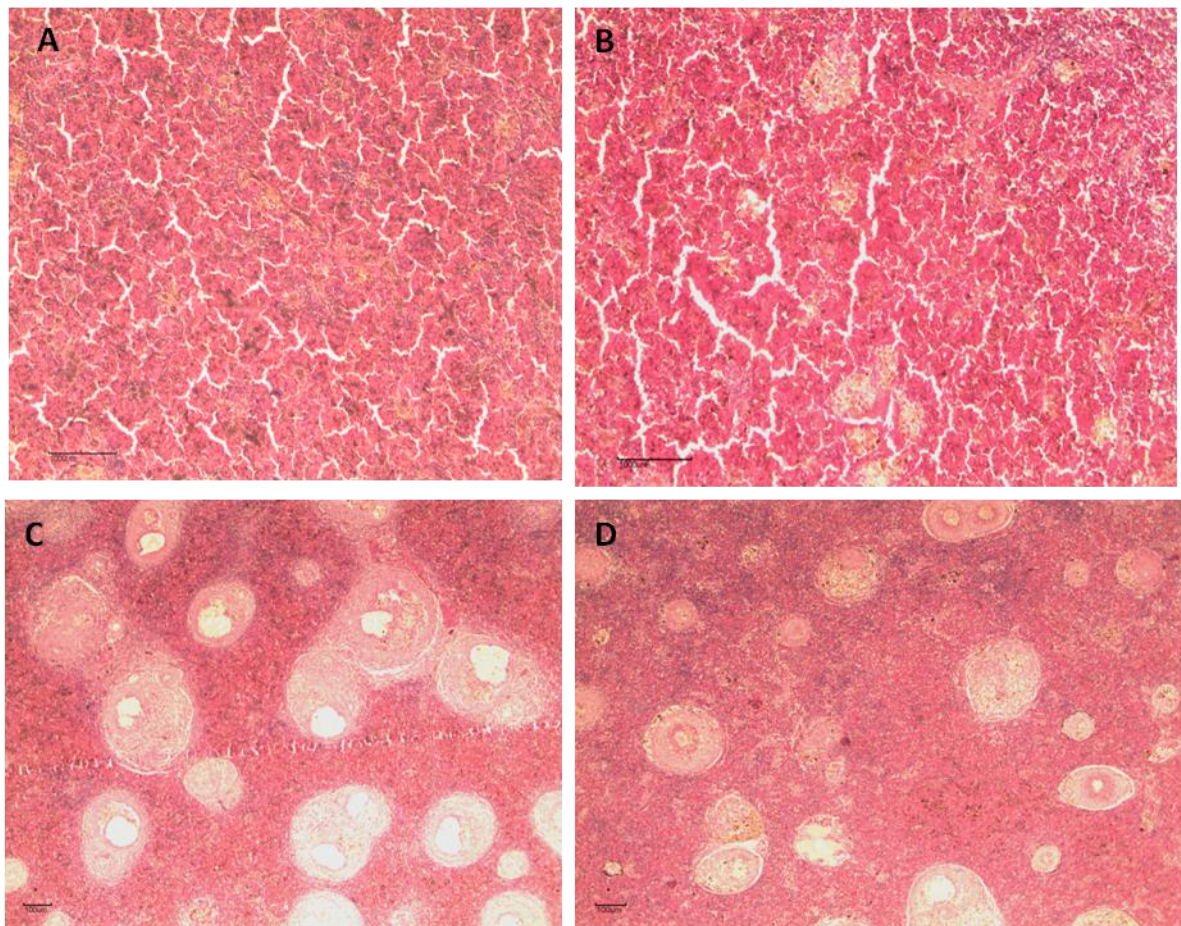


Figure 4. Histological photomicrographs of Nile tilapia spleens (H.E.): noninfected spleen (A – 4x), showing normal splenic parenchyma and stroma; MMCs in spleen (B – 4x) and severely infected spleen (C and D – 40x) at 21 d after challenge with *Francisella*, showing multifocal granulomatous lesions with mixed inflammatory infiltrates.

3.4 Bacterial recovery of *F. orientalis* in surviving fish

At the first trial (30 days experiment), *F. orientalis* was recovery in 25 % (2 / 8) of the surviving fish from CYQ and CQS. The bacteria reisolation achieved 75 % (6 / 8) in the positive control, 75 % (6 / 8) in CSC and 62,5 % (5 / 8) in CYQ.

Regarding the seconde trial (60 days experiment), *F. orientalis* was reisolated from all experimental groups, with a recovered of isolation in CCG (100%, 8 / 8), followed by groups CYQS (87.5%, 7 / 8) and CSC (87.5%, 7 / 8). However, bacterial recovery for the CYQ and CQS was quite low, with recovery rates of 37.5 % (3 / 8).

4 Discussion

The elective measure against *F. orientalis* is antibiotic therapy (administered in the fish feed). But in many cases, antibiotics effectiveness may be limited due to hyporexia/anorexia, which is one of the main clinical signs of franciselosis. Also, the late onset of treatment and intracelular pathogen are pointed as limiting factors for antibiotic efficacy. Thus, the search for substances that reduce the need of antibiotic therapy are of major importance.

The modulation of the fish immune system is a good alternative to prevent the franciseloze and reduce the risks of using antibiotics. The extracts of *Q. saponaria*, an evergreen tree native to Chile is rich in saponins, hydrophobic core or aglycone, called sapogenin, and two sugar branches that confers to these molecules an amphipathic character and particular chemical and biological properties, able to bacterial association with cells, as well as modulate intracellular processes (Cortés et al., 2023).

Saponins have been studied for a long time because they have a wide variety of properties such as anti-inflammatory, anti-allergic, antiviral and immunostimulants (Hassan et al., 2010; Lacaille-Dubois and Wagner, 1996; Mimaki and Sashida, 1996). In our studies, the

immunostimulant properties of Paq-Xtract (purified extract of saponins) helped Nile tilapia increased the survival after infection with *F. orientalis* and reduced the recovery of bacteria in the fish after 21 days of experimental infection. This product increased the resistance of tilapia to infection and accelerated the recovery process.

The results obtained in this research are consistent with previous studies on the effect of quillaja extract on resistance to bacterial infection in other fish species. *Q. saponaria* extracts had a protective effect against *Piscirickettsia salmonis* in vitro (Cañon-Jones et al., 2020), reduced the mortality caused by *Aeromonas hydrophila* in juvenile of *Piaractus mesopotamicus* (Fernandes, 2014) and increased the survival of *Salmon salar* against *Piscirickettsia salmonis* infection (Cortés et al., 2023).

Y. schidigera, a plant originates from the deserts of the South-western United States and Mexico, has abundant amount of saponin and resveratrol which can eliminate the waterborne ammonia and lower its impacts on aquatic animals' performance and health (Fleck et al., 2019; Paray et al., 2021). In our experiment, fish fed with the additives rich in *Q. saponaria*, *Y. schidigera* and yeast wall during 60 days had an increase in the concentration of total proteins and globulins. Serum total protein is an important measure of the health and nutritional status of fish. In a general context, the results showed parameters within the normal range for tilapia (Mauel et al., 2007; Rodrigues et al., 2018).

Our findings corroborate other previous studies, the researchers found a significant increase in total protein and globulins in fish fed with saponins (Elkaradawy et al., 2021; Serrano, 2013) and yeast wall (Abu-Elala et al., 2018; Huang et al., 2023).

The inclusion of nutritional additives plays a crucial role in improving diet quality by providing a more balanced intake of proteins and essential amino acids, which may contribute to increased protein levels ascertained in fish. As seen in our results, a supplemented diet can

result in greater protein levels. Indeed, the use of additives may be associated with higher protein level, and consequently, with higher levels of serum globulins.

Nutritional additives with immunomodulatory properties such as saponins blend and *Q. saponaria* extract can strengthen the immune system and positively influence the synthesis of total proteins, including those found in blood serum.

The innate immune system is very important in the defense mechanisms of fish (Magnadóttir, 2006). Oxidative burst and stress in tilapia are directly correlated, since stress is often associated with increased production of reactive oxygen species (ROS) in the organism. However, it is important to understand that the relationship between stress and oxidative stress can be complex.

Fish need a stressful situations for leukocytes to be activated to combat perceived threats. This can lead to an increase in ROS production as part of the immune response. Oxidative burst is a mechanism by which leukocytes, particularly neutrophils, generate reactive oxygen species (ROS) to combat pathogens (Sharp and Secombes, 1993).

In this study, dietary supplementation of tilapia with YQ, QS and SC did not change lysozyme activity, showing no stimulation or inhibition of this protein. Greater lysozyme activity was observed for the treatments, with no significant differences compared to the control group.

Lysozyme concentration may vary due to sex and sexual maturity, as well as stress and environmental conditions (Saurabh and Sahoo, 2008). The increase in lysozyme activity is not indicative of greater resistance in the fish, but may reflect a greater susceptibility of the organism to the stressor or pathogen (Fevolden et al., 1994).

It is interesting to note that the additives may be improving fish resistance in a way that is not directly related to Leukocyte respiratory activity and lysozyme activity. The action

of immunomodulatory additives may involve complex interactions between various components of the immune system and other fish body systems, such as phagocytic cells, cytokines, or cells involved in the adaptive immune response.

In intracellular pathogens such as *F. orientalis*, it has long been believed that cell-mediated immunity is critical for protection. Furthermore, synergy between antibodies, cytokines and phagocytes appears to be necessary to achieve effective immunity against the pathogen (Ellis, 1999).

In the literature there is no consensus on the ideal duration of administration of diets supplemented with immunostimulants to increase the resistance of fish to pathogens. The periods described for this objective to be achieved are short (days) and long (months) (Álvarez-Rodríguez et al., 2018; Mara et al., 2023). Our findings suggests a administration of diets supplemented higher than thirty days.

The presence of *saponins* in the diet positively affects the hematological aspects and immunological response of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Fayed et al., 2019). Furthermore, lysozyme activity in juvenile *O. niloticus* increases with the inclusion of yucca in the diet (Njagi et al., 2017). However, the same authors also reported that dietary yucca use greater than 0.1% did not show any additional increase in lysozyme activity.

Dietary yucca meal supplementation improves growth, promotes nonspecific immune responses, and increases resistance against *A. hydrophila* bacterial challenge in Nile tilapia (Njagi et al., 2017). However, the same authors emphasize the importance of the right dosage.

Nile tilapia supplementation with Quillaja and yucca saponins induced synergistic effects that improved water quality, growth performance, immuno-oxidative status, digestive enzymes, and intestinal histomorphology (Abozeid et al., 2021).

Previous studies reported that the combination of Quillaja and Yucca improved performance, antioxidant activity, metabolic response (glucose) and resistance of fish to hypoxia. Thus, these natural and renewable resources could therefore be considered potential alternatives to synthetic antioxidant products used in the aquaculture industry (Angeles Jr et al., 2017).

Saponins have the ability to stimulate the production of cytokines (Piacente et al., 2005). Saponins significantly increase the gene expression of C3, INF-I and INF-II in both the kidney and spleen, both before and after bacterial challenges. The increase in the expression levels of cytokines and effector molecules constitutes an indication of the host's ability to mitigate or interrupt the infectious process. The mechanisms operating in this initial response play a crucial role in inhibiting the replication of the pathogenic microorganism, and in some cases, in its destruction. Thus, the modulation of IL-1 β and IL-8, as well as INF-I and INF-II, together with effector molecules, such as C3, originating from the innate immune system, and CD8⁺ T cells, components of the immune response mediated by cells, serves as an indicator of an active response generated by the host to suppress the intracellular replication of pathogens in previously infected cells (Cortés et al., 2023).

Quillaja extract promotes phagosome-lysosome fusion. By modulating the expression of IL-12 and IL-10 in infected cells, it promotes the immune response against the pathogen and reduces the expression of pathogen virulence genes, generating specific anti-invasion and anti-intracellular replication effects in macrophages (Cortés et al., 2021).

Our results suggest that in a bacterial challenge with *F. orientalis*, saponins may be especially useful. *F. orientalis* is a facultative intracellular bacterium that is difficult to treat. However, by improving the tilapia's immune response, saponins help fight infection more

effectively. Antibiotic treatment can be significantly reduced in fish with a robust immune response (innate and cellular adaptive) due to feeding saponins.

Previous studies have shown that dietary yeast supplementation for Nile tilapia significantly improved the length/width and absorption area of the intestine. This increase in intestinal morphometry promoted feed consumption, nutrient utilization and performance (Abdel-Tawwab et al., 2018; Adeshina et al., 2019).

Diets with yeast cell walls increase antioxidant enzymes that act to reduce reactive oxygen metabolites, increasing tolerance to oxidative stress (Dawood et al., 2017; Gu et al., 2011; Zhang et al., 2012). Dietary inclusion of yeast has a positive impact on growth, feed efficiency, immune response and disease resistance in Nile tilapia (Abu-Elala et al., 2018). In this study, the yeast wall-based additive did not influence lysozyme activity nor it confer resistance to francisellosis.

In this research, yeast cell walls did not confer resistance to tilapia against francisellosis, unlike findings in the literature for other bacterioses, where researchers found an increase in the resistance of fish against infection by *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas hydrophila* (Abdel-Tawwab, 2012; Taoka et al., 2006). It suggests that this additive can act by increasing the immunological defense of tilapia against pathogenic bacteria that are not intracellular.

The histopathological results obtained in the current study was consistent with previous publications (Nguyen et al., 2015; Soto et al., 2013). Histological manifestations revealed the vast difference between those of QS and others treatments to francisellosis diseases. Many studies showed Nile tilapia as a host may not be able to effectively eliminate the *F. orientalis* after the infection. It can be seen as multiple

granulomas containing cocco-bacilli bacteria harboured macrophages were (Soto et al., 2011; Ramirez-Paredes et al., 2019).

A low number of bacteria (about 1 CFU/fish) are able to produce granulomas in important hematopoietic and osmoregulatory organs (Soto et al., 2009). The presence of significant lesions in spleen of survivors make the fish more susceptible to other diseases found in culture farms due to lesions cause immunosuppression. The increasing number of MMCs in spleen observed in QS may indicate efficient cellular immune responses upon the bacterial infection. In agreement with histological results, active MMCs in infected fish may explain the lower number of recovery of *F. orientalis* from spleen. This suggests a fish immune response in reducing the number of viable bacteria resided in the tissue of the infected fish (Soto et al., 2009; Dong et al., 2016).

In our results, there was a reduction in the re-isolation of *F. orientalis* in the groups fed with saponins blend and QS. The products were able to increase the immune system and destroy the bacteria in most fish even in the shortest period of feeding.

The importance of a nutritional additive to help eliminate bacteria in tilapia after an infection is related to the crucial role that the immune system plays in the response against pathogens. This elimination of the pathogen is related to the immunomodulatory properties of substances. These products contain power that stimulate and strengthen the tilapia's immune system. Which one can includes the activation of immune cells which play a crucial role in eliminating bacteria. The animal that survives of franciselosis and it does not carry the bacteria is important for preventing infection recurrences.

5 Conclusions

Our results highlight the importance of using saponis to prevent and control francisellosis in fish farming. *Q. saponaria* have been shown to be effective in preventing francisellosis in Nile tilapia and helping to reduce bacterial persistence after sixty days of feeding. In this context, the potential of saponis as an integrated and effective approach to preventing francisellosis is observed, offering a viable support to antibiotics in aquaculture. Future research could focus on understanding mechanisms of action, and adapting nutritional strategies to varying husbandry conditions.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

References

- Abdel-Tawwab, M., 2012. Interactive effects of dietary protein and live bakery yeast, *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fry and their challenge against *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquac. Int.* 20, 317–331. <https://doi.org/10.1007/S10499-011-9462-8>
- Abdel-Tawwab, M., Mounes, H.A.M., Shady, S.H.H., Ahmed, K.M., 2021. Effects of yucca, *Yucca schidigera*, extract and/or yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as water additives on growth, biochemical, and antioxidants/oxidant biomarkers of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 533. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.736122>
- Abdel-Tawwab, M., Samir, F., Abd El-Naby, A.S., Monier, M.N., 2018. Antioxidative and immunostimulatory effect of dietary cinnamon nanoparticles on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) and its susceptibility to hypoxia stress and *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 74, 19–25. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2017.12.033>
- Abozeid, A.M., Abdel-Rahim, M.M., Abouelenien, F., Elkaradawy, A., Mohamed, R.A., 2021. *Quillaja saponaria* and/or *Yucca schidigera* ameliorate water quality, growth performance, blood health, intestine and gills histomorphology of Nile tilapia,

- Oreochromis niloticus*. *Aquac. Res.* 52, 6117–6131. <https://doi.org/10.1111/ARE.15474>
- Abu-Elala, N.M., Younis, N.A., AbuBakr, H.O., Ragaa, N.M., Borges, L.L., Bonato, M.A., 2018. Efficacy of dietary yeast cell wall supplementation on the nutrition and immune response of Nile tilapia. *Egypt. J. Aquat. Res.* 44, 333–341. <https://doi.org/10.1016/J.EJAR.2018.11.001>
- Adeshina, I., Jenyo-Oni, A., Emikpe, B.O., Ajani, E.K., Abdel-Tawwab, M., 2019. Stimulatory effect of dietary clove, *Eugenia caryophyllata*, bud extract on growth performance, nutrient utilization, antioxidant capacity, and tolerance of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.), to *Aeromonas hydrophila* infection. *J. World Aquac. Soc.* 50, 390–405. <https://doi.org/10.1111/JWAS.12565>
- Álvarez-Rodríguez, M., Pereiro, P., Reyes-López, F.E., Tort, L., Figueras, A., Novoa, B., 2018. Analysis of the Long-Lived Responses Induced by Immunostimulants and Their Effects on a Viral Infection in Zebrafish (*Danio rerio*). *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01575>
- Angeles Jr, I.P., Gallego, L.M., Alvin Navarro, M.M., Chien, Y.-H., Angeles, I.P., Author, C., 2017. Dietary Effects of Quillaja saponaria and Yucca schidigera extract on Rearing Performance of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* L. and its Antioxidant Capacity and Metabolic Response Following Hypoxic Stress. *Int. J. Agric. Technol.* 13, 2249–2266.
- Biller-Takahashi, J.D., Takahashi, L.S., Saita, M. V., Gimbo, R.Y., Urbinati, E.C., 2013. Leukocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Brazilian J. Biol.* 73, 425–429. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842013000200026>
- Cortés, H., Castillo-Ruiz, M., Cañon-Jones, H., Schlotterbeck, T., Martín, R.S., Padilla, L., 2023. In Vivo Efficacy of Purified Quillaja Saponin Extracts in Protecting against *Piscirickettsia salmonis* Infections in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Anim.* 2023, Vol. 13, Page 2845 13, 2845. <https://doi.org/10.3390/ANI13182845>
- Cortés, H.D., Gómez, F.A., Marshall, S.H., 2021. The Phagosome–Lysosome Fusion Is the Target of a Purified Quillaja saponin Extract (PQSE) in Reducing Infection of Fish Macrophages by the Bacterial Pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Antibiotics* 10. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10070847>
- Dawood, M.A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuini, M.F., Hossain, M.S., Nhu, T.H., Moss, A.S., Dossou, S., Wei, H., 2017. Dietary supplementation of β -glucan

- improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquac. Nutr.* 23, 148–159. <https://doi.org/10.1111/ANU.12376>
- Elkaradawy, A., Abdel-Rahim, M.M., Albalawi, A.E., Althobaiti, N.A., Abozeid, A.M., Mohamed, R.A., 2021. Synergistic effects of the soapbark tree, *Quillaja saponaria* and Vitamin E on water quality, growth performance, blood health, gills and intestine histomorphology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fingerlings. *Aquac. Reports* 20, 100733. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100733>
- Ellis, A.E., 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 291–308. <https://doi.org/10.1006/FSIM.1998.0192>
- Fevolden, S.E., Røed, K.H., Gjerde, B., 1994. Genetic components of post-stress cortisol and lysozyme activity in Atlantic salmon; correlations to disease resistance. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 507–519. <https://doi.org/10.1006/FSIM.1994.1045>
- George, A.J., 1965. Legal status and toxicity of saponins. *Food Cosmet. Toxicol.* 3, 85–91. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(65\)80012-8](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(65)80012-8)
- Gu, M., Ma, H., Mai, K., Zhang, W., Bai, N., Wang, X., 2011. Effects of dietary β -glucan, mannan oligosaccharide and their combinations on growth performance, immunity and resistance against *Vibrio splendidus* of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.018>
- Han, Q.F., Zhao, S., Zhang, X.R., Wang, X.L., Song, C., Wang, S.G., 2020. Distribution, combined pollution and risk assessment of antibiotics in typical marine aquaculture farms surrounding the Yellow Sea, North China. *Environ. Int.* 138, 105551. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.105551>
- Huang, W., Xiao, X., Hu, W., Tang, T., Bai, J., Zhao, S., Ao, Z., Wei, Z., Gao, W., Zhang, W., 2023. Effects of dietary nucleotide and yeast cell wall on growth performance, feed utilization, anti-oxidative and immune response of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol.* 134, 108574. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2023.108574>
- Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 137–151. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2004.09.006>
- Mara, R., Acunha, G., Oliveira, F.C., 2023. O uso de imunomoduladores na alimentação de peixes : Uma revisão The use of immunomodulators in fish feed : A review El uso de inmunomoduladores en alimentos para peces : Una revisión 2023, 1–14.
- Mauel, M.J., Miller, D.L., Merrill, A.L., 2007. HEMATOLOGIC AND PLASMA

- BIOCHEMICAL VALUES OF HEALTHY HYBRID TILAPIA (*OREOCHROMIS AUREUS* × *OREOCHROMIS NILOTICA*) MAINTAINED IN A RECIRCULATING SYSTEM. <https://doi.org/10.1638/06-025.1> 38, 420–424. <https://doi.org/10.1638/06-025.1>
- Mo, X.B., Wang, J., Guo, S., Li, A.X., 2020. Potential of naturally attenuated *Streptococcus agalactiae* as a live vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 518, 734774. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2019.734774>
- Ng, W.K., Koh, C.B., 2017. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Rev. Aquac.* 9, 342–368. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12141>
- Njagi, G.W., Lee, S., Won, S., Hong, J., Hamidoghli, A., Bai, S.C., 2017. Effects of dietary Yucca meal on growth, haematology, non-specific immune responses and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Aquac. Res.* 48, 4399–4408. <https://doi.org/10.1111/ARE.13264>
- Okeke, E.S., Chukwudozie, K.I., Nyaruaba, R., Ita, R.E., Oladipo, A., Ejeromedoghene, O., Atakpa, E.O., Agu, C.V., Okoye, C.O., 2022. Antibiotic resistance in aquaculture and aquatic organisms: a review of current nanotechnology applications for sustainable management. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2022 2946 29, 69241–69274. <https://doi.org/10.1007/S11356-022-22319-Y>
- Piacente, S., Pizza, C., Oleszek, W., 2005. Saponins and phenolics of *Yucca schidigera* Roezl: Chemistry and bioactivity. *Phytochem. Rev.* 4, 177–190. <https://doi.org/10.1007/S11101-005-1234-5/METRICS>
- Rodrigues, G.M., Nascimento, F.G.D.O., Bizare, A., Oliveira, W., Guimarães, E.C., Mundim, A.V., 2018. Serum Biochemical Profile of Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*) Bred in Net Cages during Summer and Winter. *Acta Sci. Vet.* 46, 8–8. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.81814>
- Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac. Res.* 39, 223–239. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2109.2007.01883.X>
- Serrano, A.E., 2013. Effects of Quillaja saponins on growth, feed efficiency, digestive enzyme activities and metabolism of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquac. Nutr.* 19, 468–474. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2095.2012.00980.X>

- Sharp, G.J.E., Secombes, C.J., 1993. The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* 3, 119–129. <https://doi.org/10.1006/fsim.1993.1013>
- Soto, E., Hawke, J.P., Fernandez, D., A Morales, J., 2009. *Francisella* sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *J. Fish Dis.* 32, 713–722. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2761.2009.01070.X>
- Swamy, J.M., Naik, M.G., Rathore, S.S., Srinivasa, K.H., Monica, K.S., 2023. Dietary supplementation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets with bay laurel (*Laurus nobilis*): alleviation of oxidative stress and amelioration of immune response, serum biochemistry, and resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Physiol. Biochem.* <https://doi.org/10.1007/s10695-023-01210-8>
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Kim, S.M., Park, S. Il, Yoshikawa, T., Sakata, T., 2006. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish. Sci.* 72, 755–766. <https://doi.org/10.1111/J.1444-2906.2006.01215.X>
- Zanuzzo, F.S., Sabioni, R.E., Montoya, L.N.F., Favero, G., Urbinati, E.C., 2017. Aloe vera enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 65, 198–205. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2017.04.013>
- Zhang, J., Liu, Y., Tian, L., Yang, H., Liang, G., Xu, D., 2012. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.001>

CAPITULO 3 - Efeitos da suplementação dietética com *Y. schidigera* e *Q. saponaria* no desempenho produtivo e saúde de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO

As saponinas possuem propriedades imunomoduladoras, estimulando a resposta imune inata e aumentando a resistência a doenças em peixes. Entre as saponinas, as mais promissoras para promoção da saúde de peixes como imunoestimulantes estão as obtidas das plantas *Yucca schidigera* e *Quillaja saponaria*.. Neste trabalho objetivou-se avaliar os efeitos de saponinas no desempenho e saúde da tilápia do nilo. Para isso tilápias foram alimentadas com dietas suplementadas com seis diferentes concentrações de *Y. schidigera* ou *Q. saponaria* e combinação de ambas por 90 dias. Como resultado foi observado efeitos sobre o metabolismo de glicose e atividade respiratória de leucócitos. Esses achados indicam que as saponinas devem ser utilizadas na concentração adequada e por um período de tempo como estratégia em momentos críticos da produção.

Palavras-chave: imunoestimulante, metabolismo, peixes, saúde;

1 INTRODUÇÃO

À medida que os organismos aquáticos enfrentam diversos agentes patogênicos e fatores de estresse ambiental, aditivos funcionam ativando mecanismos imunológicos inatos, como fagocitose, explosão respiratória e produção de citocinas, preparando assim o sistema imunológico dos peixes para responder de forma mais eficaz aos desafios microbianos (Dawood et al., 2020).

Os aditivos alimentares abrangem uma ampla gama de compostos, incluindo, entre outros, β -glucanos, nucleotídeos, prebióticos e substâncias como saponinas derivadas de plantas, que demonstraram efeitos imunomoduladores notáveis em várias espécies de peixes (Gannam et al., 2020; Wang et al., 2018; Hai, 2015).

As saponinas, compostos bioativos oriundas de fontes vegetais, surgiram como potenciais aditivos fitogênicos em formulações de rações devido aos seus diversos efeitos fisiológicos nos animais. Estudos indicam que a suplementação dietética com saponinas pode influenciar significativamente o desempenho de crescimento e taxas de sobrevivência em diversas espécies aquáticas (Wang et al., 2019; Zhou et al., 2018; Xie et al., 2017; Francis et al., 2001). Entre as saponinas mais promissoras como imunomoduladores estão as obtidas das plantas *Yucca schidigera* (*Y. schidigera*) e *Quillaja saponaria* (*Q. saponaria*).

Y. schidigera, uma planta desértica nativa da América do Norte, contém saponinas e compostos polifenólicos, entre outros fitoquímicos, que têm sido investigados pelos seus efeitos benéficos na saúde e no desempenho (Sarjito et al., 2021). As saponinas de *Y. schidigera* são conhecidas por suas propriedades surfactantes e capacidade de se complexar com colesterol e proteínas no trato gastrointestinal, aumentando potencialmente a absorção de nutrientes e a eficiência de utilização em peixes (Rodriguez - Estrada et al., 2018).

Além disso, extratos de *Y. schidigera* foram estudados quanto aos seus efeitos na estimulação de respostas imunes inatas e redução de estresse oxidativo e os marcadores de inflamação em peixes (Baruah e Pal, 2020; Osti et al., 2020, Pal et al., 2018; Rodriguez-Estrada et al., 2018; Riche et al., 2013).

Q. saponaria é conhecida por seu alto teor de saponinas com aplicações em diversas indústrias, incluindo farmacêutica, cosmética e, mais recentemente, aquicultura (WANG et al., 2019). Na aquicultura, *Q. saponaria* tem sido estudada pelos seus potenciais benefícios na melhoria da saúde dos peixes. As saponinas derivadas de *Q. saponaria* são caracterizadas por sua capacidade de interagir com membranas biológicas, estimular a atividade de células imunológicas, como macrófagos e aumentar a produção de citocinas (Wang et al., 2019; Xie et al., 2017).

Por tanto, o uso de extrato de plantas rico em saponinas contribue para melhorar a saúde dos peixes nos ambientes de criação, reduzindo a incidência e a gravidade de infecções. Desta forma, neste estudo objetivou-se avaliar os efeitos da

suplementação dietética com *Y. schidigera* e *Q. saponaria* no desempenho produtivo e na saúde de tilápia do nilo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos de manipulação dos peixes foram submetidos à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp - Campus de Jaboticabal e foram realizados de acordo com os preceitos e normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Certificado nº. 003928/23-CEUA).

2.1 Aquisição dos Peixes

Juvenis machos de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), com peso médio de 30 g foram adquiridos de Piscicultura comercial (São Paulo, Brasil). Antes da fase experimental, os peixes foram aclimatados por 20 dias às condições laboratoriais em caixas de polietileno 500 L alimentados três vezes ao dia, até a saciedade aparente.

2.2. Condições experimentais

Este estudo foi conduzido no Instituto de Pesca (IP – Apta, São José do Rio Preto, SP, Brasil). 700 animais (peso médio $40,46 \pm 0,70$ g) foram distribuídos em 20 caixas de polietileno (500 L) na densidade de trinta e cinco peixes por caixa. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (níveis de inclusão) e quatro repetições.

Os tanques foram instalados em sistema fechado, composto por filtro biológico, com renovação constante. A matéria orgânica depositada no fundo das caixas, durante todo o experimento e sempre que necessário, foi removida através de sifonamento com uma mangueira de borracha. Os tanques eram dotados de aeração constante. Os valores médios dos parâmetros físico-químicos da água, mensurados semanalmente, : oxigênio dissolvido igual a $5,45 \pm 0,79$ mg/L, temperatura igual a $27,74 \pm 1,50$ °C e pH igual a $6,75 \pm 0,26$ (Medidor

multiparâmetro AKSO AK-88)), adequados para o ideal crescimento e desenvolvimento dos animais (Kubtiza, 2013)

2.3 Dietas e Delineamento Experimental

Foram formuladas dietas (34% de proteína bruta) que atenderam às exigências nutricionais da espécie (tabela 1), com quatro níveis de inclusão de dois aditivos comerciais a base de YQ (combinação de *Y. schidigera* e *Q.saponaria*) e QS (extrato purificado de *Q. saponaria*) adicionados na dieta. Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais durante 90 dias até a saciedade aparente, em quatro alimentações diárias (entre 08h00m e 17h00m). O consumo de ração foi medido diariamente por meio de pesagem dos recipientes de armazenagem da ração de cada caixa.

Os ingredientes foram misturados e a dieta foi produzida por extrusão. Para a extrusão das rações, os ingredientes em conjunto foram moídos em moinho de martelo (Viera MCS 350, Tatuí, SP, Brazil) posteriormente misturados em misturador horizontal (Imbramaq), e extrusados (extrusora Ferraz E62, Ribeirão Preto, SP, Brazil) no tamanho de 3mm de diâmetro. A temperatura durante o processo de extrusão foi mantida entre 90 e 100C e após extrusadas foram secas em secador tubular contínuo (Ferraz) durante 15 min em temperatura variando entre 100 a 110C.

Um misturador horizontal foi utilizado para misturar os ingredientes secos. As condições de extrusão foram testadas e ajustadas antecipadamente. Após a extrusão, a ração foi seca em estufa a 50°C por 4 horas, seguida de embalagem e armazenamento (4°C) durante todo o experimento

Tabela 1. Composição basal das dietas experimentais.

Ingredientes	Qtde (%)
Milho Moido	24,9
Farelo de Soja	18,8
Farinha de vísceras	18,0
Quirera de arroz	8,0
Farelo de Trigo	7,0
Farinha de Carne e ossos	6,0

Hemoglobina	2,0
Óleo de soja	2,0
Vitamina C ^{1*}	0,03
Protenose	2,0
Suplemento vitamínico ²	0,4
Antifúngico	0,3
Sal	0,3
Suplemento mineral ³	0,2
DL-Metionina	0,2
Antioxidante ⁴	0,1

Composição estimada

Proteína bruta (%)	34,00
Energia digestível* (Kcal)	3238,83
Fibra bruta (%)	2,78
Gordura (%)	7,00
Cinzas (%)	8,30

*Unidade kg⁻¹ da dieta. ¹ Vitamina C (35%) - Heilongjiang NHU Biotechnology CO. Ltd / China.

^{2,3} Suplemento vitamínico e mineral* - De Heus – Rio Claro-SP - Vitaminas: A = 12,000 IU, D3 = 3000.00 IU, E = 150.00, K = 15.00 mg, B1 = 20.00 mg, B2 = 20.00 mg, B6 = 17.50 mg, B12 = 40.00 mcg, ácido fólico = 6.00 mg; Ácido pantoténico=50,00mg; Biotina=1,00mg; Niacina=100,00mg; Colina=500,00mg; Cobalto=0,40mg; Inusitol=125,00mg; Cobre=7,50mg; Ferro=100,00mg; Iodo=0,80mg; Manganês=50,00mg; Selênio=0,50mg; Zinco=120,00mg;

⁴Antioxidante Banox¹⁷ - Alltech, São Pedro do Ivaí, PR/Bra: 25.00 mg.

O experimento contou com um delineamento completamente ao acaso com 5 dietas e 4 repetições cada, sendo os grupos: DB: Dieta basal - sem suplementação; YQ₁: suplementação com YS + QS (2 g/Kg); QS₁: suplementação com QS (0,5 g/Kg); QS₂: suplementação com QS (1 g/Kg); YQ₂: suplementação com YS + QS (0,5 g/Kg).

2.4 Desempenho produtivo

Em cada tempo amostral, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas, anestesiados em solução de benzocaína (benzocaína, 100 mg/L⁻¹), individualmente pesados em balança digital semi-analítica com precisão (0,01 g) e medidos para posterior cálculo dos parâmetros de desempenho produtivo. Com os dados biométricos e do consumo de ração, foram calculados e avaliados os seguintes parâmetros de desempenho:

- Peso Final (PF);

- Ganho em peso diário: $GP \text{ (g/dia)} = (\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{período experimental}$;
- Taxa de crescimento específico: $TCE \text{ (\%/dia)} = 100 \times [(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{período experimental}]$;
- Consumo alimentar diário: $CAD \text{ (g/dia)} = \text{alimento consumido} / \text{período experimental}$;
- Conversão alimentar aparente: $CA = \text{alimento fornecido} / \text{ganho em peso total}$;
- Taxa de eficiência proteica: $TEP \text{ (\%)} = 100 \times (\text{ganho em peso total} / \text{proteína bruta consumida})$;

2.5 Análise hematológica, bioquímica e imunológica

Após 20, 40, 60 e 90 dias de alimentação com os aditivos alimentares, os peixes foram anestesiados e amostras de sangue colhidas por punção do vaso caudal. Uma alíquota com anticoagulante (heparina 100UI) foi utilizada para determinação do hematócrito (Hct) (Ranzani-Paiva et al., 2013) e o restante para quantificação do número total de eritrócitos (NE) na câmara de Neubauer após diluição 1:200 em solução formol-citrato, para o ARL e hemoglobina (Hb). A análise da atividade respiratória dos leucócitos (ARL) seguiu o protocolo de Anderson e Siwicki (1995). O método consiste na determinação das EROs produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma-Aldrich, MO, USA) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (Klein, 1990). A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm (Sahoo et al., 2005).

A concentração de hemoglobina (Hb) foi analisada pelo método da cianometahemoglobina descrito por Collier (1944). O volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) também foram calculados (Wintrobe, 1934).

Para a obtenção de soro, o sangue sem anticoagulante permaneceu em temperatura ambiente para coagulação, e após duas horas foi centrifugado em e, após separação, foi armazenado em ultrafreezer (-80°C). Este soro foi utilizado para as análise bioquímicas e imunológicas. Foram utilizados kits Labtest® para determinação do triglicerídeos (TG), colesterol (CT), glicose (GL), fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) (Amar et al., 2000).

A concentração sérica de lisozima (ng/μL) foi obtida conforme metodologia descrita por Bayne (1997) e Ellis (1990) e a atividade hemolítica da via alternativa (HA-AP) do complemento sérico (Zanuzzo et al., 2017; Ferriani et al. 1990; Polhill et al., 1978).

2.6 Análise histológica

Para a análise histopatológica dos órgãos, foram retirados fígado, baço e intestino dos peixes durante o período de suplementação alimentar, e fixados em formaldeído a 10% por 24 horas. Posteriormente, foram desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina. Os cortes de 5μm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina (H.E.) (Luna, 1968) para descrição histológica em fotomicroscópio. As alterações foram atribuídas à alteração histológica conforme método descrito por Schwaiger et al. (1997) e Brum et al. (2018).

2.7 Análise estatística

Os grupos experimentais foram analisados por meio de quatro réplicas, e os dados foram apresentados como média e desvio padrão. Antes da análise, os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene para verificação de normalidade e homocedasticidade, respectivamente.. Os dados foram submetidos à análise de variância (one way ANOVA) e quando foram verificadas diferenças significativas, foram submetidos à comparação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desempenho produtivo

O PF, GP, TCE, CAD e CA não foram significativamente alterados nos grupos de peixes alimentados com saponinas em comparação com o grupo controle ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Desempenho produtivo de tilápia-do-Nilo suplementada com *Y. schidigera* e *Q.saponaria* durante 90 dias.

Variáveis	Dietas experimentais				
	DB	YQ ₁	QS ₁	YQ ₂	QS ₂
PF (g)	167,98	165,94	171,80	170,34	173,3
GP (g/dia)	1,42	1,39	1,46	1,44	1,48
TCE (%)	1,41	1,39	1,45	1,44	1,45
CAD (g/dia)	54,06	53,60	53,91	53,58	53,72
CA	1,48	1,44	1,36	1,43	1,35

3.2 Análise hematológica, bioquímica e imunológica

O NE, Hct, Hb, VCM, HCM e CHCM não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados ($p > 0,05$) como ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3. Médias e desvio padrão dos parâmetros hematológicos de tilápias do Nilo alimentadas com saponinas durante 90 dias.

Dia		NE ($10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	Hct (%)	Hb(g dL ⁻¹)	VCM(fL)	HCM (pg)	CHCM(g dL ⁻¹)
20	DB	1,37± 0,14	33± 4,85	6,84± 1,00	240,44± 42,88	47,63± 8,04	19,09± 4,52
	YQ ₁	1,2± 0, 142	34,5± 6,28	6,97± 1,20	278,60± 47,76	54,21± 10,36	19,65± 4,80
	QS ₁	1,31± 0,22	38,5± 8,00	6,52± 1,51	288,57± 42,85	49,68± 16,35	17,35± 9,06
	QS ₂	1,25± 0,13	34,5± 5,04	6,59± 1,19	272,00± 62,77	52,55± 11,87	16,74± 3,06
	YQ ₂	1,21± 0,22	38,5± 4,30	6,29± 1,03	272,00± 66,06	53,55± 9,71	16,13± 3,64
	DB	1,66± 0,23	29± 5,14	6,99± 1,36	190,83± 39,72	41,10± 9,14	24,27± 6,67
	YQ ₁	1,50± 0,26	29,5± 6,13	6,41± 0,65	211,40± 25,70	40,72± 10,41	20,43± 4,36
	QS ₁	2,01± 0,30	38± 7,36	6,22± 1,45	219,15± 55,81	30,14± 9,69	16,60± 7,80

60	QS₂	1,84± 0,23	36,5± 7,42	6,34± 0,95	203,25± 22,20	34,33± 4,31	16,17± 3,69
	YQ₂	1,74± 0,27	38± 6,65	6,66± 1,11	209,96± 40,62	33,32± 8,61	17,48± 2,41
	DB	1,90± 0,17	28,5± 4,00	7,34± 1,14	155,60± 20,96	39,87± 5,08	24,00± 4,04
	YQ₁	1,59± 0,22	29± 2,42	6,83± 1,19	183,31± 32,26	43,67± 7,63	22,94± 4,78
	QS₁	1,69± 0,41	29± 1,96	7,36± 1,64	169,09± 46,95	46,64± 15,76	26,08± 6,45
	QS₂	1,67± 0,50	25± 4,59	7,16± 1,63	159,72± 36,22	46,91± 14,40	28,11± 7,50
	YQ₂	1,83± 0,25	28,5± 4,42	7,34± 0,70	151,06± 32,64	40,77± 5,80	25,00± 4,72
	DB	1,86± 0,25	29± 2,90	6,75± 1,51	159,79± 38,41	37,13± 13,39	23,48± 6,23
	YQ₁	2,14± 0,32	29± 2,90	6,92± 0,75	137,10± 22,60	32,01± 6,63	22,94± 2,76
	QS₁	1,81± 0,21	30± 1,39	6,47± 1,23	163,98± 23,64	38,46± 5,57	22,20± 4,43
90	QS₂	1,80± 0,18	27,5± 3,54	7,74± 1,91	158,69± 27,04	44,00± 14,93	28,16± 7,68
	YQ₂	1,79± 0,10	28,5± 3,94	7,36± 1,10	154,65± 22,49	42,11± 8,17	27,31± 5,44

*Número de eritrócitos (NE), hematócrito (Hct), hemoglobina (Hb)Volume Corpuscular Médio (VCM); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM); Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). DB: Dieta basal. YQ₁: YS + QS (2 g/Kg); QS₁ QS (0,5 g/Kg); QS₂: QS (1 g/Kg); YQ₂: YS + QS (0,5 g/Kg).

No presente estudo, as concentrações de CT, TG, ALT e AST não apresentaram variação entre os grupos (Tabela 4), não apresentando diferenças significativas com grupo controle ($p>0,05$). Contudo, foi constatado maior glicose em YQ₁, QS₁, QS₂ e YQ₂ (40d) e índice glicêmico maior no YQ₁ (90d) em comparação ao DB. Em relação as alterações hepáticas, pode-se observar que AST foi maior nos grupos QS₁, QS₂ e YQ₁ (40d).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos (Médias±desvio padrão) de tilápias-do-Nilo após suplementação com saponinas.

Dia	Grupo	GL (mg/dL)	CT (mg/dL)	TG (mg/dL)	FA (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)
20	DB	81,50 ± 16,12	89,47 ± 13,02	158,12 ± 42,70	26,59 ± 17,34	N.a.	N.a.
	YQ ₁	63,00 ± 9,27	112,75 ± 19,38	112,82 ± 21,83	24,88 ± 8,80	N.a.	N.a.
	QS ₁	63,00 ± 14,73	101,19 ± 33,77	127,82 ± 91,35	24,88 ± 5,86	N.a.	N.a.
	QS ₂	65,00 ± 17,89	103,03 ± 20,26	146,52 ± 70,25	33,17 ± 9,85	N.a.	N.a.
	YQ ₂	89,50 ± 23,71	95,61 ± 13,27	105,64 ± 40,04	33,17 ± 11,72	N.a.	N.a.
40	DB	45,00 ± 0,10 ^a	78,82 ± 16,95	44,91 ± 26,57	33,17 ± 12,46	26,19 ± 16,07	41,90 ± 15,84 ^a
	YQ ₁	87,50 ± 16,66 ^b	84,90 ± 13,88	30,21 ± 7,80	33,17 ± 3,18	26,19 ± 5,37	99,5 ± 26,81 ^b
	QS ₁	94,50 ± 25,31 ^b	91,63 ± 17,77	51,28 ± 15,18	29,03 ± 6,17	26,19 ± 19,98	107,39 ± 46,75 ^b
	QS ₂	93,50 ± 19,32 ^b	90,70 ± 18,09	45,72 ± 16,60	33,17 ± 5,31	26,19 ± 7,92	133,60 ± 52,93 ^b
	YQ ₂	81,00 ± 23,04 ^b	99,95 ± 13,52	37,60 ± 9,10	24,88 ± 8,87	26,19 ± 5,19	67,85 ± 29,86
60	DB	60,50 ± 14,90	84,91 ± 32,95	155,95 ± 61,60	22,36 ± 6,05	31,29 ± 10,68	65,35 ± 27,36
	YQ ₁	53,50 ± 14,51	88,57 ± 9,24	132,80 ± 70,41	18,57 ± 8,23	25,16 ± 9,61	46,76 ± 18,69
	QS ₁	50,50 ± 16,64	89,77 ± 19,71	113,10 ± 34,76	17,39 ± 6,39	36,40 ± 9,59	71,59 ± 22,35
	QS ₂	44,00 ± 11,13	77,51 ± 12,18	89,05 ± 32,82	22,59 ± 7,43	23,23 ± 8,20	52,47 ± 16,87
	YQ ₂	53,50 ± 13,42	97,69 ± 10,44	115,20 ± 32,19	16,72 ± 4,71	27,15 ± 8,00	64,7 ± 18,80
90	DB	54,00 ± 10,90 ^a	86,71 ± 9,34	44,91 ± 9,16	22,81 ± 4,97	12,60 ± 4,44	39,56 ± 7,90
	YQ ₁	73,50 ± 8,49 ^b	90,55 ± 12,72	52,54 ± 12,45	22,99 ± 7,07	11,37 ± 3,12	37,33 ± 10,39
	QS ₁	61,50 ± 11,93	91,37 ± 9,84	63,14 ± 10,51	23,53 ± 7,12	18,84 ± 7,85	26,94 ± 9,26
	QS ₂	66,50 ± 12,57	99,27 ± 14,52	61,26 ± 15,39	22,49 ± 5,79	17,58 ± 7,40	46,61 ± 13,90
	YQ ₂	65,50 ± 14,26	95,64 ± 22,67	60,14 ± 19,35	21,13 ± 5,22	16,76 ± 6,35	52,44 ± 19,51

*Médias com letras diferentes mostram diferenças significativas (p<0,05). N.a.: não amostrado. DB: Dieta basal. YQ₁: YS + QS (2 g/Kg); QS₁ QS (0,5 g/Kg); QS₂: QS (1 g/Kg); YQ₂: YS + QS (0,5 g/Kg).

Os resultados deste estudo mostraram que a atividade respiratória leucocitária diminuiu após 60 dias nos grupos QS₂ e YQ₂ e após 90 dias em YQ₁ e QS₁ (p < 0,05). Por outro lado, a concentração sérica de lisozima e a atividade da via alternativa do sistema complemento dos grupos controle e suplementados não

apresentaram diferenças significativas ao decorrer do período de alimentação ($p > 0,05$) (Figura 1).

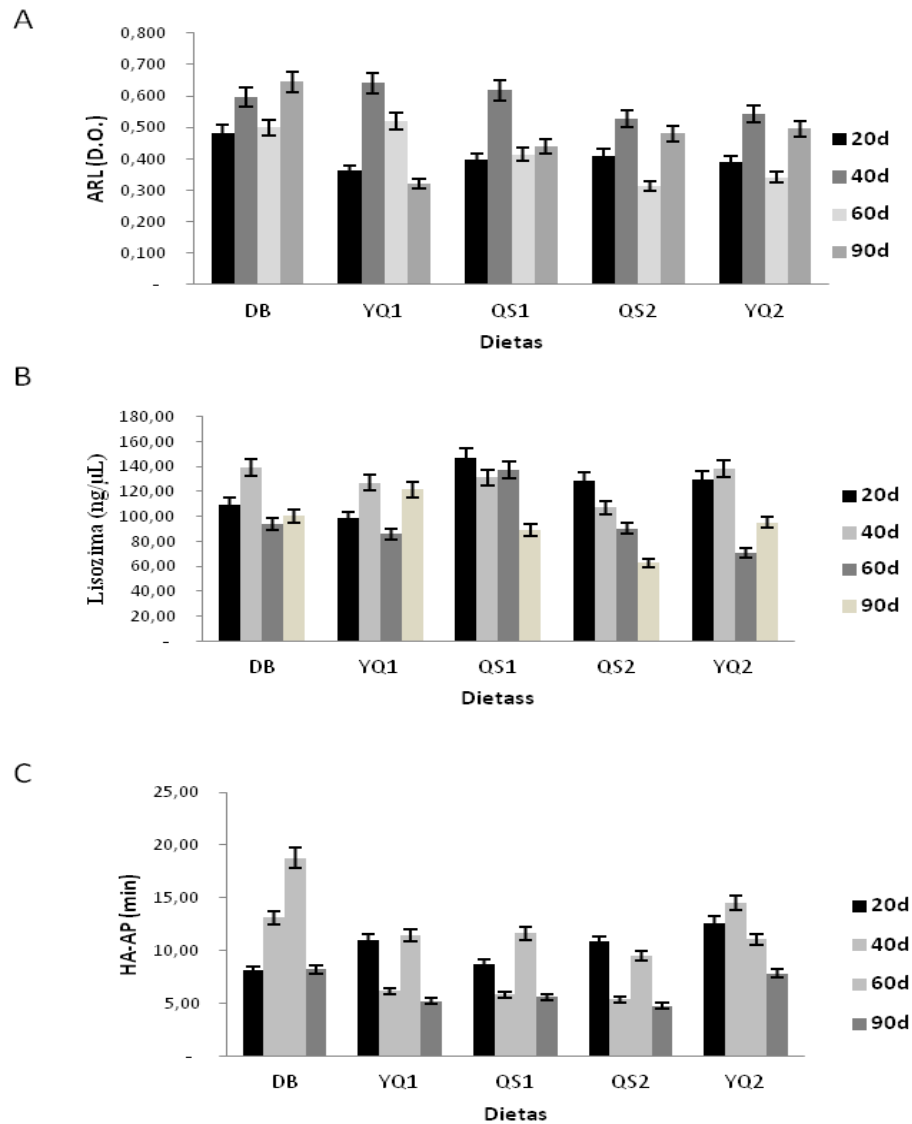


Figura 1. (A) Atividade respiratória dos leucócitos (ARL), (B) níveis de lisozima sérica e (C) atividade do sistema complemento (HÁ-AP) de tilápia do Nilo suplementadas com *Y. schidigera* e *Q.saponaria* por 90 dias.

3.3 Alterações histológicas

A estrutura do fígado foi semelhante nos grupos controle e suplementados (Figura 2). A parte hepática mostrou células poliédricas intactas dispostas em cordões separados por sinusoides sanguíneos. A parte pancreática também apareceu em uma arquitetura normal com partes basofílicas basais e acidofílicas apicais normais. O baço de todos os grupos apresentou estrutura histológica normal com polpas branca e vermelha normais e presença de melanomacrófago distribuído ou agregado. O intestino apresentava vilosidades intestinais normais, revestidas por enterócitos intactos com células caliciformes.

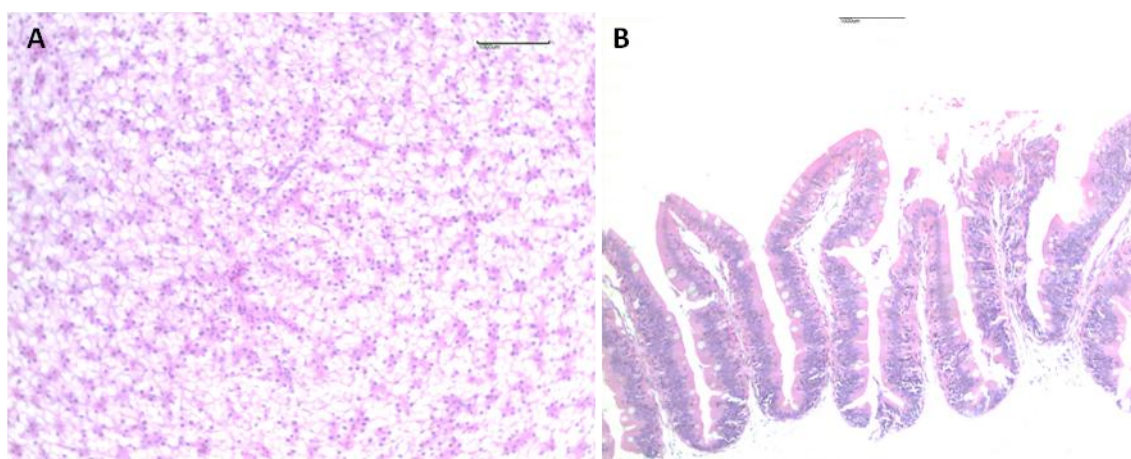


Figura 2. Fotomicrografia da estrutura tecidual normal do fígado e intestino de tilápia após 90 dias de suplementação com saponinas. (H.E. Bar = 100 μ m.).

4 DISCUSSÃO

O desempenho produtivo dos peixes pode ser influenciado por uma série de fatores, como temperatura, manejo alimentar e tempo de inclusão de aditivos. Embora *Y. schidigera* e *Q.saponaria* tenham propriedades conhecidas de melhorar a absorção de nutrientes em alguns animais, a resposta pode variar de acordo com a espécie, a concentração e tempo de suplementação.

No presente estudo, os produtos a base de *Y. schidigera* e *Q.saponaria* usados ao longo de 90 dias de suplementação não melhoraram o desempenho.

Resultados semelhantes já foram relatados para peixes alimentados com saponinas (Krogdahl et al., 1995; Penn et al., 2005; Couto et al., 2015).

Contrapondo, Elbialy et al. (2021) relataram que 8mg/L de *Y. schidigera* é capaz de gerar melhorias na ingestão de alimentos, elevação dos níveis de expressão do fator de crescimento e supressão dos níveis de expressão de miostatina com a restauração das reservas lipídicas e a ativação do potencial lipogênico no tecido adiposo de tilápias. Em outros estudos a suplementação dietética de peixes com *Q. saponaria* (doses de 150 e 300 mg kg⁻¹) melhorou o desempenho e a utilização da ração (Angeles et al., 2017 ; Francis et al.,2002),

Os parâmetros hematológicos são frequentemente usados como indicadores de saúde e estresse em peixes (Tran-Duy et al., 2008; Nagata et al., 2009). Neste estudo, os valores para o número de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM e CHCM estão dentro da faixa reportada para tilápia (Azevedo et al., 2016; Barros et al., 2009;. Nagata et al., 2009; Hisano et al. 2007; Tavares-Dias et al., 2000).

Os efeitos das saponinas de plantas nos parâmetros hematológicos em peixes pode causar algumas alterações que estão dentro dos limites fisiológicos e não indicam efeitos prejudiciais (Mansour et al., 2021; Tewary e Kumar, 2011). O uso do extrato de *Y. schidigera* (0,75 mg L⁻¹) aumentou consideravelmente a contagem de hemácias, o nível de hemoglobina e o hematócrito (Fayed et al., 2019). Em concentrações de 1 mg / m³ adicionado na água por 93 dias apresentou efeito na eliminação de compostos de nitrogênio prejudiciais com efeito positivo nos índices de glóbulos vermelhos, Hct, VCM, HCM, CHCM e número total de leucócitos de *O. niloticus* (Reham et al., 2018).

Os parâmetros bioquímicos em peixes geralmente incluem medidas de função hepática, função renal e indicadores metabólicos. Nossos resultados mostram ausência de efeitos sobre o colesterol, triglicerídeos ALT e FA. Assim como nos nossos achados de Parvathy e Sasikala (2017), eles não encontraram efeitos das saponinas nos parâmetros bioquímicos para carpa indiana (*Catla catla*). Diferente disso, Abozeid et al (2021) relataram que a combinação de *Q. saponaria* e *Y.*

schidigera afeta o metabolismo causando diminuição do colesterol, triglicerídeos, glicose e da creatinina em peixes.

Nosso estudo apota para danos ao metabolismo e função hepática com o aumento da glicose e AST após 40 dias de inclusão da *Q. saponaria* na alimentação de tilápia. Indicando uma resposta fisiológica ao estresse causado pelas saponinas no organismo. Contudo, com 60 dias os peixes mostraram capacidade de adaptação do metabolismo, com a redução desses parâmetros..

O aumento da glicose pode ser uma resposta fisiológica ao estresse ou à excitação inicial causada pela suplementação. Saponinas podem induzir uma resposta de estresse leve, levando à liberação de hormônios como o cortisol, que pode mobilizar reservas de glicogênio no fígado e aumentar temporariamente os níveis de glicose no sangue como uma adaptação fisiológica (Cheeke, 1995).

Segundo Hosseini-Vashan et al. (2016), a suplementação dietética com saponinas *Y. schidigera* e *Q. saponaria* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) resultou na alteração da atividade das enzimas envolvidas nas vias do metabolismo da glicose, levando potencialmente a alterações nos níveis de glicose no sangue. Brauge et al. (2002) estudaram os efeitos das saponinas dietéticas no metabolismo de carboidratos em trutas arco-íris e observaram mudanças significativas no metabolismo de glicose e lipídios.

O aumento observado nos níveis de AST e FA em tilápias alimentadas com *Q. saponaria* e *Y. schidigera* por 40 dias pode ser atribuído ao impacto metabólico desses suplementos na função hepática (Shao et al., 2015; Kumar et al., 2006; Jia et al., 2005). Sendo que, diante dos nossos achados, observou-se que com o decorrer do tempo (após 60 dias de suplementação), os mecanismos adaptativos do fígado e o ajuste metabólico dos peixes levaram ao retorno aos níveis enzimáticos normais.

Diferente dos nossos achados, Elkaradawy et al. (2021) registraram enzimas hepáticas mais baixas (ALT e AST), colesterol, triglicerídeos e glicose após suplementação com *Q. saponaria* (300 mg kg⁻¹). E Angeles et al. (2017), encontraram uma redução na glicemia e nos triglicerídeos da tilápia do Nilo em resposta à suplementação dietética de *Q. saponaria* (150 mg kg⁻¹).

Além do metabolismo, o sistema imunológico foi afetado pelas doses de QS e do combinado de QS + YS. Nossos achados apontam diminuição da atividade respiratória dos leucócitos na tilápia após suplementação com QS₂ (1g/Kg) e YQ₂ (0,5g/Kg) em 60 dias e YQ₁ (2g/Kg) e QS₁ (0,5g/Kg) após 90 dias, provavelmente devido aos efeitos das saponinas nas membranas celulares e nas vias de sinalização intracelular (Borges et al., 2010; Nakahara et al., 2005). Esta diminuição da atividade respiratória, que reflete a produção de espécies reactivas de oxigénio, pode ser prejudicial para a função imunitária dos peixes, afectando a sua saúde geral e a resistência às doenças.

A atividade respiratória dos leucócitos aumenta após entrada de um patógeno no organismo (Klebanoff, 1999). O aumento da produção de EROs por granulócitos, é considerado um indicador da ativação do sistema de imunidade inata (Jorgensen e Robertsen, 1995; Jeney e Anderson, 1993).

Além disso, a fagocitose é um dos mecanismos mais eficazes para eliminar patógenos devido à sua ação imediata (Neumann et al., 2000). Vários estudos avaliaram respostas do sistema imunológico inato de peixes após infecção por patógenos (Reyes-Becerril et al., 2011; Mohanty e Sahoo, 2010; Raida e Buchmann, 2009).

Q.saponaria e *Y. schidigera*, tanto isolada quanto em combinação não melhoraram a atividade da lisozima e do sistema complemento como esperado e já reportado por outros pesquisadores: Njagi et al. (2017) encontraram melhora da atividade plasmática de lisozima, atividade respiratória de leucócitos e resistência contra *Aeromonas hydrophila* com *Y. schidigera* (0,1%). Amoah et al. (2017) encontraram aumento da atividade da lisozima em bagres (*Silurus asotus*) alimentados com *Y. schidigera* (0,05%) por 8 semanas. Da mesma forma, Güroy et al. (2014) concluíram que a incorporação dietética de *Y. schidigera* (0,15%) melhorou a imunidade de bagres listrados (*P. hypophthalmus*). Fayed et al. (2019) descobriram que a presença de *Y. schidigera* (0,75 mg/L) na água melhora o perfil sanguíneo e a imunidade de juvenis de robalo europeu. E Lei et al. (2016) descobriram que a suplementação de *Q. saponaria* gera modulação imunológica específica.

Estudos anteriores relatam que as saponinas influenciam a via alternativa do sistema complemento em peixes, contribuindo para melhorar as respostas imunitárias e potencialmente melhorar a resistência a doenças (Sun et al., 2018; Zhao et al., 2017; Zhang et al., 2016). No entanto, nossos achados diferem sugerindo que os efeitos das saponinas na ativação do complemento podem ser influenciados por vários fatores, como a espécie de peixe, a dose e duração da suplementação (Lei et al., 2017; Wu et al., 2019),

As saponinas podem interagir com outras vias imunológicas além de respostas na atividade da lisozima e da ativação do complemento. Elbially et al. (2021) encontraram níveis de expressão gênica hepática de citocinas pró-inflamatórias *TNF α* e *IL1 B* em peixes suplementados com saponinas. As saponinas também apresentam propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e interagem com saúde intestinal, que podem afetar a função imunológica dos peixes (Zhang et al., 2019; Ma et al., 2017)

Em nossos achados histológicos, a estrutura tecidual normal indica que as saponinas não danificaram os tecidos não causando influências nocivas de (Dawood et al., 2021). Essa análise histológica constituiu um parâmetro para o estudo patológico dos peixes suplementados com os aditivos, sendo crucial para determinar se a inclusão dessas substâncias poderiam causar alterações celulares nos órgãos-alvos (Bernet et al., 1999; Dutta, 1996). Por tanto, esses achados histológicos são valiosos como indicadores do estado geral de saúde, refletindo os danos da alimentação.

Os peixes podem desenvolver intolerância aos extratos de *Yucca* e quillaja após longo período de suplementação dietética. Isso pode resultar em uma resposta reduzida ao suplemento e danos ao organismo, especialmente se não houver condições de estresse que justifiquem a suplementação contínua. Sugere-se o uso de saponinas em doses de 0,5 a 2g/Kg como aditivos por períodos de até 60 dias como estratégia para momentos de manejo e mudanças climáticas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela bolsa de estudos - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS:

Abdel-Tawwab M, Mounes HA, Shady SH, Ahmed KM (2021) Effects of *Yucca*, *Yucca schidigera*, extract and/or yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as water additives on growth, biochemical, and antioxidants/oxidant biomarkers of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture** 533: 736122.

Álvarez F, Illera JC, Redondo LM (2012) Effect of dietary *Yucca schidigera* supplementation on productive performance and egg quality of laying hens. **Animal Feed Science and Technology** 177: 181-186.

Amillano-Cisneros JM et al. (2023) Prebiotics in global and Mexican fish aquaculture: A review. **Animals** 13: 3607.

Amoah YT, Reddy AVB, Lee S, Bae J, Won S, Seong M, Bai SC (2017) Evaluation of different dietary additives based on growth performance, innate immunity and disease resistance in juvenile Amur catfish, *Silurus asotus*. **International Aquatic Research** 9: 351–360.

Angeles IJ, Gallego LM, Navarro MAM, Chien YH (2017) Dietary effects of *Quillaja saponaria* and *Yucca schidigera* extract on rearing performance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. and its antioxidant capacity and metabolic response following hypoxic stress. **International Journal of Agricultural Technology** 13: 2249–2266.

Baruah K, Pal AK (2020) *Yucca schidigera* extract in aquafeed: A promising natural feed additive for sustainable aquaculture. **Aquaculture** 528: 735567.

Bernet D, Schmid H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahl T (1999) Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases** 25-34.

Borges SB, Geyer CK, Zuanon JÁ (2010) Effects of *Quillaja saponaria* saponins on the respiratory burst activity of leukocytes in fish. **Journal of Fish Biology** 76: 788-800.

Calderón K, Zúñiga-Hansen ME, Almara S et al. (2021) The utilization of *Yucca schidigera* extract as a feed additive in aquaculture: A review. **Aquaculture Reports** 21: 100910.

Cheeke PR (1995) Endogenous toxins and mycotoxins in forage grasses and their effects on livestock. **Journal of Animal Science** 73: 909-918.

Chen W, Ai QH, Mai KS, Xu W, Liufu ZG, Zhang WB, Cai YH (2011) Effects of dietary soybean saponins on feed intake, growth performance, digestibility and intestinal structure in juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture** 318: 95–100.

Citarasu, T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. **Aquaculture International**, v. 18, p. 403–414, 2010.

Coutteau P, Van Halteren A, Ceulemans S (2011) Botanical extracts improve productivity of shrimp, *Pangasius*. **Global Aquaculture Advocate** 2011: 90-92.

Dai Z et al. (2023) Comparison of the effects of Yucca saponin, *Yucca schidigera*, and *Quillaja saponaria* on growth performance, immunity, antioxidant capability, and intestinal flora in broilers. **Animals** 13: 1447.

Dawood MAO et al. (2020) Interaction effects of dietary supplements of *Aspergillus oryzae* extract and β -glucan on growth, immune response, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against *Streptococcus iniae*. **Aquaculture** 519: 734917.

Dawood MAO et al. (2021) The regulatory roles of *Yucca* extract on the growth rate, hepato-renal function, histopathological alterations, and immune-related genes in common carp exposed to acute ammonia stress. **Aquaculture** 534: 736287.

De Mesquita EDFM, Andrade FA (2021) Probiotics and Prebiotics in Fish Aquaculture. **Probiotics and prebiotics in foods** 263.

Dutta HM (1996) A composite approach for evaluation of the effects of pesticides on fish. In: MUNSHI JSD, DUTTA HM (Eds.). **Fish Morphology**. Science Publishers Inc., 1996.

ElbialY ZI et al. (2021) Exploring the multimodal role of *Yucca schidigera* extract in protection against chronic ammonia exposure targeting: Growth, metabolic, stress and inflammatory responses in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Animals** 11, : 2072.

Elkaradawy A, Abdel-Rahim MM, Mohamed RA (2022) Quillaja saponaria and/or linseed oil improved growth performance, water quality, welfare profile and immune-oxidative status of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fingerlings. **Aquaculture Research** 53: 576-589.

El-Keredy MSA, Naena NAA (2020) *Yucca* plant as treatment for *Pseudomonas aeruginosa* infection in Nile tilapia farms with emphasis on its effect on growth performance. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences** 66: 64.

Ellis AE (1990) Lysozyme assays. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Robertson BS, Van Muiswinkel WB (Ed.). **Techniques in Fish Immunology**. [S.l.]: SOS Publications, p. 101-103. (Fish Immunology Technical Communications, 1).

Fayed WM et al. (2019) Estimating the effective level of *Yucca schidigera* extract for improvement of the survival, haematological parameters, immunological responses and water quality of European seabass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture Reports** 15: 100208.

Francis G, Makkar HPS, Becker K (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture** 199: 197–227.

Francis G, Makkar HPS, Becker K (2002) Dietary supplementation with a *Quillaja saponin* mixture improves growth performance and metabolic efficiency in common carp. **Aquaculture** 203: 311–320.

Gannam AL et al. (2020) Dietary administration of β -glucan and glutamine improves the immune responses and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* against *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology** 101: 202-209.

Güroy B, Mantoğlu S, Kayali S, Şahin İ (2014) Effect of dietary *Yucca schidigera* extract on growth, total ammonia-nitrogen excretion and haematological parameters of juvenile striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. **Aquaculture Research** 45: 647–654.

Hai NV (2015) The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. **Aquaculture** 446: 88-96.

Jia J, Wang X, Zhang Y (2005) Effects of *Yucca schidigera* on liver function and enzyme activity in fish. **Fish Physiology and Biochemistry** 31: 215-224.

kumar S, Patel T, Roy A (2008) Saponin-mediated modulation of liver enzyme activities in aquatic species. **Aquaculture Research** 37: 476-485.

Lara-Flores M, Olvera-Novoa MA, Guzmán-Méndez BE, López-Madrid W (2003) Use of *Yucca schidigera* extract in aquaculture. **Aquaculture Research** 34: 867-876.

Li Z et al. (2019) Effects of *Yucca schidigera* extract on growth performance, intestinal immune function, and gut microbiota of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Fish & Shellfish Immunology** 93: 883-889.

Montoya-Rodríguez A et al. (2020) *Yucca schidigera* and its uses in human and veterinary medicine. **Journal of Ethnopharmacology** 254: 112718.

Nakahara K, Nakaoka H, Nishida H (2005) Modulatory effects of saponins on phagocytic activity in teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology** 18: 163-175.

Njagi GW et al. (2017) Effects of dietary *Yucca* meal on growth, haematology, non-specific immune responses, and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758). **Aquaculture Research** 48: 4399–4408.

Osti GM et al. (2020) Effects of dietary *Yucca schidigera* on growth performance, immune response and some haematological parameters in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture Nutrition** 26: 260-271.

Pal AK et al. (2018) *Yucca schidigera* extract modulates the expression of stress-associated genes and enhances growth and immune response in rohu (*Labeo rohita* Hamilton). **Fish & Shellfish Immunology** 77: 351-358.

Reham AA, Mounes HAM, Ahmed KM (2019) Use of humic acid and *Yucca* extract as a benefactor on water quality and their impact on some hematological and histological parameters of *Oreochromis niloticus*. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries** 22: 447–460.

Riche M et al. (2013) Effects of feeding *Yucca schidigera* to brook trout (*Salvelinus fontinalis*) on growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and faecal and body microflora. **Aquaculture Nutrition** 19: 548-560.

Rodriguez-Estrada U et al. (2018) *Yucca schidigera* extract enhances growth and stress tolerance via oxidative status and non-specific immune response of juvenile red sea bream (*Pagrus major*). **Aquaculture** 483: 97-104.

Shao Y, Zhang H, Lu Y (2015) Adaptation of liver enzyme activities in fish fed long-term dietary supplements. **Aquaculture Nutrition** 21: 556-564.

Wang W et al. (2018) Effects of dietary nucleotides supplementation on growth performance, immune responses and intestinal structure of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Fish & Shellfish Immunology** 82: 332-340.

Wang J et al. (2019) Effects of dietary saponins on non-specific immune responses, growth performance, digestive enzyme activities and the intestinal structure of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*). **Fish & Shellfish Immunology** 89, : 591-598.

Xie S et al. (2017) Effects of dietary saponins from *Quillaja saponaria* on the growth, feed utilization, body composition, and liver histology of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture** 479: 196–202.

Yuji-Sado R, Raulino-Domanski F, Freitas PFD, Baioco-Sales F (2015) Crecimiento, estado inmunológico y morfología intestinal de la tilapia del Nilo alimentadas con prebióticos (Mananoligosacáridos-MOS) en la dieta. Latin American **Journal of Aquatic Research** 43: 944-952.

Zhou CX et al. (2018) Effects of dietary saponin on growth, non-specific immune responses, and resistance against *Vibrio alginolyticus* of juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). **Aquaculture** 491: 259–265.