



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

THAIS RABELO LISBOA

Suplementação com extrato da macroalga *Kappaphycus alvarezii* na dieta de tilápia-do-nylo: inibição *in vitro* contra *Streptococcus agalactiae*, parâmetros hemato-imunológicos e histopatológicos.

Florianópolis

2021

Thais Rabelo Lisboa

**Suplementação com extrato da macroalga *Kappaphycus alvarezii* na dieta de tilápia-do-
nilo: inibição *in vitro* contra *Streptococcus agalactiae*, parâmetros hemato-imunológicos e
histopatológicos.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Laterça Martins

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lisboa, Thais Rabelo

Suplementação com extrato da macroalga *Kappaphycus alvarezii* na dieta de tilápia-do-nylo: inibição *in vitro* contra *Streptococcus agalactiae*, parâmetros hemato imunológicos e histopatológicos / Thais Rabelo Lisboa ; orientador, Maurício Laterça Martins, 2021.

48 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Macroalga. 3. Metabólitos secundários. 4. Suplementação na dieta. 5. Hematologia e histologia. I. Martins, Maurício Laterça. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Thais Rabelo Lisboa

Suplementação com extrato da macroalga *Kappaphycus alvarezii* na dieta de tilápia-do-nilo: inibição *in vitro* contra *Streptococcus agalactiae*, parâmetros hemato-imunológicos e histopatológicos

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Maurício Laterça Martins, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Mônica Yumi Tsuzuki, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr^a. Eva Regina de Oliveira Rodrigues
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Aquicultura.

Prof^a. Dr^a Leila Hayashi
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

Prof. Dr. Maurício Laterça Martins
Orientador

Florianópolis, 2021.

Dedico este trabalho a minha mãe, Olga, ao meu irmão, Rodrigo,
ao meu companheiro Mario e ao meu bebê que vem a caminho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a minha família. Agradecer pelo suporte que me deram durante meu experimento, pelo suporte em casa, enquanto eu precisava estudar e fazer este trabalho, e pelo suporte psicológico quando eu não andava nos melhores dias.

Obrigada Mario, por além de ser um companheiro de vida e dividir muitos momentos ao meu lado, dividiu comigo as minhas preocupações do mestrado, dividiu alguns conhecimentos para que eu pudesse realizar de melhor maneira meu experimento, e desde o início me apoiou em todas minhas decisões profissionais. E obrigada pelo maior presente da minha vida, nossa filha!

Gostaria de agradecer aos meus amigos da vida, pelos dias leves quando eu precisava fazer algo que não fosse relacionado ao mestrado e falar de coisas que não envolvessem trabalho. Agradeço também pelo simples fato de estarem aí me dando apoio!

Prezados colegas, William, Paula, Elisabeth, Manoela e Lucas, agradeço imensamente a disponibilidade de vocês em participar deste momento acadêmico da minha vida. **MUITO OBRIGADA** pelos dias felizes no laboratório e fora dele. Obrigada pelos conselhos, pelas correções, pela ajuda em experimento e análises e pelos desabafos.

Aos colegas do laboratório AQUOS, muito obrigada pelo auxílio e divisão de conhecimento durante este período, em especial à Lúvia, Scheila e ao Lucas (novamente).

Um agradecimento ao meu orientador, professor Maurício, por me dar a oportunidade de concluir esta etapa da minha vida, e teve paciência para me dar tempo suficiente para que eu pudesse concluir.

Quero agradecer aos professores do departamento de Aquicultura da UFSC, pelo conhecimento e base sólida nesses anos de graduação e mestrado, que me ajudaram a me tornar a profissional que sou, e com isso conquistar o trabalho que sonhei. Agradeço também ao Carlito por todo apoio da parte administrativa.

Eva, muito obrigada pelo auxílio na confecção do extrato e nas análises da alga, sua ajuda foi de extrema importância para que o trabalho pudesse ser realizado. E obrigada ao professor Maraschin e professora Leila por disponibilizarem material e estrutura para trabalhar com a alga.

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

Sou muito grata por ter passado por esse período difícil de pandemia e ter conseguido finalizar este trabalho.

RESUMO

Uma das espécies mais cultivadas no mundo é a tilápia-do-nilo, devido a qualidade da sua carne e rusticidade, que a tornaram de interesse para o desenvolvimento tecnológico de cultivo. Com o aumento dos cultivos de peixes ocorre o aparecimento de enfermidades e mortalidade, ocasionados muitas vezes por maus hábitos no manejo, dietas de má qualidade e aumento da resistência bacteriana mediante a exposição a antibióticos. Consequentemente, a busca por alternativas naturais para tratar e/ou prevenir doenças patogênicas na aquicultura e minimizar danos causados por tratamentos químicos tem aumentado ao longo dos anos. A macroalga *Kappaphycus alvarezii* é muito cultivada para a obtenção de carragenana para as indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética. Por possuírem metabólitos secundários com características antimicrobianas e antioxidantes, a substituição de tratamentos químicos por estes produtos naturais tem sido estudada. O objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação na dieta de tilápia-do-nilo com extrato hidroalcoólico de *K. alvarezii* sobre a resposta hematoimunológica, histológica e desempenho zootécnico após 46 dias de alimentação, além de avaliar a resposta do extrato em estudo *in vitro* contra *Streptococcus agalactiae*. Os extratos foram aspergidos em ração comercial em diferentes concentrações (Macroalga_{1%}, Macroalga_{0,5%}, Macroalga_{0,25%}, Macroalga_{0,125%}) e fornecidos aos peixes, e comparados com peixes alimentados com ração sem extrato. Quanto maior a concentração do extrato de macroalga na dieta, menor foi a porcentagem de crescimento específico. Os resultados não mostraram diferença entre os peixes suplementados e não suplementados. Isto pode indicar que o uso do solvente para extração não foi a melhor escolha ou a forma de adição do extrato na ração poderia ser dada por outra via. No estudo *in vitro* as concentrações de macroalga mostraram resultados positivos quando desafiadas contra a bactéria *S. agalactiae*.

Palavras-chave: Aquicultura, Macroalga, Metabólitos secundários, Suplementação na dieta, Hematologia e histologia.

ABSTRACT

One of the most raised aquaculture species in the world is the *Oreochromis niloticus*, because of their quality of fillet and rusticity, which makes it interesting for technological rearing development. With the worldwide increase of fish aquaculture, the sanitary challenges regarding pathogenic diseases, fish handling, poor quality diets and bacterial resistance have occurred. However, special interest on the search for natural alternatives for treating and preventing pathogenic diseases in aquaculture to minimize damages caused by chemical treatments have increased along the years. The macroalgae *Kappaphycus alvarezii* is widely cultivated for the carrageenan for pharmaceutical, food and cosmetic industries. Because of the secondary metabolites with antimicrobial and antioxidants characteristics, studies to replace chemical treatments by their natural products have been researched. The aim of this study was to evaluate the hydroalcoholic extract of *K. alvarezii* supplementations in the diet of Nile tilapia and its hematological, immunological, histological and performance effects after 46 days of feeding, besides to evaluate the response *in vitro* of the extract against *Streptococcus agalactiae*. The extracts were sprinkled on the commercial feed in different concentrations (Macroalgae_{1%}, Macroalgae_{0,5%}, Macroalgae_{0,25%}, Macroalgae_{0,125%}) and offered to the fish, and compared to fish fed with unsupplemented feed. The results did not show differences among supplemented and unsupplemented fish. The higher concentration of macroalgae extract in the diet indicated the lower the percentage of specific growth rate. The results did not show differences between fish that received supplemented diet and unsupplemented diet. It can be assumed that the solvent for extraction was not the better choice or the way to add the extract could be offered by other way. The extract concentrations of the *in vitro* test had positive results when was challenged against *S. agalactiae*.

Keywords: Aquaculture, Macroalgae, Secondary metabolites, Dietary supplementation, Hematology and histology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Variante verde da macroalga <i>Kappaphycus alvarezii</i>	14
Figura 2 - Tecido do intestino.	30
Figura 3 - Alterações e tecido normal do baço.....	31
Figura 4 - Alterações histológicas em tecido hepático e tecido sem alterações.....	32
Figura 5 - Alterações histológicas em tecido do rim.....	33
Figura 6 - Valores totais dos metabólitos secundários encontrados na amostra de algas do presente estudo.....	36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros zootécnicos de juvenis de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados por 46 dias com adição de diferentes doses de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (Macroalga_{1%}, Macroalga_{0,5%}, Macroalga_{0,25%}, Macroalga_{0,125%}) e peixes não suplementados..... 28
- Tabela 2 - Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros hematológicos de juvenis de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados por 46 dias com adição de diferentes doses de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (Macroalga_{1%}, Macroalga_{0,5%}, Macroalga_{0,25%}, Macroalga_{0,125%}) e peixes não suplementados..... 29
- Tabela 3 - Valores médios \pm desvio padrão de intensidade de alterações histológicas do fígado de juvenis de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados por 46 dias com adição de diferentes doses de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (Macroalga_{1%}, Macroalga_{0,5%}, Macroalga_{0,25%}, Macroalga_{0,125%}) e peixes não suplementados..... 34
- Tabela 4 - Valores médios \pm desvio padrão de intensidade de alterações histológicas do rim de juvenis de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados por 46 dias com adição de diferentes doses de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (Macroalga_{1%}, Macroalga_{0,5%}, Macroalga_{0,25%}, Macroalga_{0,125%}) e peixes não suplementados..... 34
- Tabela 5 - Valores médios \pm desvio padrão de intensidade de alterações histológicas do baço de juvenis de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados por 46 dias com adição de diferentes doses de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (Macroalga_{1%}, Macroalga_{0,5%}, Macroalga_{0,25%}, Macroalga_{0,125%}) e peixes não suplementados..... 35
- Tabela 6 - Valores médios \pm desvio padrão de morfometria e intensidade de alterações histológicas do intestino de juvenis de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados por 46 dias com adição de diferentes doses de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (Macroalga_{1%}, Macroalga_{0,5%}, Macroalga_{0,25%}, Macroalga_{0,125%}) e peixes não suplementados..... 35

SUMÁRIO

1	Introdução	12
1.1	TILAPICULTURA.....	12
1.2	MACROALGA <i>Kappaphycus alvarezii</i>	13
1.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	14
1.3.1	Carotenoides:	15
1.3.2	Compostos Fenólicos:.....	16
1.4	TRATAMENTOS NA PISCICULTURA	16
1.5	Objetivos.....	18
1.5.1	Objetivo Geral	18
1.5.2	Objetivos Específicos	18
1.6	Estrutura do trabalho.....	18
2	Artigo Científico.....	19
2.1	INTRODUÇÃO	22
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
2.2.1	<i>Material biológico e desenho experimental</i>	23
2.2.2	<i>Obtenção do extrato de <i>Kappaphycus alvarezii</i></i>	24
2.2.3	<i>Teste in vitro de mínima concentração inibitória (MIC) e mínima concentração bacteriostática (MBC)</i>	24
2.2.4	<i>Formulação das dietas experimentais</i>	25
2.2.5	<i>Parâmetros zootécnicos</i>	25
2.2.6	<i>Parâmetros hematológicos</i>	25
2.2.7	<i>Parâmetros imunológicos</i>	26
2.2.8	<i>Análise histológica.....</i>	26
2.2.9	<i>Análise dos compostos bioativos (metabólitos secundários)</i>	27
2.2.10	<i>Análise estatística</i>	27
2.3	RESULTADOS	28
2.3.1	<i>Parâmetros zootécnicos</i>	28
2.3.2	<i>Parâmetros hemato-imunológicos.....</i>	28
2.3.3	<i>Análise histológica.....</i>	29
2.3.4	<i>Composição da macroalga</i>	35
2.4	DISCUSSÃO	36
2.5	CONCLUSÃO	39

2.6	AGRADECIMENTOS	39
	REFERÊNCIAS	39
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS DA INTRODUÇÃO	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 TILAPICULTURA

Pertencente à Família Cichlidae, a tilápia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) é originária do continente Africano e tem sido cultivada desde o Egito antigo (AMAL; ZAMRI-SAAD, 2011). O aumento da produção dessa espécie está fortemente relacionado à demanda por parte de um mercado consumidor que valoriza a ausência de espinhas, a facilidade no processo de filetagem, além da qualidade e do sabor da carne (BOSCOLO et al., 2004). Outros fatores importantes são: a tilapicultura desenvolvida geralmente sob condições de poucos recursos tecnológicos, existe uma ampla gama de insumos alimentícios (ração) disponíveis no mercado e a rusticidade da espécie, resultado da fisiologia do animal, que possibilita aos indivíduos tolerarem diferentes níveis de qualidade da água. Além disso, reproduzem-se com facilidade e já possuem um pacote tecnológico completo para sua criação, desenvolvido mundialmente (MEURER et al., 2002; MEURER et al., 2008; NANDLAL; PICKERING, 2004).

Em 2018, a tilápia apareceu como a terceira espécie de peixe mais cultivada no mundo, e sua produção total alcançou a marca de 4,5 mil toneladas, segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2020). Dados da PeixeBR (2020) mostram que, no ano de 2019, o Brasil produziu um total de 432,2 mil toneladas de tilápia (6,8 % da produção mundial), posicionando a espécie como a mais produzida em território nacional. Nesse contexto, a região Sul do país é a que mais se destaca, com um volume de 184,7 mil toneladas (42 mil toneladas a mais que o ano anterior), representando 42,7% da produção brasileira. O estado de Santa Catarina, nesse ínterim, é o terceiro que mais produz a espécie no país, posicionando-se atrás apenas do Paraná e de São Paulo, e é o segundo maior produtor da região Sul (PEIXE BR, 2020).

Este aumento nos números de produção mostra a expansão da tilapicultura nos contextos mundial e brasileiro. No Brasil, a propósito de auferir maiores lucros para a atividade, ocorre um aumento na densidade de estocagem, chegando a 150 kg m⁻³ (BARROSO, et al., 2018) nos cultivos super-intensivos. Esta prática, quando somada à baixa qualidade de água, ao manejo inadequado e à dieta com qualidade inferior a requerida, resulta em um desequilíbrio do sistema imunológico dos peixes e os predispõem ao acometimento de doenças. O contato com micro-organismos presentes naturalmente no ambiente e as portas de entradas deixadas por eles, somados com a debilidade imunológica, pode acarretar na perda completa do plantel (MARTINS, 2004a). Essas perdas trazem prejuízos não somente econômicos, quando se trata

diretamente das mortalidades, mas também outros efeitos deletérios, indiretos, quando imprimem redução da performance reprodutiva, da eficiência na conversão alimentar ou quando existe a necessidade de aplicação de algum tratamento farmacológico e aditivos imunostimulantes na alimentação (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017). Segundo Kubitza (2000), os patógenos que mais acometem a tilapicultura são os parasitos *Trichodina*, outros protozoários, Trematoda, Monogenea e crustáceos, além das bactérias, que são as maiores causadoras de surtos de mortalidade.

1.2 MACROALGA *Kappaphycus alvarezii*

Macroalgas são organismos multicelulares, fotossintéticos não vasculares, que contêm clorofila *a*, estrutura reprodutiva simples e composição química dependentes da espécie, habitat e da condição ambiental (KHAWYLI, et al., 2020). Estas têm sido utilizadas pelo homem há mais de 14 mil anos como alimento e medicamento, além de serem importante componente na Aquicultura Multitrófica Integrada - IMTA (*Integrated Multi-Trophic Aquaculture*) (BUCHHOLZ; KRAUSE; BUCK, 2012).

Segundo dados da FAO (2020), a *Kappaphycus alvarezii* está em sexto lugar como a alga mais cultivada no mundo, com um total de 1,597 mil toneladas. Atualmente, o cultivo dessa espécie é muito visado devido ao grande interesse relacionado à sua composição, cujos compostos são utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (SANTOS, 2014; FADILAH et al., 2016).

A prospecção para ampliar os usos dessa macroalga, objetiva agregar mais valor ao produto e seus derivados, e tende a impulsionar o cultivo comercial de maneira que modifique o cenário social com geração de empregos, e o cenário econômico com incremento na renda das populações associadas a este trabalho (HAYASHI; REIS, 2012). Um estudo feito por Rudke, Andrade e Ferreira (2020), mostra que já existe potencial dessa rodófito como fonte para obtenção de proteínas, compostos fenólicos, fertilizantes, pigmentos e glicose (como base para obter etanol).

Apesar de o Brasil ter uma costa de 8.500 km de extensão (Ministério do Meio Ambiente, 2020), o cultivo de algas ainda é pouco explorado no país, pois a atividade depende de liberação dos órgãos competentes, e deve ser realizada em área destinada à aquicultura. Após 11 anos de pesquisas no estado, a *K. alvarezii* passou a ter permissão de ser cultivada para fins comerciais em Santa Catarina, em áreas já pré-determinadas pelos Planos Locais de Desenvolvimento da Maricultura – PLDM, regulamentada pela Instrução Normativa de N° 1 de 21 de Janeiro de 2020, publicada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos

Naturais Renováveis – IBAMA. A partir desta liberação, surge uma nova oportunidade de atividade aquícola no estado de Santa Catarina. Como visto anteriormente, esta macroalga possui em sua composição metabólitos de interesse comercial, o que torna mais atraente a opção desta espécie para interesse de cultivo.

Além de possuir o ficocoloide, que traz retorno financeiro a quem produz, a *K. alvarezii* tem características que facilitam o cultivo, como seu crescimento rápido, podendo duplicar sua biomassa em 15 dias, e o baixo custo nos materiais comumente utilizados no manejo (SANTOS, 2014). A *K. alvarezii*, comercialmente conhecida como *cotonii*, pode ser cultivada em climas tropical e subtropical, com temperaturas média entre 27,8 °C e 22,5 °C, respectivamente (RUDKE; ANDRADE; FERREIRA, 2020). Esta macroalga, que pertence ao Filo Rhodophyta (algas vermelhas), pode aparecer nas cores verde, marrom, amarelada e avermelhada, a depender da concentração de pigmento presente nas células (GERENIU, et al., 2017).

Figura 1 – Variante verde da macroalga *Kappaphycus alvarezii*. Fonte: Arquivo pessoal



1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Metabólito secundário é o nome utilizado para um produto natural proveniente do metabolismo de algas, plantas e alguns micro-organismos. Esse produto possui característica de estratégia química, ou seja, trata-se de um composto de defesa tóxico ou de um metabólito *antifouling* (VERPOORTE, 2000; MASCHEK; BAKER, 2008). O termo “secundário” geralmente é utilizado no contexto em que algo secundário é menos importante, mas nesse caso, é porque o metabolismo primário é responsável pelas funções vitais de sobrevivência, diretamente ligadas ao desenvolvimento e crescimento, isto é, funções celulares. Enquanto o

metabolismo secundário é a via por onde as plantas e as algas produzem compostos que auxiliam contra agente externos, garantindo assim sua sobrevivência. Suas sínteses, também podem ser ativadas sob certas condições ecológicas, geográficas e ambientais ou em fases específicas do ciclo de vida das algas (LALEGERIE et al., 2020). Metabólitos secundários podem ser divididos em três classes: compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides (HARBORNE, 1999). Em termos de abundância e variedade, as Rhodophytas são as algas mais ricas em bioativos (MASCHEK; BAKER, 2008).

Nas últimas décadas o foco maior tem sido dado às propriedades dos metabólitos secundários das algas que, possivelmente, atuam no sistema imunológico (HURTADO, 2020). Além de apresentarem benefícios no metabolismo das próprias algas, como proteção e adaptação (GANESAN; TIWARI; RAJAURIA, 2019), muitos desses compostos apresentam atividades antimicrobiana (ABIRAMI; KOWSALYA, 2011; PRABHA; PRAKASH; SUDHA, 2013). Esta propriedade, entretanto, não é atribuída a um único composto, mas à sinergia de diferentes metabólitos. Ainda é difícil identificar um único composto bioativo, ou qual sua via metabólica e mecanismo de ação, devido à falta de padronização nos resultados reportados, às influências do ambiente onde a alga estava sendo cultivada, ou onde foi coletada, às metodologias de extração, às análises microbiológicas e aos micro-organismos testados (ABU-GHANNAM; RAJAURIA, 2013).

Os níveis de compostos antimicrobianos a ser mantidos nos extratos de algas dependem consideravelmente do preparo da amostra a ser utilizada. Corroborando esta informação, Pedra et al. (2017) encontrou maior quantidade de fenólicos e carotenoides em *K. alvarezii* cultivadas em efluentes de camarões marinhos, visto que continham nutrientes, do que em amostras cultivadas apenas em água marinha. Outros metabolitos podem ser manejados ou impulsionados com estresses ambientais (GUERRIEIRO et al., 2018)

1.3.1 Carotenoides:

Os carotenoides, subclasse dos terpenos, estão entre os pigmentos naturais mais comuns e, são sintetizados por plantas, algas e por alguns micro-organismos. São comumente caracterizados por uma longa cadeia de duplas ligações conjugadas, sempre com uma ou duas estruturas cíclicas (anel B-ionona), que terminam em ligações conjugadas, e geralmente possuem 40 átomos de carbono (tetraterpenos) (CARDOZO et al. 2007; BRITTON et al 2004). Devido a sua característica lipofílica, são facilmente absorvidos, transportados e excretados pelo organismo (STAHL; SCHWARZ; SIES, 1993). Esses pigmentos são produzidos por macroalgas marinhas como uma forma de defesa celular e podem ser afetados pela foto

oxidação. A foto oxidação ocorre quando, ao serem expostas à alta irradiância de luz, as macroalgas passam por uma foto destruição de seus pigmentos fotossintetizantes. Esse processo pode levar a uma foto-inibição, isto é, declínio da atividade fotossintética (ARAÚJO; DEMINICIS, 2009). A eficácia dos carotenoides, como antioxidantes, está relacionada à proteção que estes dão às células e aos tecidos e pode estar associada ao número de duplas ligações conjugadas e à sua polaridade (BARREIROS et al 2006; IBAÑEZ; CIFUENTES, 2013).

1.3.2 Compostos Fenólicos:

Compostos fenólicos, em algas marinhas, têm grande importância na fisiologia de proteção contra radiações ultravioletas, defesa anti-herbivoria, resistência a patógenos e proteção contra o crescimento de epífitas (AMSLER; FAIRHEAD 2006). Sua estrutura é composta de pelo menos um anel benzênico ligado a grupamento hidroxila (KUSKOSKI et al., 2005) e normalmente são polares.

Podem atuar na prevenção de inúmeras patologias devido a sua capacidade antioxidante (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; TABART et al., 2009), assim como em atividades antitumoral, antiviral e anti-inflamatória, sendo essa última com grande atividade a partir de Rhodophytas (IBAÑEZ; CIFUENTES, 2013; RANGANAYAKI; SUSMITHA; VIJAYARAGHAVAN, 2014). Segundo Bhuyar (2020), a *K. alvarezii* demonstrou atividade antibacteriana associada a compostos secundários, tais quais os fenólicos, quando utilizada a partir de extrato etanólico. A mesma alga também mostrou conter altas concentrações de fenólicos em extração usando água como solvente, quando comparada com etanol e metanol (NASERI; HOLDT; JACOBSEN, 2019)

1.4 TRATAMENTOS NA PISCICULTURA

O uso de quimioterápicos na aquicultura, para fins de tratamento, anestesia, profilaxia (banhos e vacinas), ou até mesmo como desinfetantes e pesticidas nas estruturas de cultivo, são regulamentados em alguns países, onde são determinadas as doses e limites para seu uso (COSTELLO et al., 2001). Porém, em muitos lugares a utilização é indiscriminada e, algumas vezes, ilegal. O uso excessivo de produtos químicos na produção pode deixar resíduos no ambiente e na carne do animal (MARTINS, 2004b), bem como contribuir na formação de cepas resistentes.

Devido ao aumento constante do volume de produção, a procura por tratamentos alternativos (como derivados de plantas) está sendo difundida para uma aquicultura mais

sustentável, em que se busca evitar o uso de produtos químicos para melhorar a condição imunológica dos animais (SHAKYA, 2015; BRUM et al., 2018). Existem muitos estudos com óleos essenciais, biomassa seca e extrato de plantas, porém se buscam mais alternativas com distintas fontes de biocompostos.

Macroalgas são apontadas como uma ótima opção para esse tratamento alternativo, agindo como aditivos imunoestimulantes, devido às suas propriedades químicas. Possuem ainda um viés econômico vantajoso, pois são uma fonte renovável, não requerem irrigação e em ambiente natural não necessitam fertilizantes, e ocupam apenas um terço do espaço necessário para cultivo de plantas terrestres (RAJAURIA, 2015).

Pesquisas mostram que peixes cultivados com inclusão de plantas e algas na ração ou na água apresentaram aumento do número células de defesa contra agentes externos, além de terem uma diminuição na mortalidade quando desafiados por micro-organismos (CAIPANG et al., 2011; REVERTER et al., 2014). Uma revisão feita por Vatsos e Rebours (2015), sugere que a adição de extratos de macroalgas à alimentação pode apresentar atividade contra patógenos, provocando inibição do crescimento de bactérias e estimulando o sistema imunológico de animais.

Segundo Bhowmick et al. (2020), diversos metabólitos de algas vêm sendo estudados nas últimas décadas devido às suas propriedades medicinais, com alta atividade antibacteriana contra um amplo espectro de bactérias, incluindo cepas já resistentes a drogas químicas. O mecanismo dos metabólitos secundários de plantas, que influencia no sistema imunológico de peixes, ainda não está bem definido, porém já se sabe da capacidade antioxidante e antimicrobiana de alguns compostos, como os flavonoides e os pigmentos das plantas e algas (ABDEL-TAWWAB et al., 2010). Nazzaro et al. (2020), realizaram uma revisão sobre os biocompostos de algas como potenciais prebióticos – ingrediente seletivo que resulta em mudanças específicas na composição e/ou da atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo assim benefícios à saúde do hospedeiro (GIBSON et al., 2010), mostrando mais uma vez a importância e a vasta utilização de algas.

Com o presente trabalho busca-se identificar os efeitos da adição da macroalga *Kappaphycus alvarezii* na alimentação de tilápia, nos parâmetros hemato-imunológicos, no desempenho zootécnico e nas características histológicas.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do uso de extrato da macroalga *Kappaphycys alvarezii* na alimentação da tilápia-do-nilo, sobre as respostas zootécnica, hemato-imunológica e histopatológica.

1.5.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar a concentração mínima inibitória (MIC) e bacteriostática (MBC) do extrato da macroalga contra *Streptococcus agalactiae*, por meio de ensaio *in vitro*;
- b) Avaliar a resposta hemato-imunológica em juvenis de tilápia-do-nilo, alimentados com adição do extrato da macroalga *K. alvarezii*;
- c) Caracterizar as principais alterações histopatológicas em órgãos de tilápia-do-nilo alimentadas com adição de extrato de *K. alvarezii*.
- d) Analisar o desempenho zootécnico de peixes alimentados com aditivos de extrato de *K. alvarezii*.
- e) Analisar o perfil de metabólitos secundários da macroalga *K. alvarezii*.

1.6 ESTRUTURA DO TRABALHO

Esta dissertação é composta por um artigo científico, que será submetido ao periódico “Fish and Shellfish Immunology”.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATO DA MACROALGA *Kappaphycus alvarezii* NA DIETA DE TILÁPIA-DO-NILO: INIBIÇÃO *in vitro* CONTRA *Streptococcus agalactiae*, PARÂMETROS HEMATO-IMUNOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS.

Thais Rabelo Lisboa¹, Lúvia Souza de Sá, Lucas Cardoso¹, Eva Regina de Oliveira², Leila Hayashi¹, Marcelo Maraschin², Mauricio Laterça Martins¹

¹Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Rodovia Admar Gonzaga, 1346, CEP 88034-000, Florianópolis, SC, Brazil.
Phone: +55-48-3721-6300.

²Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Rodovia Admar Gonzaga, 1346, CEP 88034-000, Florianópolis, SC, Brazil.

Phone: +55-48-3721-5442

* Corresponding author: thaisrabelolisboa@gmail.com

RESUMO

A procura por alternativas ao uso de antibióticos e químicos nos tratamentos de enfermidades vem crescendo na aquicultura, com o intuito de diminuir a resistência bacteriana e acúmulo de resíduos na carne do animal e no meio ambiente. Com isso, este trabalho teve como objetivo avaliar as respostas hemato-imunológicas de tilápias-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentadas com adição de extrato da macroalga *Kappaphycus alvarezii*, bem como identificar possíveis alterações histológicas, e avaliar o desempenho zootécnico, embasando-se de que macroalgas possuem compostos bioativos que apresentam características antimicrobianas e antioxidantes. Previamente o teste *in vitro* mostrou resultado positivo a partir da dose inicial do extrato feito com a macroalga contra a bactéria *Streptococcus agalactiae*, e estas concentrações foram utilizadas para determinar as doses a serem utilizadas no experimento *in vivo*. Os animais foram alimentados durante 46 dias com dietas contendo diferentes doses do extrato (Macroalga_{1%}, Macroalga_{0,5%}, Macroalga_{0,25%}, Macroalga_{0,125%}) aspergidas em ração comercial, e comparados com tratamento controle, sem qualquer tipo de adição do extrato (não suplementado). Ao final do experimento foram coletadas amostras para análises hematológicas, imunológicas e histológicas, e os peixes foram pesados. Apesar de não haver diferença significativa no crescimento dos animais, houve diferença positiva no crescimento específico dos animais não suplementados, seguido pelo tratamento Macroalga_{0,125%}, o que pode indicar baixa palatabilidade do alimento com a adição do extrato. As análises hemato-imunológicas mostraram diferença significativa na análise de glicose, indicando que as concentrações de Macroalga_{0,5%} e Macroalga_{0,25%} tiveram maiores médias ($p < 0,05$). Nas outras análises, os tratamentos não mostraram diferença entre os peixes alimentados com adição de extrato e sem a suplementação, o que pode indicar que as concentrações podem não ter sido suficientes, ou a extrato utilizado não apresentava um bom perfil de compostos. Histologicamente não se notou maiores alterações, ou algo que indique danos causados pela alimentação. Neste estudo, o uso do extrato da macroalga *K. alvarezii* nas formas e concentrações testadas não mostrou mudanças significativas no estado de saúde dos animais observados.

Palavras-chave: aquicultura, metabólitos secundários, macroalga, hematologia, histologia.

ABSTRACT

Nowadays the search for alternatives to antibiotics and chemicals used for treatments are increasing in aquaculture, with the intension of decreasing bacterial resistance, accumulation of waste in the fillet and the environment. With that in mind, this work had as objective to evaluate the hematological and immunological response in Nile tilapia fed with *Kappaphycus alvarezii* extract added in the feed, besides identifying histologic changes and performance, based on what macroalgae has bioactive compounds with antimicrobials and antioxidants characteristics. Previously, the *in vitro* test showed positive results from the initial dose of the extract when challenged against bacterium *Streptococcus agalactiae*, those doses were used as the ideal doses on the feed. The fish were fed 46 days with diets containing different doses of sprinkled extract on the commercial feed (Macroalgae_{1%}, Macroalgae_{0.5%}, Macroalgae_{0.25%}, Macroalgae_{0.125%}), and compared to control treatment (Unsupplemented) without any extract added. In the end of experiment samples were collected for hematological, immunological and histological analysis, in joint with fish weight measures. Although there is no statistical difference in terms of fish growth, there is a positive difference on the specific growth rate in

unsupplemented fish, followed by Macroalgae_{0.125%}, that can indicate a low palatability of the feed that contains the extract. In the results of hematological analysis, the groups Macroalgae_{0.5%} and Macroalgae_{0.25%} showed significant difference in glucose, with an increase in the average ($p < 0,05$). The results of other hematological and immunological analysis did not show statistic difference among the fish fed with addition of extract or without supplementation, that can indicate the concentrations could not been enough, or the extract did not have a good profile . Unfortunately, the higher the concentration of macroalgae extract in the diet, the lower the percentage of specific growth. On the other hand, it can be assumed that the concentrations were not enough to make different result, or the algae did not have a good compounds profile. Histologically, no major changes were noted that indicates damages caused by feed. In this study, the use of extract from *k. alvarezii* in these way or concentration did not show benefits or significant changes in the health of observed animals.

Keywords: aquaculture, secondary metabolites, macroalgae, hematology, histology.

Highlights

- Suplementação alimentar com a macroalga *Kappaphycus alvarezii* não afetou a saúde de tilápia-do-nilo.
- As concentrações de glicose nos peixes alimentados com Macroalga_{0,5%} e Macroalga_{0,25%} foram maiores do que os demais tratamentos.
- A análise histológica não mostrou influência da suplementação na dieta dos peixes.
- Sugere-se o uso de outra forma de extração de compostos fenólicos e carotenoides para inclusão na dieta de tilápia-do-nilo.

2.1 INTRODUÇÃO

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) está entre as três espécies de peixes mais cultivadas do mundo [1], e no Brasil a região Sul se destaca como maior produtora [2]. O grande número da produção se dá por parte do mercado consumidor que aprecia a carne [3], pela tolerância dos animais em relação a parâmetros de qualidade de água, estruturas, bom desempenho zootécnico e estratégias de cultivo bem desenvolvidas que a espécie já apresenta [4-6].

Com o crescimento da demanda, a expansão da tilapicultura ocorre com o aumento da densidade de estocagem nos cultivos [7]. Quando somamos a alta demanda com a baixa qualidade de água, manejo inadequado e dieta de baixa qualidade, gera um desequilíbrio no sistema imunológico dos peixes. A partir desta debilidade imunológica, o contato com microorganismos presentes no ambiente pode acarretar em perdas completas da produção. Com isso, ademais das perdas econômicas, ocorrem prejuízos de performance, redução na conversão alimentar, ou necessidade de aplicação de fármacos e aditivos imunoestimulantes [8]. O uso de quimioterápicos na aquicultura vem ocorrendo de forma indiscriminada em locais onde não existe uma regulamentação de doses, e são utilizados tanto como para tratamento de enfermidade, quanto para prevenção e profilaxia [9].

A busca por produtos naturais, que não tenham impacto direto ao meio ambiente, não deixam resíduos na carne, e não ajudam a promover a resistência bacteriana já existente, é uma alternativa de tratamento e prevenção que vem sendo estudada e utilizada nas últimas décadas. A utilização de macroalgas vem como alternativa para um novo uso de um produto aquícola de qualidade. Hoje, algumas algas são utilizadas como alimento, em indústrias farmacêutica e cosmética, devido a grande composição de ficocoloide que pode ser extraído [10,11]. A *Kappaphycus alvarezii* é a sexta macroalga mais produzida no mundo [1], devido a grande quantidade de carragenana em sua composição. Além do interesse econômico, essa macroalga possui características que são benéficas quando se trata de cultivos, como crescimento rápido e baixo custo de produção [10].

Outro tópico importante da vantagem de se usar a *K. alvarezii*, é sua composição química, que produz metabólitos secundários, os quais possuem características que são utilizadas como parte da estratégia de defesa de plantas e algas [12,13]. A importância desses biocompostos tem sido alvo de muitos estudos, pois os resultados mostram que metabólitos secundários, isolados ou em sinergia, podem apresentar atividade antimicrobiana e atuar no sistema imunológico [14-16].

Os carotenoides são metabólitos secundários, produzidos por plantas e algas marinhas, e tem poder antioxidante [17,18] ademais são produzidos como forma de defesa celular, para evitar a alta exposição à irradiância da luz solar, protegendo assim seus pigmentos fotossintetizantes [19]. Já os compostos fenólicos são produzidos para proteção contra radiações ultravioleta, defesa contra herbivoria, resistência a patógenos e proteção contra o crescimento de epífitas [20]. Estes compostos podem atuar em prevenção de patologias devido sua capacidade antioxidante [21,22], assim como em atividades antitumoral, antiviral, e anti-inflamatória, sendo esta última com grande atividade a partir de Rhodophytas [18,23].

Este estudo objetivou avaliar a suplementação na dieta com diferentes concentrações de compostos extraídos da macroalga *K. alvarezii* sobre os parâmetros hemato-imunológicos, histológicos e zootécnicos da tilápia-do-nilo.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Material biológico e desenho experimental

Em agosto de 2019, 325 juvenis de tilápia-do-nilo ($7,08 \pm 2,14$ g de peso em média \pm desvio padrão), provenientes da empresa Acqua Sul Piscicultura ($26^{\circ}51'07.2''S$ $48^{\circ}51'36.9''W$), foram recebidos no Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, da Universidade Federal de Santa Catarina (AQUOS/UFSC). A macroalga *K. alvarezii* foi fornecida pela seção de macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM/UFSC), coletada em abril de 2019.

Foram utilizados 13 peixes por unidade experimental acondicionados em tanques de 80 L cada, com sistema de recirculação de água e aeração constante, cada tratamento teve 5 repetições. Os animais foram alimentados por 46 dias, de acordo as dietas determinadas para cada tratamento de acordo (item 2.2.4), *ad libitum*. Os parâmetros de qualidade de água se mantiveram dentro dos padrões aceitáveis para a espécie durante todo o experimento, e os registros são mostrados sob forma de média \pm desvio padrão, como segue: oxigênio dissolvido $8,45 \pm 0,74$ mg L⁻¹ e temperatura $28,12 \pm 0,13$ °C (medidos com multiparâmetro Hanna modelo HI98194), pH $6,96 \pm 0,26$, amônia total $0,08 \pm 0,06$ mg L⁻¹, nitrito $0,01 \pm 0,00$ mg L⁻¹ e alcalinidade 40 mg de CaCO₃ L⁻¹ (medidos com kit colorimétrico LabconTest®).

Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA 3023220419 (ID 001271)).

2.2.2 Obtenção do extrato de *Kappaphycus alvarezii*

A macroalga *K. alvarezii* foi coletada na Unidade Demonstrativa de Maricultura (CCA/UFSC), no bairro Sambaqui e transportada para a seção de macroalgas do LCM. Posteriormente, as algas foram levadas ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV/CCA/UFSC), para serem lavadas com água salgada e limpas manualmente a fim de retirar epífitas e outros organismos incrustados. Após, foram dessalinizadas em banho com formiato de amônio 0,5 M por 30 s e, em seguida, lavadas com água destilada. As algas foram liofilizadas a vácuo à temperatura de - 50 °C durante 72 h. A extração hidroalcoólica 70 % foi feita utilizando extrator de ultra pressão, equipamento desenvolvido no LMBV, cujo protótipo encontra-se sob patenteamento. Para confecção, foram utilizados 15 g de biomassa seca para cada 100 mL de solução extratora (álcool etílico 70 %), conforme protocolo desenvolvido pelo grupo, com modificações. O sobrenadante da mistura resultante foi reduzido em rota evaporador a extrato aquoso. A concentração resultante (mg mL^{-1}) contida na solução estoque foi determinada a partir da liofilização de 1 mL desta solução, e foi de 38mg/ml. A solução mãe do extrato foi mantida a - 80 °C até sua suplementação na ração.

2.2.3 Teste *in vitro* de mínima concentração inibitória (MIC) e mínima concentração bacteriostática (MBC)

No AQUOS, a bactéria *Streptococcus agalactiae* foi incubada a partir de uma solução mãe, em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), à temperatura de 30 °C, por 24 h. Em seguida, a partir da curva de crescimento, foi verificada a concentração do inóculo, o qual foi diluído em meio de cultura pobre (do Inglês, *Poor Broth*). Em uma microplaca de fundo chato com 96 poços, foram adicionados 150 μL de BHI no primeiro poço e 100 μL nos demais poços da microplaca. Posteriormente, 50 μL da concentração mãe do extrato de macroalga foram adicionados no primeiro poço da linha, e realizou-se diluição seriada no fator 2 até o 12° poço. Na sequência, foram adicionados 20 μL da suspensão bacteriana contendo *S. agalactiae* na concentração de 0,5 na escala Macfarland ou 1×10^8 UFC mL^{-1} diluídas em BHI. Em seguida, a placa foi incubada por 24 h a 30 °C e, após esse período, foi aferida a absorbância. A atividade antimicrobiana foi determinada por meio da concentração mínima de 2,36 mg mL^{-1} , em que o extrato de macroalga conseguiu inibir o crescimento da bactéria patogênica, e a mínima concentração bactericida foi definida na concentração 9,5 mg mL^{-1} , em que o extrato de macroalga promoveu a morte da bactéria.

2.2.4 Formulação das dietas experimentais

Os peixes juvenis foram alimentados com ração comercial (Puro Trato Nutrição Animal) 36 % de proteína bruta, com 2 mm de granulometria. Após a determinação das concentrações em teste *in vitro* de MIC e MBC, as quatro concentrações de extrato escolhidas foram aspergidas na ração comercial de acordo com cada tratamento.

As concentrações de cada tratamento foram as seguintes: Macroalga_{1%}: 1% de extrato (38 mg/mL/kg de ração), Macroalga_{0,5%}: 0,5% de extrato (19 mg/mL/kg de ração), Macroalga_{0,25%}: 0,25% de extrato (9,5 mg/mL/kg de ração), Macroalga_{0,125%}: 0,125% de extrato (4,75 mg/mL/kg de ração) e peixes não suplementados com o extrato (somente ração comercial).

2.2.5 Parâmetros zootécnicos

Os peixes foram pesados individualmente, uma vez por semana, desde o início do experimento ($7,29 \pm 2,02$ g de peso). Os cálculos relacionados aos índices zootécnicos foram realizados semanalmente e determinados conforme os seguintes dados: taxa de sobrevivência (%), ganho de peso (g), conversão alimentar e taxa de crescimento específico.

2.2.6 Parâmetros hematológicos

Ao final do experimento, quatro animais de cada repetição foram coletados e anestesiados com Eugenol (75 mg L^{-1}). Para a realização das análises hematológicas, foi utilizada uma alíquota de sangue, obtido por punção do vaso caudal com auxílio de uma seringa contendo EDTA 10%.

Uma fração da amostra de sangue foi diluída em fluido de Dacie (1:200) modificado para contagem total de eritrócitos (RBC) em câmara de Neubauer [24]. Outra porção foi utilizada para determinação do hematócrito, processado pelo método do microhematócrito [25]. A concentração de hemoglobina foi determinada por meio do método da cianometahemoglobina, e o cálculo das equações hematimétricas foram obtidos com a determinação da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e do volume corpuscular médio (VCM) [26].

Uma alíquota de sangue foi utilizada para confecção de extensões sanguíneas em duplicata, que foram coradas com May-Grünwald-Giemsa-Wright [26], para contagem total de leucócitos (WBC) e trombócitos, pelo método indireto, e contagem diferencial de leucócitos [27].

A concentração de glicose plasmática foi determinada imediatamente após a coleta de sangue de cada peixe, utilizando glicosímetro portátil *Accu-Chek*[®] Advantage (Roche Diagnóstica, Brasil).

2.2.7 Parâmetros imunológicos

Com o restante do sangue coletado foi realizado um *pool* de todas as amostras de cada unidade experimental, que foi centrifugado a 1400 g por 15 min a 4 °C para separação do plasma. O mesmo foi armazenado a -20 °C até sua utilização nas análises imunológicas.

A concentração de proteína total do soro sanguíneo foi obtida com o kit de Proteína Total (Lab Test[®]). A concentração da imunoglobulina total foi mensurada de acordo com o método descrito por Amar et al. (2000) [28], adicionando-se 50 µL de plasma a 50 µL de solução de polietileno glicol (PEG) (Sigma-Aldrich) 12 %. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 2 h para que ocorresse a precipitação de moléculas de imunoglobulina. Esse precipitado foi removido por centrifugação (5000 g a 4 °C por 10 min) e o sobrenadante retirado para mensurar a quantidade de proteína total, utilizando-se albumina bovina para confecção da curva padrão. A concentração de imunoglobulina total foi expressa em mg mL⁻¹ e dada pela fórmula:

$$\text{Ig Total} = \frac{(\text{proteína total do plasma} - \text{proteína total tratada com PEG})}{\text{volume mL}}$$

2.2.8 Análise histológica

Ao final dos 46 dias de alimentação, 12 animais por tratamento (os mesmos utilizados para análises hemato-imunológicas) foram anestesiados em solução de eugenol (75 mg L⁻¹) e eutanasiados por secção da medula para coleta das amostras histológicas. Fragmentos do fígado, baço, rim e porção média do intestino foram fixados em formalina tamponada a 10%. O tecido foi desidratado usando uma série crescente de etanol, depois clarificado em xilol e finalmente embebido em parafina a 60 °C, de acordo com Martins et al. (2018) [29]. Cortes de 3 a 5 µm de espessura (micrótomo PAT-MR10) foram corados com Hematoxilina de Harris e Eosina (H&E). Após a coloração, as lâminas foram montadas em meio Entellan[®] e analisadas em microscópio de contraste de interferência de fase Axio Imager A.2 (DIC) (Zeiss, Gottingen, Alemanha).

Na análise morfométrica do intestino médio, foram medidos, em cada corte histológico, o número de vilosidades intestinais, o comprimento (µm) das vilosidades intestinais, a largura (µm) das vilosidades intestinais, o número de células caliciformes, a área

total (μm^2) e o perímetro total (μm) de cada vilosidade. O comprimento, a largura, o perímetro e a área das vilosidades foram medidos com auxílio do software Zen Pro (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Foram atribuídos valores às alterações histológicas de todos os órgãos de acordo com o grau de intensidade: 0 (ausência de alteração), 1 (alteração leve, correspondendo a menos de 25% da área do tecido), 2 (alteração moderada, 25% a 50% da área do tecido) e 3 (alteração grave, mais de 50% da área do tecido), seguindo o método descrito por Schwaiger et al. (1997) [30] com pequenas modificações, propostas por Brum et al. (2018) [31].

2.2.9 Análise dos compostos bioativos (metabólitos secundários)

As análises para extração e quantificação dos metabólitos secundários foram realizadas no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV/CCA/UFSC). Para extração e análise da quantidade de carotenoides, alíquotas de biomassa seca de *Kappaphycus alvarezii* (0,5 g, em triplicata) foram trituradas em nitrogênio líquido e nelas foram adicionados 10 ml de álcool metílico, para posterior incubação durante 1 hora em temperatura ambiente e ausência de luz. O extrato organossolvente foi recuperado por filtração em suporte de celulose. Após, a leitura foi feita a 450 nm em leitor de microplaca (Tp Reader; Thermoplate, China). A concentração total de carotenoides foi calculada com base em uma curva padrão externa e os resultados foram expressos em mg equivalente de β -caroteno (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, EUA – 0,5 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $y=0,003x$, $r^2=0,98$), por grama de massa seca.

Para a extração e posterior análise de compostos fenólicos, amostras de 0,5 g de massa seca foram trituradas em nitrogênio líquido, maceradas em solução metanólica 80%. Foram mantidas em repouso por 1 hora, ao abrigo de luz e, em seguida, filtradas sob vácuo. O conteúdo total de fenólicos foi determinado por método colorimétrico, utilizando reativo de Folin-Ciocalteu ($\lambda = 750 \text{ nm}$), baseado em Waterman e Mole, (1994) [32], com alterações. Em seguida, procedeu-se à leitura a 750 nm em leitor de microplaca (Tp Reader; Thermoplate, China). O cálculo dos teores totais baseou-se em curva padrão externa de ácido gálico (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, EUA – 100-1250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, $y=0,0129x$, $r^2=0,99$). Os resultados foram expressos como valor médio, em mg de equivalente ácido gálico por g de massa seca.

2.2.10 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste Levene e Shapiro-Wilk para testar a homocedasticidade de variância e normalidade, respectivamente. Posteriormente os dados foram submetidos à ANOVA one-way e teste de Tukey para separação de médias quando

necessário. As análises foram executadas com auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA). As transformações de dados foram aplicadas quando necessário. Para todos os testes, considerou-se o nível de significância de 5%.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Parâmetros zootécnicos

Em relação aos parâmetros zootécnicos, houve diferença significativa apenas na taxa de crescimento específico, indicando a ração com maior concentração de extrato a que teve menor porcentagem de crescimento. Os demais parâmetros não apresentaram diferença significativa (Tabela 1).

Tabela 1: Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros zootécnicos de juvenis de tilápia-do-nylo *Oreochromis niloticus* alimentados por 46 dias com adição de diferentes doses de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (Macroalga_{1%}, Macroalga_{0,5%}, Macroalga_{0,25%}, Macroalga_{0,125%}) e peixes não suplementados. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

	Macroalga 1%	Macroalga 0,5%	Macroalga 0,25%	Macroalga 0,125%	Peixes não suplementados	Valor <i>p</i>
GP (g)	43,74 \pm 2,9	40,0 \pm 7,2	48,05 \pm 8,4	41,52 \pm 8,7	41,52 \pm 10,8	0,513
TCE (%)	2,57 \pm 0,48 ^a	2,73 \pm 0,64 ^b	2,79 \pm 0,57 ^c	2,73 \pm 0,44 ^d	4,33 \pm 0,42 ^e	0,0001
TCA	8,58 \pm 0,81	7,82 \pm 2,57	6,6 \pm 2,94	8,9 \pm 2,13	8,9 \pm 3,12	0,553
S %	73,0 \pm 14,7	59,6 \pm 23,8	55,7 \pm 35,2	65,4 \pm 18,3	82,7 \pm 15,8	0,492

Legenda: GP: ganho de peso em gramas, TCE: taxa de crescimento específico em porcentagem, TCA: taxa de conversão alimentar e S: sobrevivência em porcentagem. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t ($p < 0,05$).

2.3.2 Parâmetros hemato-imunológicos

Um dos parâmetros hematológicos influenciados pela suplementação foi a glicose, indicando que os peixes dos tratamentos Macroalga_{0,5%} e Macroalga_{0,25%} tiveram maiores médias em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$). O HCM mostrou maior média para os animais que receberam Macroalga_{0,5%}, porém significativamente igual às médias dos Macroalga_{1%} e Macroalga_{0,25%}. Na contagem diferencial de leucócitos, as únicas células que mostraram diferença significativa foram os leucócitos imaturos, indicando menor quantidade no grupo que recebeu Macroalga_{0,25%}. Os demais parâmetros não mostraram diferença significativa (Tabela 2). Já para os parâmetros imunológicos, nenhuma das análises mostrou diferença significativa. As proteínas totais mostraram os seguintes resultados: Macroalga_{1%} (45,89 \pm 12,23 mg mL⁻¹), Macroalga_{0,5%} (41,87 \pm 9,57 mg mL⁻¹), Macroalga_{0,25%} (38,78 \pm 11,36

mg mL⁻¹), Macroalga_{0,125%} (40,68 ± 15,73 mg mL⁻¹) e peixes não suplementados (40,45 ± 18,48 mg mL⁻¹). A análise de imunoglobulina total do plasma indicou os seguintes resultados: Macroalga_{1%} (17,69 ± 5,45 mg mL⁻¹), Macroalga_{0,5%} (16,81 ± 4,06 mg mL⁻¹), Macroalga_{0,25%} (13,10 ± 2,10 mg mL⁻¹), Macroalga_{0,125%} (16,69 ± 6,52 mg mL⁻¹) e peixes não suplementados (16,78 ± 8,75 mg mL⁻¹).

Tabela 2: Valores médios ± desvio padrão dos parâmetros hematológicos de juvenis de tilápia-do-nylo *Oreochromis niloticus* alimentados por 46 dias com adição de diferentes doses de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (Macroalga_{1%}, Macroalga_{0,5%}, Macroalga_{0,25%}, Macroalga_{0,125%}) e peixes não suplementados. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey (p<0,05).

Alterações	Macroalga 1%	Macroalga 0,5%	Macroalga 0,25%	Macroalga 0,125%	Peixes não suplementados	Valor p
Glicose (mg dL ⁻¹)	44,24 ± 11,44 ^b	55,32 ± 15,47 ^a	54,25 ± 15,84 ^a	44,45 ± 10,57 ^b	43,95 ± 14,87 ^b	0,013
Hematócrito (%)	28,00 ± 2,26	29,90 ± 3,91	30,00 ± 3,68	28,75 ± 4,40	29,10 ± 3,34	0,396
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	9,72 ± 5,51	12,10 ± 6,06	9,46 ± 2,31	8,26 ± 2,26	8,44 ± 1,88	0,016
VCM (fL)	162,06 ± 41,21	188,47 ± 51,15	176,01 ± 39,07	151,74 ± 31,25	167,22 ± 40,75	0,067
HCM (pg)	55,79 ± 32,14 ^{ab}	75,75 ± 37,69 ^a	53,74 ± 39,07 ^{ab}	43,44 ± 13,15 ^b	48,74 ± 16,94 ^b	0,001
CHCM (g dL ⁻¹)	35,08 ± 21,11	41,28 ± 21,29	32,17 ± 8,79	29,29 ± 9,38	29,28 ± 7,27	0,076
Trombócitos (x10 ³ μL ⁻¹)	9,36 ± 11,55	9,09 ± 10,68	8,99 ± 6,08	7,76 ± 10,74	10,67 ± 10,94	0,758
Leucócitos totais (x 10 ³ μL ⁻¹)	17,20 ± 10,15	15,53 ± 9,47	19,38 ± 14,39	18,84 ± 14,11	18,54 ± 10,15	0,940
Eritrócitos (x10 ⁶ μL ⁻¹)	1,81 ± 5,25	1,66 ± 3,61	1,82 ± 4,56	1,95 ± 4,07	1,84 ± 4,71	0,366
Leucócitos imaturos (x10 ³ μL ⁻¹)	4,00 ± 3,50 ^a	2,80 ± 2,82 ^{ab}	1,25 ± 1,37 ^b	3,80 ± 2,89 ^a	4,40 ± 4,36 ^a	0,0236
Linfócitos (x10 ³ μL ⁻¹)	87,11 ± 7,57	88,15 ± 7,97	83,30 ± 20,79	86,15 ± 10,29	81,50 ± 12,21	0,492
Monócitos (x10 ³ μL ⁻¹)	3,21 ± 3,91	3,55 ± 3,41	3,95 ± 2,93	4,75 ± 6,33	6,30 ± 11,33	0,892
Neutrófilos (x10 ³ μL ⁻¹)	5,74 ± 4,51	5,50 ± 4,80	6,50 ± 5,71	5,30 ± 4,92	7,80 ± 7,91	0,639

Legenda: VCM: Volume corpuscular médio. HCM: Hemoglobina corpuscular média e CHCM: concentração corpuscular de hemoglobina média.

2.3.3 Análise histológica

Conforme observado na Tabela 3, no tecido hepático, o aspecto cordonal de todos os grupos apresentou médias inferiores a 40%, com destaque para o grupo de peixes não suplementados, que apresentou menor média (p<0,05) em relação a Macroalga_{0,5%}. O grupo que recebeu maior concentração de extrato apresentou menor média no aspecto de congestão do pâncreas, e o grupo controle apresentou maior média. Os peixes não suplementados foram os que apresentaram maior média de núcleos com picnose em relação a Macroalga_{0,25%} e macroalga_{0,125%}. As demais alterações não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

No rim, a maioria das alterações que tiveram médias com diferenças significativas, apresentou maior média no tratamento de peixes não suplementados, porém não houve um padrão das alterações nos grupos conforme observado na tabela 4.

No baço, polpas brancas e vermelhas e a cápsula fibrosa mostraram-se 100% íntegras. Nas demais alterações os grupos não mostraram um padrão de diferenças significativas, como mostrado na Tabela 5.

O intestino dos peixes não apresentou diferenças significativas em nenhuma análise referente às análises morfométricas, porém o grupo de peixes não suplementados apresentou maior número de células caliciformes na área dos vilos (Figura 2). Esse grupo também apresentou maior média na presença de infiltrado eosinofílico. As demais alterações histológicas não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Tabela 6).

Figura 2: Tecido do intestino. Cabeças de seta indicam infiltrado eosinofílico nível 3 e asteriscos indicam presença de células caliciformes.

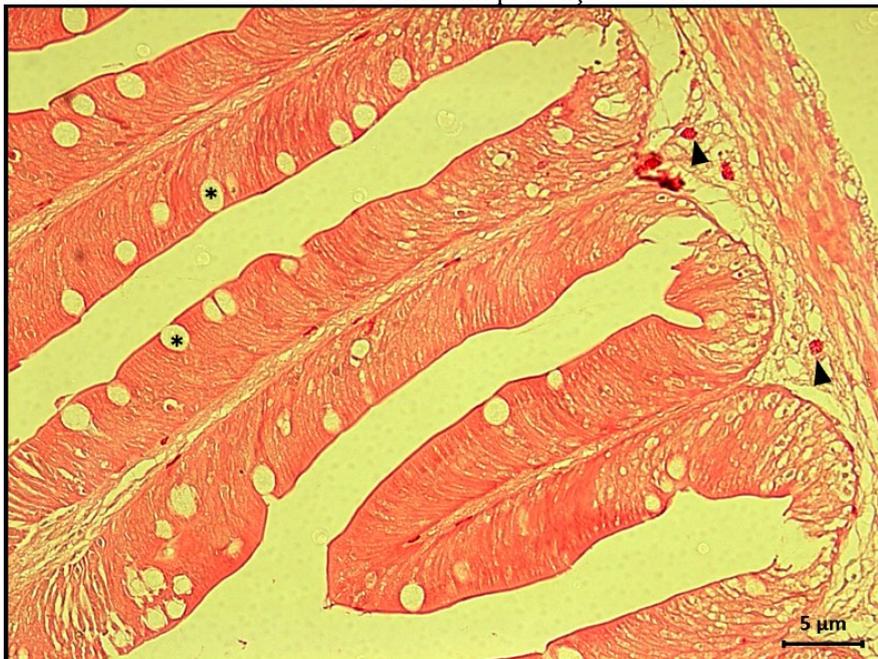


Figura 3: Alterações e tecido normal do baço. (A) Asterisco indica centro de melanomacrófagos nível 3. (B) Tecido do baço sem centros de melanomacrófagos. (C) Setas indicam pontos de necrose nível 2. (D) Tecido sem pontos de necrose.

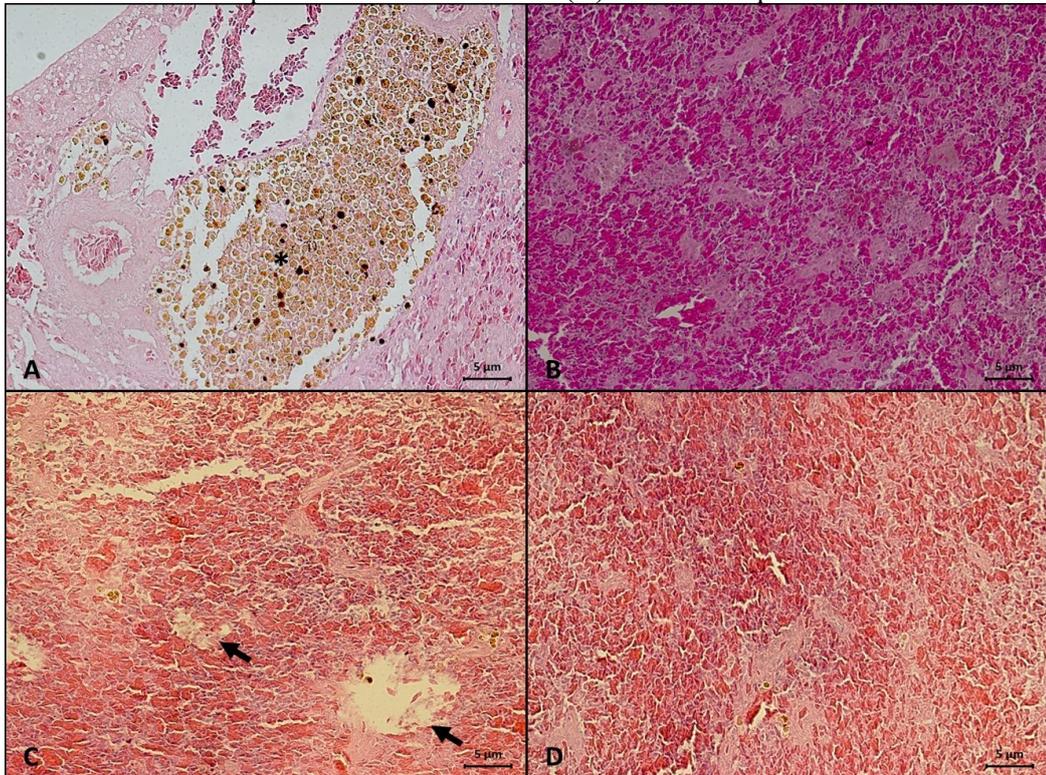


Figura 4: Alterações histológicas em tecido hepático e tecido sem alterações. (A) Cabeças de seta indicam núcleo com picnose nível 3. (B) Tecido com núcleos sem picnose. (C) Asterisco indica congestão do pâncreas com nível de lesão 2. (D) Pâncreas sem congestão. (E) Setas mostram aspecto cordonal 100%. (F) Tecido hepático sem presença de aspecto cordonal.

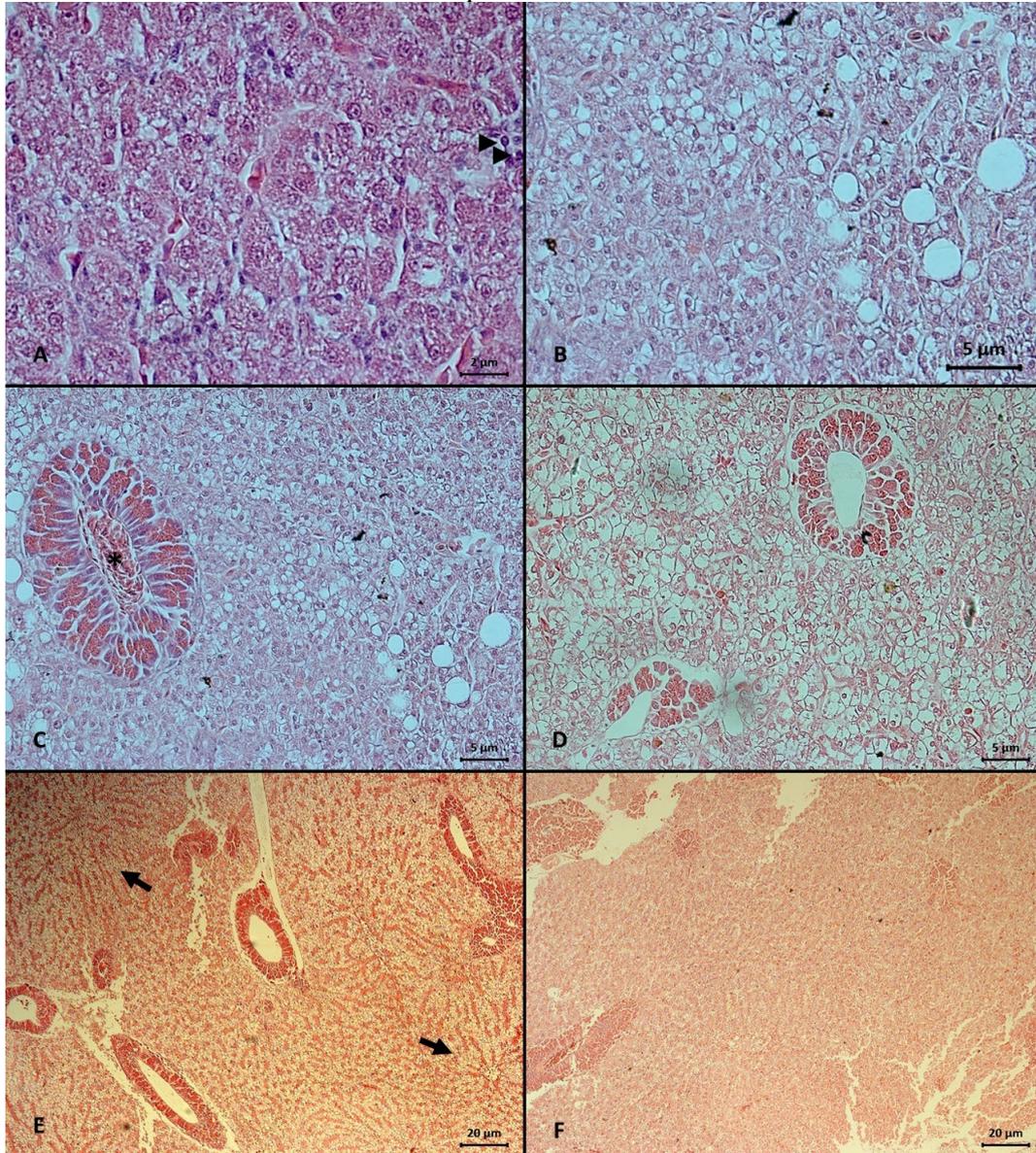


Figura 5: Alterações histológicas em tecido do rim. (A) Setas indicam amiloidose nível 3. (B) Tecido sem presença de amiloidose. (C) Asterisco indica dilatação da luz tubular nível 3. Seta indica rompimento celular. Cabeça de seta indica vacuolização. (D) Tecido não apresenta dilatação da luz tubular e não apresenta vacuolização. (E) Seta indica dilatação dos capilares nível 2. (F) Tecido com ausência de dilatação dos capilares. (G) Seta indica túbulos em regeneração nível 2. (H) Tecido sem túbulos em regeneração.

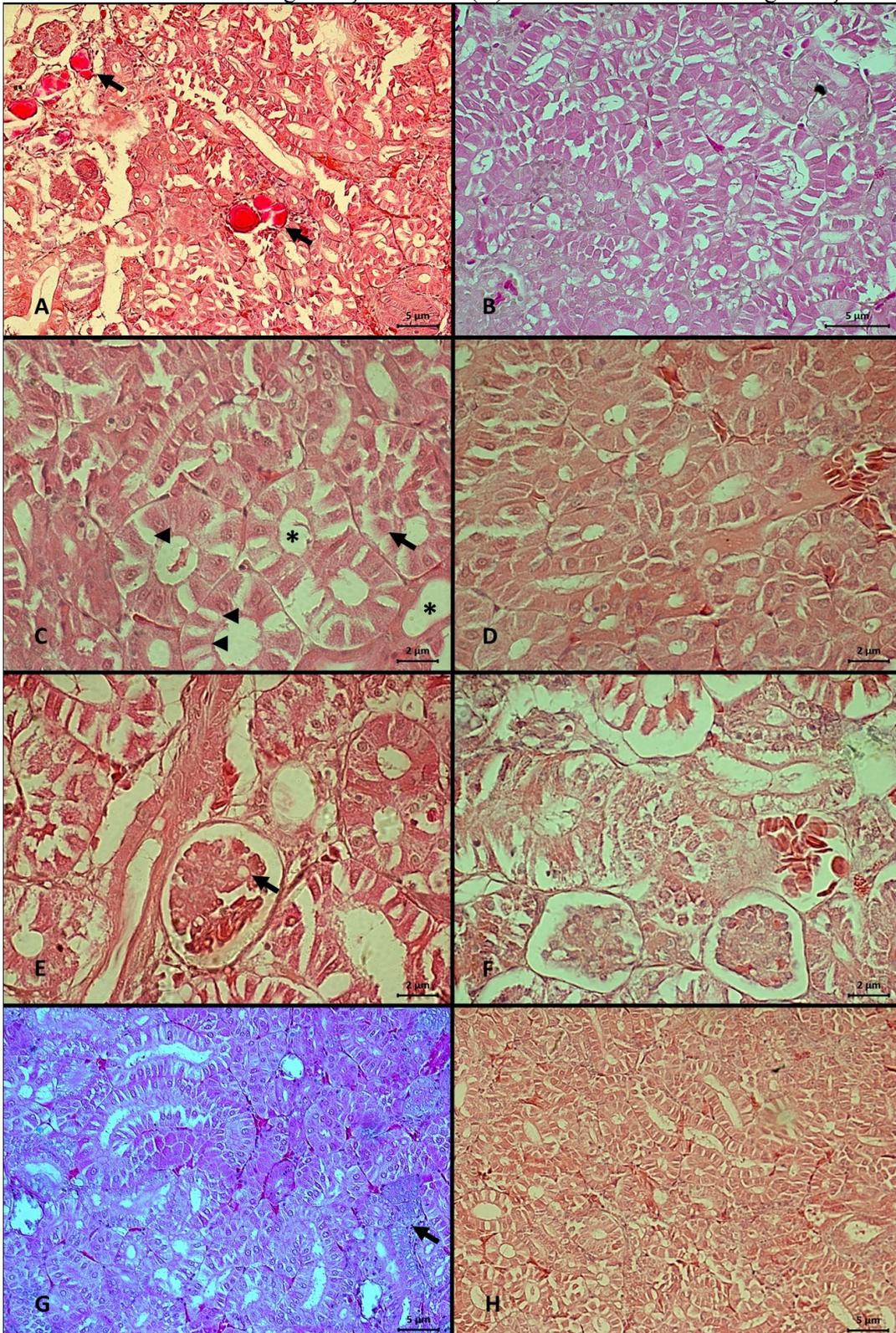


Tabela 3: Valores médios \pm desvio padrão de intensidade de alterações histológicas do fígado de juvenis de tilápia-do-nylo *Oreochromis niloticus* alimentados por 46 dias com adição de diferentes doses de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (Macroalga_{1%}, Macroalga_{0,5%}, Macroalga_{0,25%}, Macroalga_{0,125%}) e peixes não suplementados. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Alterações	Macroalga 1%	Macroalga 0,5%	Macroalga 0,25%	Macroalga 0,125%	Peixes não suplementados	Valor p
Aspecto cordonal (%)	34,21 \pm 23,88 ^{ab}	35,53 \pm 26,77 ^a	25,00 \pm 27,64 ^{ab}	34,21 \pm 37,46 ^{ab}	9,2 \pm 12,39 ^b	0,035
Uniformidade no tamanho de células e núcleos (%)	78,95 \pm 15,05	73,68 \pm 15,53	80,26 \pm 19,68	85,53 \pm 15,17	76,32 \pm 17,63	0,256
Pâncreas com ácinos íntegros e grânulos de zimogênio (%)	71,05 \pm 9,37	75,00 \pm 11,79	67,11 \pm 22,13	77,63 \pm 11,47	67,11 \pm 14,56	0,427
Aspecto balonoso	1,32 \pm 0,75	1,11 \pm 0,81	1,32 \pm 0,82	0,84 \pm 0,60	1,05 \pm 0,85	0,289
Congestão nos grandes vasos	0,47 \pm 0,70	0,84 \pm 0,69	0,68 \pm 0,89	0,42 \pm 0,51	0,58 \pm 0,51	0,473
Congestão no pâncreas	0,26 \pm 0,45 ^b	0,84 \pm 0,83 ^{ab}	0,53 \pm 0,75 ^{ab}	0,80 \pm 0,68 ^{ab}	0,95 \pm 0,62 ^a	0,022
Congestão nos sinusoides	0,42 \pm 0,51	0,89 \pm 0,88	0,42 \pm 0,51	0,53 \pm 0,90	0,58 \pm 0,51	0,200
Deslocamento do núcleo dos hepatócitos	1,74 \pm 0,56	1,68 \pm 0,82	1,58 \pm 1,07	1,16 \pm 0,96	1,68 \pm 0,58	0,115
Infiltrado eosinofílico	1,11 \pm 0,46	0,58 \pm 0,61	1,11 \pm 0,46	0,95 \pm 0,62	1,00 \pm 0,94	0,529
Hipertrofia dos hepatócitos	1,21 \pm 0,71	1,05 \pm 0,62	0,89 \pm 0,94	0,47 \pm 0,51	1,21 \pm 0,92	0,168
Necrose	1,26 \pm 0,65	1,32 \pm 0,67	1,42 \pm 1,02	1,00 \pm 0,47	1,79 \pm 0,85	0,836
Núcleo com picnose	0,68 \pm 0,75 ^{ab}	0,79 \pm 0,85 ^{ab}	0,42 \pm 0,51 ^b	0,16 \pm 0,37 ^b	1,05 \pm 0,71 ^a	0,001

Tabela 4: Valores médios \pm desvio padrão de intensidade de alterações histológicas do rim de juvenis de tilápia-do-nylo *Oreochromis niloticus* alimentados por 46 dias com adição de diferentes doses de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (Macroalga_{1%}, Macroalga_{0,5%}, Macroalga_{0,25%}, Macroalga_{0,125%}) e peixes não suplementados. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..

Alteração	Macroalga 1%	Macroalga 0,5%	Macroalga 0,25%	Macroalga 0,125%	Peixes não suplementados	Valor p
Degeneração granular	1,25 \pm 0,72	1,50 \pm 0,51	1,70 \pm 0,73	1,21 \pm 1,03	1,55 \pm 0,51	0,132
Hipertrofia celular	1,20 \pm 0,77	1,50 \pm 0,51	1,55 \pm 0,51	1,47 \pm 0,51	1,55 \pm 0,51	0,275
Vacuolização celular	0,80 \pm 0,77 ^a	0,55 \pm 0,60 ^{ab}	0,25 \pm 0,44 ^b	0,26 \pm 0,45 ^b	1,10 \pm 0,45 ^a	0,0000186
Dilatação da luz tubular	0,60 \pm 0,60 ^c	0,70 \pm 0,47 ^{abc}	1,05 \pm 0,51 ^{ab}	0,68 \pm 0,75 ^{bc}	1,10 \pm 0,55 ^a	0,001
Túbulos em regeneração	0,35 \pm 0,49 ^b	0,65 \pm 0,49 ^b	1,10 \pm 0,55 ^a	0,84 \pm 0,50 ^{ab}	0,55 \pm 0,51 ^b	0,0002
Rompimento celular	1,00 \pm 0,73 ^b	1,15 \pm 0,49 ^{ab}	1,40 \pm 0,68 ^{ab}	1,05 \pm 0,71 ^{ab}	1,60 \pm 0,60 ^a	0,020
Dilatação dos capilares	1,20 \pm 0,62 ^{ab}	1,20 \pm 0,52 ^{ab}	0,95 \pm 0,51 ^{ab}	0,84 \pm 0,37 ^b	1,40 \pm 0,50 ^a	0,008
Espessamento do endotélio	2,00 \pm 0,46	2,40 \pm 0,50	2,45 \pm 0,51	2,26 \pm 0,45	2,35 \pm 0,67	0,170
Aumento do volume glomerular	0,45 \pm 0,51	0,90 \pm 0,72	0,85 \pm 0,59	0,47 \pm 0,51	0,80 \pm 0,83	0,075
Redução do espaço de Bowman	0,25 \pm 0,55	0,25 \pm 0,55	0,20 \pm 0,52	0,05 \pm 0,23	0,25 \pm 0,55	0,741
Presença de eritrócitos	1,30 \pm 0,47	1,25 \pm 0,44	1,35 \pm 0,49	1,16 \pm 0,37	1,40 \pm 0,60	0,739
Amiloidose	0,95 \pm 0,94 ^d	1,10 \pm 0,97 ^b	2,05 \pm 1,15 ^a	0,68 \pm 0,75 ^c	1,05 \pm 0,94 ^c	0,0003

Tabela 5: Valores médios \pm desvio padrão de intensidade de alterações histológicas do baço de juvenis de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados por 46 dias com adição de diferentes doses de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (Macroalga_{1%}, Macroalga_{0,5%}, Macroalga_{0,25%}, Macroalga_{0,125%}) e peixes não suplementados. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Alterações	Macroalga _{1%}	Macroalga _{0,5%}	Macroalga _{0,25%}	Macroalga _{0,125%}	Peixes não suplementados	Valor p
Centros de melanomacrófagos	1,58 \pm 0,77 ^b	2,40 \pm 0,75 ^a	2,10 \pm 0,91 ^{ab}	1,35 \pm 1,17 ^b	2,00 \pm 0,88 ^{ab}	0,005
Melanomacrófagos soltos	1,63 \pm 0,68	2,25 \pm 0,72	2,10 \pm 0,85	1,65 \pm 0,93	1,79 \pm 0,85	0,068
Necrose	0,47 \pm 0,61 ^{ab}	0,85 \pm 0,67 ^{ab}	0,85 \pm 0,59 ^{ab}	0,41 \pm 0,51 ^b	1,00 \pm 0,58 ^a	0,011
Congestão	1,26 \pm 0,56	1,10 \pm 0,97	1,60 \pm 0,82	1,24 \pm 0,90	1,47 \pm 0,70	0,309

Tabela 6: Valores médios \pm desvio padrão de morfometria e intensidade de alterações histológicas do intestino de juvenis de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* alimentados por 46 dias com adição de diferentes doses de extrato de *Kappaphycus alvarezii* (Macroalga_{1%}, Macroalga_{0,5%}, Macroalga_{0,25%}, Macroalga_{0,125%}) e peixes não suplementados. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

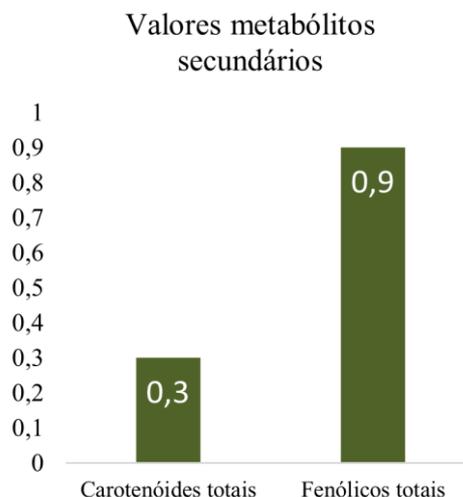
	Macroalga _{1%}	Macroalga _{0,5%}	Macroalga _{0,25%}	Macroalga _{0,125%}	Peixes não suplementados	Valor p
NV	36,71 \pm 5,96	36,88 \pm 5,80	33,59 \pm 5,35	35,33 \pm 7,99	37,07 \pm 5,80	0,456
AV ² (μm^2)	189732,45 \pm 62829,61	192888,83 \pm 68462,52	234078,26 \pm 102520,26	219064,67 \pm 80541,06	242266,10 \pm 113854,21	0,175
PV (μm)	9839,06 \pm 1943,05	10525,79 \pm 2403,29	9984,29 \pm 3608,27	10643,28 \pm 4106,07	11800,51 \pm 3430,58	0,117
AV (μm)	90,89 \pm 21,62	95,38 \pm 21,76	101,79 \pm 23,21	97,43 \pm 31,63	105,48 \pm 31,79	0,117
LV (μm)	46,78 \pm 7,58	48,59 \pm 10,39	52,26 \pm 9,46	51,10 \pm 6,05	49,89 \pm 9,45	0,729
NC	303,88 \pm 193,95 ^{ab}	151,63 \pm 80,67 ^b	186,12 \pm 114,70 ^b	205,60 \pm 149,77 ^{ab}	478,40 \pm 516,43 ^a	0,005
Alterações						
IE	0,84 \pm 0,69 ^{ab}	0,37 \pm 0,50 ^b	0,95 \pm 0,51 ^a	0,89 \pm 0,32 ^{ab}	1,18 \pm 0,73 ^a	0,003
N	0,68 \pm 0,75	1,11 \pm 0,66	0,95 \pm 0,76	0,74 \pm 0,65	0,82 \pm 0,73	0,376
V	1,06 \pm 0,87	0,89 \pm 1,20	0,95 \pm 1,10	0,68 \pm 0,95	1,06 \pm 1,09	0,796

Legenda: NV: Número de vilos, AV²: Área dos vilos, PV: Perímetro dos vilos, AV: Altura dos vilos, LV: Largura dos vilos, NC: Número de células caliciformes, IE: Infiltrado eosinofílico, N: Necrose, V: Vacuolização.

2.3.4 Composição da macroalga

Os resultados encontrados nas análises de espectrofotometria de UV-visível, nas amostras de *K. alvarezii* revelaram a presença de maiores níveis de compostos fenólicos e menores de carotenoides (Figura 2).

Figura 6: Valores totais dos metabólitos secundários encontrados na amostra de algas do presente estudo. Carotenóides totais (mg g^{-1}) e fenólicos totais (mg GAE g^{-1}).



2.4 DISCUSSÃO

O extrato hidroalcoólico utilizado apresentou valores mais baixos de fenólicos totais, quando comparado com estudos em que se utilizou outros solventes sendo obtidas médias de 2,95 (mg GAE g^{-1}) para extrato com água [33], 19,1 (mg GAE g^{-1}) para extrato com água quente a 70 °C, e 20,25 (mg GAE g^{-1}) para extrato etanólico [34]. Para carotenóides totais foram encontrados 0,634 (mg g^{-1}) [14]. Com isto sugere-se que o uso do solvente utilizado pode não ter sido o mais adequado, ou a condição da alga no momento da coleta, como altura na coluna de água, química da água, concentração de nutrientes presentes na água, época do ano, etc, pode ter interferido nos valores baixos. A quantidade de pigmentos contidos nas algas depende das condições em que se encontram enquanto são cultivadas ou coletadas da água. Nos resultados comparados não foram especificados a profundidade das algas na coluna de água quando retiradas, entretanto, sabe-se que a alga do presente estudo foi coletada no mês de abril, quando a incidência de luz não é a máxima do ano, por se tratar da estação de outono. Neste contexto, a profundidade tem grande importância, pois interfere na incidência de luz que elas recebem, além da espécie da alga e das condições químicas da água [35]. Segundo Pedra et al. [36], uma maneira interessante de aumentar a quantidade de compostos bioativos pode ser o cultivo de macroalgas em efluentes do cultivo de camarão, por exemplo, considerando que nestes efluentes existe uma maior concentração de nutrientes, promovendo melhor crescimento da alga.

Apesar dos valores mais baixos dos compostos bioativos no presente estudo, o teste *in vitro* mostrou eficiência do extrato da alga contra a bactéria *Streptococcus agalactiae*, semelhante ao reportado em outros estudos, cujos relatos também mostraram a capacidade da *K. alvarezii* em agir contra micro-organismos patogênicos [37,15].

Em relação aos parâmetros zootécnicos observou-se que a taxa de crescimento específico (TCE) foi significativamente maior nos animais não suplementados e do ponto de vista econômico, com a TCE pode-se observar o quanto os animais cresceram em relação ao tempo em que receberam alimentação. Por ser um parâmetro importante para indústrias de cultivo comercial e considerando que a alimentação dos animais é o insumo mais caro na criação de peixes, neste caso, o uso do aditivo, que seria um custo extra na alimentação, não influenciou positivamente, o que não justificaria a adição do extrato com a intenção de aumentar o crescimento destes animais. Madibana [38] mostrou que a adição de *Ulva* sp. na alimentação proporcionou aumento do crescimento de peixes *Argyrosomus japonicus*, quando comparados com grupo controle, que recebeu alimentação sem o aditivo, sem que os parâmetros hematológicos fossem negativamente afetados. Isso pode indicar que existem outras algas mais interessantes para serem estudadas com a finalidade de aditivo alimentar. O presente estudo não apresentou taxas de sobrevivência relevantes, possivelmente em decorrência do comportamento agressivo dos animais, apesar de outros estudos, a exemplo de Thanigaivel [39], sugerirem que o uso de macroalga, na forma de microencapsulados podem elevar as taxas de sobrevivência em *Oreochromis mossambicus*. De maneira geral, os estudos demonstraram que macroalgas podem ser benéficas ao desempenho zootécnico, quando incorporadas em alimentação para peixes. Além de peixes, camarões também já foram testados com incorporação de macroalga na dieta e avaliados. Espécimes de *Penaeus monodon*, alimentados com dietas usando *Kappaphycus alvarezii* e *Gracilaria heteroclada* na formulação, tiveram melhor taxa de conversão alimentar e aumento de biomassa em relação a animais que ingeriram a dieta sem as macroalgas [40].

A glicose é um dos indicadores utilizados para avaliar o estresse em peixes e em resposta a algum fator estressante ocorre sua elevação, para suprir a demanda energética em situações desfavoráveis [41]. Neste estudo, apesar de haver diferença significativa no valor de glicose entre os tratamentos, todas as concentrações mostraram resultado inferior ao demonstrado por Ashour et al., 2020 [42], em que os tratamentos, incluindo o controle, apresentaram resultados muito superiores em tilápias alimentadas com extrato de *blend* de macroalgas, contendo *Ulva lactuca* (Chlorophyta), *Jania rubens* (Rhodophyta) e *Pterocladia capillacea* (Rhodophyta). Estes resultados, somados a diferenças sem um padrão de

concentrações encontradas em leucócitos imaturos, pode indicar que os peixes estavam saudáveis no momento da coleta. Além disso, segundo Ranzani-Paiva [26], leucócitos imaturos podem também ser encontrados na circulação de peixes saudáveis.

A hemoglobina corpuscular média (HCM) mostrou diferença significativa inferior nos peixes alimentados com a menor concentração e os não suplementados. Apesar de não apresentar diferença, os valores de hemoglobina também se mostraram inferiores nestes mesmos animais. A hemoglobina, encontrada nos eritrócitos é a responsável pelo transporte de oxigênio, quando estes, combinados, formam a oxihemoglobina [43]. A combinação destes resultados, com os baixos valores de glicose nos mesmos tratamentos, pode sugerir que os peixes não passavam por situação de estresse, visto que, quando há um fator estressante os valores de glicose podem aparecer mais altos e a taxa de respiração pode ser incrementada, havendo necessidade de mais transporte de oxigênio, e possível aumento na produção de hemoglobina. Em alguns parâmetros hematológicos que não mostraram diferença significativa (hematócrito, hemoglobina e total de eritrócitos), se notou valores similares em estudo com tilápias-do-nilo alimentadas com incorporação de extrato da macroalga *Ulva clathrata* na ração, durante 45 dias [44].

As alterações histológicas apresentadas não foram observadas em todos os órgãos. No fígado dos peixes houve diminuição da picnose no núcleo de todos os peixes tratados. O que sugere que houve diminuição da apoptose celular no fígado, pois a picnose é um sinal de condensação da cromatina nuclear, e está relacionada com a morte celular [45].

Nota-se um pequeno aumento no número de centros de melanomacrófagos nos animais suplementados com Macroalga_{0,5%} e apesar de não haver diferença estatística, também diminuiu o número de eritrócitos nestes animais, quando comparados aos demais. Os centros de melanomacrófagos presentes no baço são aglomerações pigmentadas de macrófagos que atuam na defesa contra micro-organismos, em função da grande quantidade de células fagocíticas sendo também o principal órgão de destruição de eritrócitos velhos [46].

No intestino dos peixes não suplementados houve aumento das células caliciformes, porém nos peixes suplementados não houve padrão nessa observação. Entretanto, a presença de células caliciformes é uma característica de peixes teleósteos e está associada a secreção de células glicoproteicas, por isso são conhecidas como “células secretoras de muco”. Em peixes, o aumento dessas células pode indicar uma agressão, ou até mesmo influência da alimentação [47]. Nota-se, portanto, que a suplementação com macroalga não interferiu negativamente na histomorfometria intestinal, sendo também um resultado interessante com estas concentrações.

2.5 CONCLUSÃO

Concluiu-se que o extrato hidroalcoólico da macroalga *Kappaphycus alvarezii* não apresentou resultados que beneficiem a tilápia-do-nilo nas condições do presente estudo. Nos resultados apresentados não houve padrão de alterações para os diferentes tratamentos. Sugere-se portanto, o teste de outras algas ou mesmo de outros tipos de extrações para verificar a influência da suplementação na dieta com macroalga para tilápia-do-nilo. O resultado do teste *in vitro* mostrou que o extrato nas concentrações utilizadas tem influência sobre a inibição e morte da bactéria *Streptococcus agalactiae*.

2.6 AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brasil, Código Financeiro 001) pelas bolsas concedidas aos autores; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e ao CNPq pelo apoio financeiro e bolsas de pesquisa a M.L. Martins (CNPq 306635 / 2018-6), à empresa Acqua Sul pelo fornecimento dos peixes, à empresa Puro Trato pelo fornecimento da ração, à seção de macroalgas do LCM/UFSC pela biomassa de macroalga e ao LMBV por ceder o laboratório para fabricação do extrato e análises de composição.

REFERÊNCIAS

- [1] FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020 – meeting the sustainable development goals. (2020) Roma.
- [2] PeixeBR. Anuário Brasileiro da Piscicultura PeixeBR 2020 (2020) São Paulo 12-15.
- [3] W. R. Boscolo, et al., Digestibilidade aparente das farinhas de resíduo da filetagem da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da corvina (*Plagioscion squamosissimus*) e farinha integral de camarão canela (*Macrobrachium amazonicum*) para tilápia do Nilo. Revista Brasileira de Zootecnia 33 (1). (2004) 8-13.
- [4] F. Meurer, et al., C. Lipídeos na Alimentação de alevinos revertidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). Revista Brasileira de Zootecnia 31 (2) (2002) 566-573.
- [5] F. Meurer, et al., L. Farelo de soja na alimentação de tilápias-do-nilo durante o período de reversão sexual. Revista Brasileira de Zootecnia 37 (5) (2008) 791-794.
- [6] S. Nandlal, T. Pickering, Tilapia Fish Farming in Pacific Island Countries. Tilapia Hatchery Operation 1 (2004)

- [7] R. M. Barroso, et al., Dimensão socioeconômica da tilapicultura no Brasil. Embrapa Pesca e Aquicultura. 1ª ed (2018) Brasília.
- [8] M. Tavares-Dias, M. L. Martins, An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *Journal of Parasitic Diseases* 41 (4) (2017) 913-918.
- [9] M. J. Costello, et al., The control of chemicals used in Aquaculture in Europe. *Journal of Applied Ichthyology* 17 (2001) 173-180.
- [10] A.A. Santos, Potencial de cultivo da macroalga *Kappaphycus alvarezii* no litoral de Santa Catarina. In. Aquaculture Department, Federal University of Santa Catarina (2014) Florianópolis.
- [11] S. Fadilah, et al., Growth, Morphology and Growth Related Hormone Level in *Kappaphycus alvarezii* Produced by Mass Selection in Gorontalo Waters, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences* 23 (2016) 29-34.
- [12] R. Verpoorte, Secondary metabolism. In: R. Verpoorte & A.W. Alfermann *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*, 1ed. Kluwer Academic Publishers, (2000) Netherlands.
- [13] J. A. Maschek, B. J. Baker, The Chemistry of Algal Secondary Metabolism. In: AMSLER, C. D. *Algal Chemical Ecology*. Editora Springer (2008) Germany 2-14.
- [14] R. G. Abirami, S. Kowsalya, Nutrient and Nutraceutical Potentials of Seaweed Biomass *Ulva lactuca* and *Kappaphycus alvarezii*. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 5 (1) (2011) 109-115.
- [15] V. Prabha, D. J. Prakash, P. N. Sudha, Analysis of bioactive compounds and antimicrobial activity of marine algae *Kappaphycus alvarezii* using three solvent extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 4 (1) (2013) 306-310.
- [16] A. Hurtado, R. Magdugo, A. Critchley, Chapter two - Harvesting and Potential uses of selected red seaweeds in the Philippines with emerging high-value application. *Advances in Botanical Research* 95 (2020) 19-56.
- [17] A. L. B. S. Barreiros, J. M. David, J. P. David, Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29 (2006) 113-123.
- [18] E. Ibañez, A. Cifuentes, Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Science of Food and Agriculture* 93 (2013) 703-709.
- [19] S. A. C. Araújo, B. B. Deminicis, Fotoinibição da fotossíntese. *Revista Brasileira de Biociências* 7 (2009) 463-472.
- [20] C. D. Amsler, V.A. Fairhead, Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Advances in Botanical Research* 43 (2006) 1-9.
- [21] K. E. Heim, a. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (2002) 572-584.

- [22] J. Tabart, et al., Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* 113 (2009) 1226-1233.
- [23] P. Ranganayaki, S. Susmitha, R. Vijayaraghavan, Study on metabolic compounds of *Kappaphycus alvarezii* and its *in-vitro* analysis of anti-inflammatory activity. *International Journal of Current Research and Academic Review* 2 (10) (2014) 157-166.
- [24] P. C. Blaxhall, K.W. Daisley, Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* 5 (1973) 771-781.
- [25] P. B. Goldenfarb et al., Reproducibility in the Hematology Laboratory: The Microhematocrit Determination. *American Journal of Clinical Pathology* 56 (1) (1971) 35–39.
- [26] M. J. T. Ranzani-Paiva, et al., Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: Eduem (2013).
- [27] N. M. Ishikawa, M. J. T. Ranzani-Paiva, J. V. Lombardi, Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. *Archives of Veterinary Science* 13 (2008) 54-63.
- [28] E. C. Amar, et al., Effect of dietary β -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science* 66 (2000) 1068-1075.
- [29] M. L. Martins, et al., Histopathology guide for freshwater fish. Editora da UFSC (2018) Florianópolis.
- [30] J. Schwaiger, et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 6 (1) (1997) 75–86.
- [31] A. Brum, et al. Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture* 490 (2018) 98–107.
- [32] P. G. Waterman, S. Mole, Analysis of phenolic plant metabolites. Oxford: Blackwell Scientific Publications (1994) 1-29.
- [33] A. Naseri, S. Holdt, C. Jacobsen, Biochemical and nutritional composition of industrial red seaweed used in carrageenan production. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 28 (2019) 967-973.
- [34] P. Bhuyar, et al., Antioxidant and antibacterial activity of red seaweed; *Kappaphycus alvarezii* against pathogenic bacteria. *Global Journal of Environmental Science and Management* 6 (1) (2020) 47-58.
- [35] R. Pangestuti, E. Siahaan, S. Kim, Photoprotective substances derived from marine algae. *Marine Drugs* 16 911) (2018) 399.
- [36] A.G. Pedra, F. Ramlov, M. Maraschin, L. Hayashi, Cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with effluents from shrimp cultivation and brown seaweed extract: Effects on growth and secondary metabolism. *Aquaculture*. 479 (2017) 297-303.

[37] L. J. Rebecca, V. Dhanalakshmi, C. Shekhar, Antibacterial activity of *Sargassum ilicifolium* and *Kappaphycus alvarezii*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 4 (1) (2012) 700-705.

[38] M. J. Madibana, et al., Effect of graded levels of dietary seaweed (*Ulva* sp.) on growth, hematological and serum biochemical parameters in dusky kob, *Argyrosomus japonicus*, sciaenidae. Egyptian Journal of Aquatic Research 43 (2017) 249-254.

[39] S. Thanigaivel, et al., Protective efficacy of microencapsulated seaweed extract for preventing *Aeromonas* infections in *Oreochromis mossambicus*. Comparative Biochemistry and Physiology, part C. 218 (2019) 36-54.

[40] V. Peñaflorida, N. Golez, Use of seaweed meals from *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria heteroclada* as binders in diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture. 143 (1996) 393-401.

[41] N. M. Diniz, C. A. Honorato, Algumas alternativas para diminuir os efeitos do estresse em peixes de cultivo - revisão. Arquivo de Ciências Veterinária e Zoologia UNIPAR 15 (2) (2012) 149-154.

[42] M. Ashour, et al. Effect of dietary seaweed extract supplementation on growth, feed utilization, hematological indices, and non-specific immunity of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* challenged with *Aeromonas hydrophila*. Journal of Applied Phycology 32 (2020) 3467-3479.

[43] M. J. T. Ranzani-Paiva, Hematologia como ferramenta para avaliação da saúde de peixes. In: 2º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes, 2007. Anais. 2º Simpósio de Nutrição de Saúde de Peixes, Universidad Estadual Paulista (2007) 97, São Paulo.

[44] P. R. Quezada-Rodriguez, E. J. Fajer-Ávila, The dietary effect of ulvan from *Ulva clathrata* on hematological-immunological parameters and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Applied Phycology 29 (2016) 423-431.

[45] L. R. Ribeiro, D. M. F. Salvadori, E. K. Marques, Mutagênese Ambiental. 1 ed. Brasil: ULBRA (2003)

[46] L. C. Junqueira, J. Carneiro, Histologia Básica, Editora Guanabara Koogan 12ª edição (2013) 540-555.

[47] T. M. P. Cruz, Epitélio intestinal de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) e dourado (*Salminus brasiliensis*, Cuvier, 1816) alimentados com dieta contendo colostro bovino liofilizado. Dissertação (Mestrado em Ciências) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (2013) Piracicaba.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos estudos em alimentação, com adição de suplementos naturais para animais aquáticos de interesse na aquicultura, vem sendo apresentados nos últimos anos, com o intuito de melhorar a condição imunológica dos animais e contribuir na absorção dos nutrientes ingeridos. O uso de plantas terrestre é mais comum de ser encontrado nestes estudos, porém, a utilização de macroalgas vem aparecendo como uma alternativa para a utilização do próprio produto aquícola. Hoje ainda existem poucos estudos com a utilização de metabólitos secundários provenientes de *Kappaphycus alvarezii*, possivelmente por essa alga ser mais visada para extração dos ficocolóides, que tem alto valor comercial e demanda mundial. Neste estudo, acredita-se que o comportamento agressivo dos animais possa ter influenciado nos resultados, pois houve perda considerável de espécimes em algumas unidades experimentais. Novos estudos poderiam ser feitos com diferentes tipos de extrato de *Kappaphycus alvarezii*, mais específicos entre composto bioativos isolados, parâmetros hemato-imunológicos e análises histológicas, ou até mesmo com a utilização de outras espécies de algas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- ABDEL-TAWWAB, M., AHMAD, M. H., SEDEN, M. E. A., SAKR, S. F. M. Use of Green Tea, *Camellia sinensis* L., in practical diet for growth and protection of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), against *Aeromonas hydrophila* infection. **Journal of the World Aquaculture Society**. v. 41, n. S2. p. 203-213, 2010.
- ABIRAMI, R.G., KOWSALYA, S. 2011. Nutrient and Nutraceutical Potentials of Seaweed Biomass *Ulva lactuca* and *Kappaphycus alvarezii*. **Journal of Agricultural Science and Technology**. v. 5, n. 1, p. 109-115, 2011.
- ABU-GHANNAM, N., RAJAURIA, G. Antimicrobial activity of compounds isolated from algae. **Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals**. p. 287-306. 2013.
- AMAL, M. N. A., ZAMRI-SAAD, M. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**. v. 34, n. 2, p. 195-206. 2011.
- AMSLER, C. D., FAIRHEAD, V. A. Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. **Advances in Botanical Research**, v. 43, p. 1–91. 2006
- ARAÚJO, S. A. C., DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, P. 463-472. 2009
- BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J. P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BARROSO, R. M, MUNOZ, A. E. P., TAHIM, E. F., TENÓRIO, R. A. MUEHMANN, L. D., SILVA, F. M., BARRETO, L. E. G. S., HEIN, G., CARMO, F. J., FLORES, R. M. V. **Dimensão socioeconômica da tilapicultura no Brasil**. Embrapa, Brasília, p. 54. 2018
- BHOWMICK, S., MAZUMDAR, A., MOULICK, A., ADAM, V. Algal metabolites: An inevitable substitute for antibiotics. **Biotechnology Advances**, v. 43, 107571, 2020.
- BHUYAR, P., RAHIM, M. H., SUNDARARAJU, S., MANIAM, G.P., GOVINDAN, N. Antioxidant and antibacterial activity of red seaweed; *Kappaphycus alvarezii* against pathogenic bacteria. **Global Journal of Environmental Science and Management**, v. 6, n.1, p. 47-58, 2020.
- BOSCOLO, W. R., HAYASHI, C., MEURER, F., FEIDEN, A., BOMBARDELLI, R. A., Digestibilidade aparente das farinhas de resíduo da filetagem da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e da corvina (*Plagioscion squamosissimus*) e farinha integral de camarão canela (*Macrobrachium amazonicum*) para tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 8-13, 2004.
- BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. & PFANDER, H. 2004. Carotenoids Handbook. Birkhausen Verlag, Basel, 2004. 675 p.

BRUM, A., CARDOSO, L., CHAGAS, E. D., CHAVES, F. C. M., MOURIÑO, J. L. P., MARTINS, M. L. Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 490, p. 98–107, 2018.

BUCHHOLZ, C. M., KRAUSE, G., BUCK, B. H. Seaweed and man. In: Wiencke, C., Bischof, K. **Seaweed Biology – Novel Insights into Ecophysiology, Ecology and Utilization**. Editora Springer, Germany, 2012, p. 471-493.

CAIPANG, C. M., LAZADO, C. C., BERG, I., BRINCHMANN, M. F., KIRON, V. Influence of alginate and fucoidan on the immune responses of head kidney leukocytes in cod. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, p. 603-612, 2011.

CARDOSO, K. H. M., GUARATINI, T., BARROS, M. P., FALCÃO, V. R., TONON, A. P., LOPES, N. P., CAMPOS, S., TORRES, M. A., SOUZA, A. O., COLEPICCOLO, P., PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.146, p. 60-78, 2007.

COSTELLO, M.J., GRANT, A., DAVIES, I. M., CECCHINI, S., PAPOUTSOGLU, S., QUIGLEY, D., SAROGLIA, M. The control of chemicals used in aquaculture in Europe. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 17. p. 173-180, 2001.

FADILAH, S., ALIMUDDIN, PONG-MASAK, P. R., SANTOSO, J., PARENRENGI, A. Growth, morphology and growth related hormone level in *Kappaphycus alvarezii* produced by mass selection in Gorontalo Waters, Indonesia. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 23, p. 29-34, 2016.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020 – meeting the sustainable development goals**. Roma. 2020.

GANESAN, A. R., TIWARI, U., RAJAURIA, G. Seaweed nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention. **Food Science and Human Wellness**, v. 8, p. 252-263, 2019.

GENERIU, C. R. N., SARAVANA, P. S., GETACHEW, A. T., CHUN, B. Characteristics of functional materials recovered from Solomon Islands red seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) using pressurized hot water extraction. **Journal of Applied phycology**, v. 29, p. 1609-1621, 2017.

GIBSON, G. R., SCOTT, K. P., RASTALL, R. A., TUOHY, K.M., HOTCHKISS, A., DUBERT-FERRANDON, A., et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 1-19, 2010.

GUERRIERO, G., BERNI, R., MUÑOZ-SANCHEZ, J., APONE, F., ABDEL-SALAM, E., QAHTAN, A., ALATAR, A., CANTINI, C., CAI, G., HAUSMAN., SIDDIQUI, K., HERNANDEZ-SOTOMAYOR, S., FAISAL, M. Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for Biotechnologists. **Genes**. v. 9, n. 6, p. 309, 2018.

HARBORNE, J.B. Classes and functions of secondary products. In: N. J. Walton & D. E. Brown (Eds.). **Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products**. Imperial College Press, London, 1999, p. 1-25.

- HAYASHI, L., REIS, R. Cultivation of the red algae *Kappaphycus alvarezii* in Brazil and its pharmacological potential. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, 2012.
- HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, 2002.
- HURTADO, A. Q., MAGDUGO, R., CRITCHLEY, A. T. Chapter two – Harvesting and potential uses of selected red seaweeds in the Philippines with emerging high value applications. **Advances in Botanical Researches**, v. 95, p. 19-56, 2020.
- IBAÑEZ, E., CIFUENTES, A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. **Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 703-709, 2013.
- KHAWALI, F. A., MARTÍ-QUIJAL, F. J., FERRER, E., RUIZ, M. J. BERRADA, H., GAVAHIAN, M. BARBA, F. J., FUENTE, B. Chapter one – Aquaculture and its by-products as a source of nutrients and bioactive compounds. **Advances in Food and Nutritional Researches**, v. 92, p. 1-33, 2020.
- KUBITZA, F. Main parasites and diseases in tilapia. **Panorama da Aquicultura**, v. 60, p. 39-53, 2000.
- KUSKOSKI, E. M., FETT, R., ASSUERO, A. G., TRONCOSO, A. M. Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (*Paullinia cupana*). **Vitae**, v. 12, n. 2, p. 45-52, 2005.
- LALEGERIE, F., GAGER, L., STIGER-POUVREAU, V., CONNAN, S. Chapter eight – The stressful life of red and brown seaweeds on the temperate intertidal zone: effect of abiotic and biotic parameters on the physiology of macroalgae and content variability of particular metabolites. **Advances in Botanical Researches**, v. 95, p. 247-287, 2020.
- MARTINS, M.L. Cuidados Básicos e Alternativas no Tratamento de Enfermidades de Peixes na Aquicultura Brasileira. In. RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.A.P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Editora Varela, São Paulo, 2004, p. 357-370.
- _____. Manejo sanitário na Piscicultura. In. RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.L.A.P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Editora Varela, São Paulo, 2004, p. 323-332.
- MASCHEK, J.A, BAKER, B. J. The Chemistry of Algal Secondary Metabolism. In: AMSLER, C. D. **Algal Chemical Ecology**. Editora Springer, Germany, 2008, p. 2-14.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/gestao-territorial/gerenciamento-costeiro>> Acesso em: 01 de Setembro de 2020.
- MEURER, F., HAYASHI, C., BOSCOLO, W., SOARES, C. Lipídeos na Alimentação de alevinos revertidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 566-573, 2002.
- MEURER, F., HAYASHI, C., BARBERO, L., SANTOS, L., BOMBARDELLI, R., COLPINI, L. Farelo de soja na alimentação de tilápias-do-nilo durante o período de reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, 2008.

NANDLAL, S., PICKERING, T. Tilapia Fish Farming in Pacific Island Countries. **Tilapia Hatchery Operation**. v. 1, 2004.

NASERI, A., HOLDT, S., JACOBSEN, C. Biochemical and nutritional composition of industrial red seaweed used in carrageenan production. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 28, p. 967-973, 2019.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., DE FEO, V., BATTISTELLI, A., DA CRUZ, A. G., COPPOLA, R. Polyphenol, the new frontiers of prebiotics. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 94, p. 35-89, 2020.

PEDRA, A. G., RAMLOV, F., MARASCHIN, M., HAYASHI, L. Cultivation of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with effluents from shrimp cultivation and brown seaweed extract: Effects on growth and secondary metabolism. **Aquaculture**, v. 479, p. 297-303, 2017.

PEIXEBR. **Anuário Brasileiro da Piscicultura PeixeBR 2020**. São Paulo. 2020. p. 12-15.

PRABHA, V., PRAKASH, D.J., SUDHA, P.N. Analysis of bioactive compounds and antimicrobial activity of marine algae *Kappaphycus alvarezii* using three solvent extracts. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 1, p. 306-310, 2013.

RAJAURIA, G. Chapter 15 - Seaweeds: a sustainable feed source for livestock and aquaculture. In. TIWARI, B. K., TROW, D. J. **Seaweed Sustainability: Food and Non-food Applications**. Academic Press. 2015, p. 389-420.

RANGANAYAKI, P., SUSMITHA, S., VIJAYARAGHAVAN, R. Study on metabolic compounds of *Kappaphycus alvarezii* and its *in-vitro* analysis of anti-inflammatory activity. **International Journal of Current Research and Academic Review**, v. 2, n. 10, p. 157-166, 2014.

REVERTER, M., BONTEMPS, N., LECCHINI, D., BANAIGS, B., SASAL, P. Use of plants extract in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspective. **Aquaculture**, v. 433, p. 50-61, 2014

RUDKE, A. R., ANDRADE, C. J., FERREIRA, S. R. S. *Kappaphycus alvarezii* macroalgae: An unexplored and valuable biomass for green biorefinery conversion. **Trends in food science & Technology**, v. 102, p. 214-224, 2020.

SANTOS, A. A., **Potencial de cultivo da macroalga *Kappaphycus alvarezii* no litoral de Santa Catarina**. Tese (Doutorado em Aquicultura) Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

SHAKYA, S. R., Medicinal uses of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) improves growth and enhances immunity in aquaculture. **International Journal of Chemical Studies**, v. 3, n. 2, p. 83-87, 2015.

STAHL, W., SCHWARZ, W., SIES, H. Human serum concentration of all-*trans*-beta-carotene and alpha-carotene but not 9-*cis*-beta-carotene increase upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina* (Betatene). **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 5, p. 847-851, 1993.

TABART, J., KEVERS, C., PINCEMAIL, J., DEFRAIGNE, J-O., DOMMES, J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**. v.113, p. 1226–1233, 2009.

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

VATSOS, I. N., REBOURS, C. Seaweed extracts as antimicrobial agents in aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 2017-2035, 2015.

VERPOORTE, R. Secondary metabolism. In: R. Verpoorte & A.W. Alfermann (eds.). **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**, 1ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 2000.