

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/06/2022.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E EFEITO
ANTIOXIDANTE DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM
ALGA VERDE (*Chlorella pyrenoidosa*) NO TEMPO DE
PRATELEIRA DE FILES DE TILÁPIAS DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) DESAFIADAS COM *Aeromonas
hydrophila***

Leticia Franchin Rodrigues
Médica Veterinária

**Dezembro
2021**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E EFEITO
ANTIOXIDANTE DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM
ALGA VERDE (*Chlorella pyrenoidosa*) NO TEMPO DE
PRATELEIRA DE FILES DE TILÁPIAS DO NILO
(*Oreochromis niloticus*) DESAFIADAS COM *Aeromonas
hydrophila***

Leticia Franchin Rodrigues

Orientadora: Profa. Dra. Karina Paes Bürger

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área: Medicina Veterinária Preventiva

**Dezembro
2021**

R696a

Rodrigues, Leticia Franchin

Atividade imunomoduladora e efeito antioxidante da suplementação alimentar com alga verde (*Chlorella pyrenoidosa*) no tempo de prateleira de files de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) desafiadas com *Aeromonas hydrophila* / Leticia Franchin Rodrigues. -- Jaboticabal, 2021

81 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Karina Paes Bürger

1. Antioxidantes. 2. Carotenoides. 3. Vida de prateleira. 4. Inflamação. 5. Teleósteos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E EFEITO ANTIOXIDANTE DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM ALGA VERDE (*Chlorella pyrenoidosa*) NO TEMPO DE PRATELEIRA DE FILES DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) DESAFIADAS COM *Aeromonas hydrophila*

AUTORA: LETÍCIA FRANCHIN RODRIGUES

ORIENTADORA: KARINA PAES BÜRGER

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Medicina Veterinária Preventiva pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. KARINA PAES BÜRGER (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

pt 

Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP

pt 

Prof. Dr. GABRIEL AUGUSTO MARQUES ROSSI (Participação Virtual)
Universidade Vila Velha - UVV / Vila Velha/ES

Jaboticabal, 20 de dezembro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Leticia Franchin Rodrigues - nascida em 01 de janeiro de 1995, na cidade de São Carlos - SP. Formação em Medicina Veterinária pela Universidade Brasil em 2018. Durante a graduação foi bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo: 432830/2016-2) nos anos 2017 e 2018. Foi Estagiária do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Animal (2016-2018), além de colaboradora no desenvolvimento de projetos do Grupo de pesquisas (GAP) na área de fisiopatologia do processo inflamatório em peixes teleósteos. Atualmente é Mestranda na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" campus Jaboticabal (FCAV) no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva sob orientação da Profa. Dra. Karina Paes Bürger e bolsista CNPq (Processo: 132889/2020-0).

“O conhecimento nos faz responsáveis”

Che Guevara

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvia e Eliel, pelo carinho e companheirismo durante toda esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder saúde e sabedoria para seguir sempre em frente. Obrigada por ser a minha força e o meu guia em todos os momentos.

Agradeço aos animais que cederam suas vidas para a realização deste estudo, contribuindo com desenvolvimento da ciência nesta área do conhecimento.

Agradeço especialmente a professora Dr^a Karina Paes Bürger pela orientação e ao professor Dr Marco Antonio de Andrade Belo pelos puxões de orelha e pelos ensinamentos.

Aos meus pais, Silvia e Eliel, e minha irmã Larissa, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Por acreditarem em mim, e não medirem esforços para a concretização dos meus sonhos. Sem vocês, nada seria possível.

Agradeço meus companheiros e amigos de laboratórios, Mayumi, Susana, Camila, Beatriz Ibelli, Beatriz Baldissarelli, Romário, Matheus, e a todos que indiretamente ou diretamente me ajudaram nesta caminhada.

Agradecimento ao apoio financeiro – bolsa (CNPq) (Processo: 132889/2020-0).

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

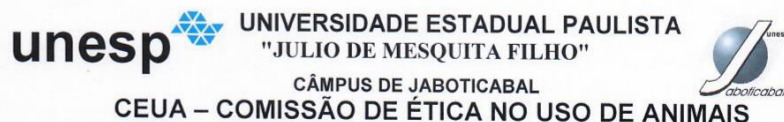
Sumário

CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.2. Tilapicultura no Brasil	2
2.3. <i>Aeromonas hydrophila</i>.....	3
2.4. Reação inflamatória em peixes teleósteos	4
2.1. <i>Chlorella pyrenoidosa</i>.....	6
2.5. Shelf-life.....	7
3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
CAPITULO 2 – Atividade imunomoduladora através da suplementação com <i>Chlorella pyrenoidosa</i> em tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) desafiadas com <i>Aeromonas hydrophila</i>.....	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1. Animais e condicionamento	14
2.2. Dieta Experimental.....	15
2.3. Delineamento experimental	15
2.4. Anestesia	16

2.5. Produção dos inóculos de bacterina de <i>Aeromonas hydrophila</i>	16
2.6. Inoculação experimental de bacterinas de <i>A. hydrophila</i>	17
2.7. Avaliação do exsudato inflamatório na bexiga natatória	17
2.8. Avaliação hematológica	18
2.9. Avaliação da atividade respiratória dos leucócitos (<i>burst</i> respiratório).....	18
2.10. Avaliação do bioquímico sérico	19
2.11. Avaliação somática dos órgãos.....	19
2.12. Análise estatística	19
3. RESULTADOS	19
3.1. Resultado da inflamação	19
3.1.1. Análise do exsudato inflamatório	19
3.1.2. <i>Burst</i> respiratório	21
3.1.3. Análise hematológica	21
3.1.4. Avaliação bioquímico sérico	25
3.1.5. Análise somática dos órgãos.....	27
4. DISCUSSÃO	28
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPITULO 3 – Avaliação da suplementação com alga verde <i>Chlorella pyrenoidosa</i> no tempo de prateleira de filés de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	36
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1. Animais	38
2.2. Dieta Experimental.....	38
2.3. Delineamento experimental	39
2.4. Abate e retirada dos files	39

2.5. Análises microbiológicas	40
2.5.1. Preparação das diluições	40
2.5.2. Número mais provável de coliformes totais e termotolerantes	41
2.5.3. Contagem Padrão de microrganismos Mesófilos e Psicrotróficos aeróbios estritos e facultativos viáveis.....	41
2.5.5. Contagem de <i>Staphylococcus</i>	41
2.5.5.1. Prova da coagulase	42
2.5.5.2. Coloração de Gram.....	42
2.5.5.3. Prova da catalase.....	42
2.5.6. Contagem de enterobacteriacea	42
2.5.6.1. Prova de oxidase	43
2.6. Análise físico – química	43
2.6.1. Determinação do pH	43
2.6.2. Colorimetria	43
2.6.3. Oxidação lipídica (TBARS)	44
2.6.4. Análise sensorial.....	44
2.7. Análise estatística	44
3. RESULTADOS	44
3.1. Análises Microbiológicas	44
3.2. Análise físico-química	46
4. Referencias bibliográficas	57
CAPITULO 4 – Considerações finais	61

CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Estudo do efeito antioxidante da suplementação alimentar com *Chlorella pyrenoidosa* no tempo de prateleira de filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**”, protocolo nº 3423/20, sob a responsabilidade da Profª Drª Karina Paes Bürger, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 23 de junho de 2020.

Vigência do Projeto	01/07/2020 a 01/06/2021
Espécie / Linhagem	<i>Oreochromis niloticus</i> / Tilápia do Nilo
Nº de animais	105
Peso / Idade	100g
Sexo	Macho
Origem	Centro de Aquicultura da Unesp - CAUNESP

Jaboticabal, 23 de junho de 2020.


Profª Drª Fabiana Pilarski
 Coordenadora – CEUA

**ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E EFEITO ANTIOXIDANTE DA
SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM ALGA VERDE (*Chlorella pyrenoidosa*)
NO TEMPO DE PRATELEIRA DE FILES DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis
niloticus*) DESAFIADAS COM *Aeromonas hydrophila***

RESUMO – Baseado na ação benéfica dos antioxidantes na saúde animal, associada à necessidade de desenvolvimento de estratégias para segurança alimentar e para o manejo sanitário da piscicultura, objetivou-se avaliar a atividade imunomoduladora e efeito antioxidante da suplementação alimentar com alga verde (*C. pyrenoidosa*) no tempo de prateleira de files de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) desafiadas com *A. hydrophila*, por meio da determinação da qualidade microbiológica (colimetria, contagens de microrganismos mesófilos, psicotróficos, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacteriaceae*), análise físico-química (colorimetria, pH, produção de ácido tiobarbitúrico) e sensorial, e avaliação hematológica, bioquímica, exsudato inflamatório e *burst* respiratório. O estudo foi realizado em dois ensaios experimentais: primeiro utilizando 90 tilápias do Nilo (± 100 g) acondicionadas em 10 aquários (n=9), suplementadas com ração contendo *C. pyrenoidosa* por trinta dias, constituindo o seguinte tratamento PF (sem tratamento e sem inóculo de *A. hydrophila*); T0 (sem tratamento com *C. pyrenoidosa* e inoculados com *A. hydrophila*); T1 (tratados com 5g de *C. pyrenoidosa*/kg de ração e inoculados com *A. hydrophila*); T2 (tratados com 10g de *C. pyrenoidosa*/kg e inoculados com *A. hydrophila*) para o estudo imunomodulador. Segundo utilizando 84 tilápias do Nilo (± 100 g) acondicionadas em 12 aquários (n=7), suplementadas com rações contendo *C. pyrenoidosa* por trinta dias. Na avaliação moduladora da reação inflamatória, tilápias suplementadas com *C. pyrenoidosa* apresentaram aumento de células inflamatórias no exsudato em 6h, aumento dos leucócitos totais 24h, diminuição das espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumento de creatinina 6h, além de aumento de proteínas totais, globulinas e albumina. Enquanto no estudo de tempo de prateleira, tilápias tratadas apresentaram diminuição nas contagens de microrganismos mesófilos, psicotróficos, colimetria e enterobactérias comparados aos animais controles. Observou-se aumento na luminosidade (L^*) e (ΔE) nos animais tratados com 10g, e tilápias controles apresentaram maior oxidação lipídica com 30 dias e aumento progressivo do pH. Contudo, a suplementação com *C. pyrenoidosa* resultou em melhora das condições dos filés durante a vida de prateleira, bem como modulou a reação inflamatória, demonstrando o potencial desta microalga para uso na tilapicultura.

Palavras-chave: antioxidantes, carotenoides, vida de prateleira, inflamação, teleósteos

IMMUNOMODULATORY ACTIVITY AND ANTIOXIDANT EFFECT OF DIETARY SUPPLEMENTATION WITH GREEN SEAWEED (*Chlorella pyrenoidosa*) IN THE SHELF-LIFE OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) CHALLENGED WITH *Aeromonas hydrophila*

ABSTRACT – Based on the beneficial action of antioxidants on animal health, associated with the need to develop strategies for food safety and for the health management of fish farms, the objective of this study was to evaluate the immunomodulatory activity and antioxidant effect of food supplementation with green algae (*C. pyrenoidosa*) in shelf life of Nile tilapia fillets (*O. niloticus*) challenged with *A. hydrophila*, by determining the microbiological quality (colimetry, counts of mesophilic and psychrotrophic microorganisms, *Staphylococcus aureus* and *Enterobacteriaceae*), physical-chemical analysis (colorimetry, pH, thiobarbituric acid production) and sensory, and hematological, biochemical, inflammatory exudate and respiratory burst evaluation. The study was carried out in two experimental trials: first, using 90 tilapia (± 100 g) placed in 10 aquariums (n=9), supplemented with diet containing *C. pyrenoidosa* for thirty days, constituting the following PF treatment (no treatment and without *A. hydrophila* challenge); T0 (not treated with *C. pyrenoidosa* and inoculated with *A. hydrophila*); T1 (treated with 5g of *C. pyrenoidosa*/kg of feed and inoculated with *A. hydrophila*); T2 (treated with 10g of *C. pyrenoidosa*/kg and inoculated with *A. hydrophila*) for the immunomodulatory study. Second trial using 84 Nile tilapia (± 100 g) housed in 12 aquariums (n=7), supplemented with diets containing *C. pyrenoidosa* for thirty days. In the modulatory assessment of the inflammatory reaction, tilapia supplemented with *C. pyrenoidosa* showed an increase in inflammatory cells in the exudate at 6h, an increase in total leukocytes at 24h, a decrease in reactive oxygen species (ROS) and an increase in creatinine at 6h, in addition to an increase in total proteins, globulins and albumin. While in the shelf life study, treated tilapia showed decreased counts of mesophilic, psychrotrophic, colimetry and enterobacterial microorganisms compared to control animals. An increase in luminosity (L^*) and (ΔE) was observed in animals treated with 10g, and control tilapia showed greater lipid oxidation at 30 days and progressive pH increase. However, supplementation with *C. pyrenoidosa* resulted in an improvement in the conditions of the fillets during the shelf life, as well as modulating the inflammatory reaction, demonstrating the potential of this microalgae for use in tilapia farms.

Keywords: antioxidants, carotenoids, shelf-life, inflammation, teleosts

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Hoje em dia, os consumidores dos países desenvolvidos apresentam uma preocupação em manterem uma alimentação equilibrada e saudável, além disso, também procuram à segurança e à qualidade dos alimentos consumidos. O aumento da população mundial e o aumento do consumo de alimentos cresce a cada ano, causando uma preocupação da segurança alimentar, em termos de abastecimento e independência. Nos próximos anos, estima-se que a procura por produtos de origem animal deve aumentar.

Os alimentos são degradados devido a fatores físicos, químicos e microbiológicos e a multiplicação indesejável de microrganismos produtores de compostos voláteis, alterando o sabor e odor, sendo detectado pelo paladar e olfato humano. Essas características não são desejadas pelos consumidores, causando um problema de qualidade e não de segurança clínica, pelos alimentos deteriorados não causarem toxinfecções.

O tempo de vida de prateleira é um atributo importante usados para todos os alimentos, sendo definido como o tempo transcorrido desde a produção até o produto se tornar inaceitável para consumo, pode ser determinada pelas análises microbiológicas e químicas de amostras dos alimentos. A carne de peixe degrada mais rápido comparada aos outros tipos de carnes, devido á alta quantidade de bactérias psicotróficas, que crescem rapidamente em baixas temperaturas.

Os estudos com algas marinhas têm atraído atenção ultimamente, devido sua capacidade de funções biológicas. A *Chlorella pyrenoidosa* é uma alga verde, usada como suplemente nutricional para humanos e animais (Hongyang et al., 2011) sua coloração é verde por possuírem clorofila, além disso, contem outros pigmentos como carotenoides e diversas xantofilas (Sousa, 2021). A *Chlorella* foi considerada um alimento verde saudável, sendo aplicado como um ingrediente importante na indústria de alimentos (Shi et al., 2007). Na aquicultura a adição de carotenóides na alimentação está sendo uma prática comum, o uso na dieta de peixes melhora a carcaça e a capacidade antioxidante (Rosas, 2019).

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de tilápia, espécie que representa 60% da produção (Peixe BR, 2021). Neste contexto, a criação em cativeiro de algumas

espécies de peixes vem crescendo significativamente nos últimos anos. Dentre estas, destacam-se as tilápias, pois apresentam elevada precocidade e rusticidade, além também da sua carne ser apreciada pelo consumidor (Brasil, 2014).

A maximização dos recursos produtivos na aquicultura resulta em elevação do adensamento populacional e conseqüente perda na qualidade da água, expondo os peixes às condições de estresse (Belo et al., 2014), resultando no aumento dos níveis circulantes de cortisol que pode levar a perdas na qualidade do pescado e reduzir o tempo de prateleira (Belo et al., 2012). Devido a isso, os agentes etiológicos que possivelmente ocasionam perdas às populações de peixes em seu habitat natural, podem tornar-se agentes precursores de doenças de grande importância econômica quando submetidos às condições de criação (Belo et al., 2012), tais como a *Aeromonas hydrophila* agente primário causador de lesões ulcerativas e septicemias hemorrágicas em peixes de água doce, acarretando em perdas na produção e na qualidade do pescado (Reque et al., 2010).

Os peixes, como os mamíferos possuem vários mecanismos de defesa específicos e não-específicos contra microrganismos invasores. Esse mecanismo de proteção é essencial para os peixes, e se constitui processo controlado e coordenado, buscando minimizar os danos teciduais e restabelecer as condições fisiológicas normais (Kim et al., 2007). Desse modo, a reação inflamatória desenvolve papel importante na defesa do organismo, resultando no recrutamento e acúmulo de leucócitos no sítio lesado (Belo et al., 2005; Belo et al., 2013, Castro et al., 2014).

Partindo-se da importância nutricional do pescado para a nutrição humana e da participação benéfica dos antioxidantes na saúde animal, associado à necessidade de desenvolvimento de estratégias para segurança alimentar e para o manejo sanitário de piscicultura, o presente estudo tem por objetivos avaliar o efeito antioxidativo da *C. pyrenoidosa*, administrada via oral na ração, sobre o tempo de prateleira de filés de tilápias do Nilo, *O. niloticus*, e o efeito imunomodulador da alga sobre o mecanismo de defesa da tilápia desafiadas com *A. hydrophila*.

4. Conclusão

A suplementação com *Chlorella pyrenoidosa* pode ser considerada promissora na reação inflamatória de tilápias do Nilo, devido ao seu grande potencial na prevenção do desenvolvimento ou progressão da inflamação, pois foi capaz de auxiliar as células de defesa e reduzir a produção de ROS. Além disso, os resultados das análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais demonstraram a participação da *Chlorella pyrenoidosa* na vida de prateleira de filés de tilápia armazenados sob refrigeração, aumentando sua vida útil.

5. Referencias bibliográficas

- Abdulrahman, NM (2014) Evaluation of Spirulina spp. as food supplement and its effect on growth performance of common carp fingerlings. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2:89-92.
- Acco M, Ferreira FS, Henriques JAP, Tondo EC (2003) Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiology* 20:489-493.
- Alfaia CM, Pestana JM, Rodrigues M, Coelho D, Aires MJ, Ribeiro DM, Prates JAM (2021). Influence of dietary *Chlorella vulgaris* and carbohydrate-active enzymes on growth performance, meat quality and lipid composition of broiler chickens. *Poultry Science*, 100:926-937.
- Ali IH e Doumandji A (2017) Comparative phytochemical analysis and in vitro antimicrobial activities of the cyanobacterium *Spirulina platensis* and the green alga *Chlorella pyrenoidosa*: potential application of bioactive components as an alternative to infectious diseases. *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de la Vie* 39:41-49.
- An BK, Kim KE, Jeon JY, Lee, KW (2016). Effect of dried *Chlorella vulgaris* and *Chlorella* growth factor on growth performance, meat qualities and humoral immune responses in broiler chickens. *Springerplus*, 5:1-7.
- APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION) (2001) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. Washington: APHA p.676.
- Aracati MF, Rodrigues LF, Oliveira SL, Rodrigues RA, Conde G, Cavalcanti ENF, Borba H, Silva IC, Fernandes DC, Eto SF, Belo, MAA (2022). Astaxanthin improves the shelf-life of tilapia fillets stored under refrigeration. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Aracati, MF, Rodrigues, LF, de Oliveira, SL, Rodrigues, RA, Conde, G, Cavalcanti, ENF, Borba, H, Charlie-Silva, I, Fernandes, DC, Eto, SF and de Andrade Belo, MA (2022). Astaxanthin improves the shelf-life of tilapia fillets stored under refrigeration. *J Sci Food Agric*. Accepted Author Manuscript. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11780>
- Atitallah AB, Barkallah M, Hentati F, Dammak M, Hlima HB, Fendri I, Abdelkafi S (2019). Physicochemical, textural, antioxidant and sensory characteristics of microalgae-fortified canned fish burgers prepared from minced flesh of common barbel (*Barbus barbus*) *Food Bioscience* 30:100417.
- Boyd CE (1990) Water quality in ponds for aquaculture.
- Carneiro PCF, Urbinati EC (2001) Salt as stress response mitigator of *matrinxã* *Brycon cephalus* during transport *Aquac. Res* 32:297-304.

- Castrica M, Chiesa LM, Nobile M, Battisti F, Siletti E, Pessina D, Balzaretto CM (2021). Rapid safety and quality control during fish shelf-life by using a portable device. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 101:315-326.
- CIE (1986) Vienna: Comission Internationale de l'Eclairage, CIE Publication 15.2.
- Fradique M, Batista, AP, Nunes MC, Gouveia L, Bandarra NM, Raymundo A (2010). Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 90:1656-1664.
- Forsythe SJ. (2020). The microbiology of safe food. **John Wiley & Sons**.
- Gatti-Junior P, Assunção AW, Baldin JC and Amaral LA (2014) Microbiological quality of whole and filleted shelf-tilapia. **Aquaculture** 433:196-200.
- Khalafalla FA, Ali FH and Hassan ARH (2015) Quality improvement and shelf-life extension of refrigerated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets using natural herbs. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences** 4:33-40
- Kruskal, WH, Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American statistical Association** 47:583-621.
- Hernández MD, López MB, Álvarez A, Ferrandini E, García BG and Garrido MD (2009). Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage. **Food chemistry**, 114: 237-245
- Hongyang S, Yalei Z, Chunmin Z, Xuefei Z, Jinpeng L (2011). Cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* em efluente de processamento de soja. **Bioresource Technology**, 102 (21), 9884-9890.
- Liu L, Hall G, Champagne, P (2020). The role of algae in the removal and inactivation of pathogenic indicator organisms in wastewater stabilization pond systems. **Algal Research**, v. 46, p. 101777, 2020.
- Majdinasab M, Hosseini SMH, Sepidname M, Negahdarifar M, Li P, Development of a novel colorimetric sensor based on alginate beads for monitoring rainbow trout spoilage. **Journal of Food Science and Technology**, 55 : 1695-1704 (2018).
- Martínez S, Carballo J (2021). Physicochemical, Sensory and Nutritional Properties of Foods Affected by Processing and Storage. **Food Technology**.
- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2003) Instrução Normativa Nº. 62, de 26/08/2003. D.O.U. 14 p.

- Oliveira SL, Costa CC, Aracati MF, Rodrigues LF, Charlies-Silva I, Belo, MAA (2022). **Antioxidantes naturais como alternativa para aumentar vida de prateleira, Amppla.**
- Oliveira GL, Sueitt APE, Santos PR, Leite, LS, e Daniel, LA (2022). Removal of protozoan (oo) cysts and bacteria during microalgae harvesting: Outcomes from a lab-scale experiment. **Chemosphere**, 286, 131767.
- Pikul J, Leszczynski DE e Kummerow FA, (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 37: 1309-1313.
- Santos FMS, Silva AIM, Vieira, CB, Araújo, MH, Silva ALC, Graças Carneiro-da-Cunha M, Bezerra RS. (2017). Use of chitosan coating in increasing the shelf life of liquid smoked Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillet. **Journal of food science and technology**, 54(5), 1304.
- Sarojini A. (2021). Grape Seed Extract as a Potential Antioxidant in Fish and Fishery Products. **Biotica Research Today**, 3(11), 1053-1054
- Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Gomes RAR, Okazaki MM (2017). Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. **Blucher**, p. 560.
- Shafiei R, e Mostaghim T (2021). Improving shelf life of calf fillet in refrigerated storage using edible coating based on chitosan/natamycin containing *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* microalgae. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 1-17.
- Shi Y, Sheng J, Yang F, Hu Q (2007). Purificação e identificação de polissacarídeo derivado de *Chlorella pyrenoidosa*. **Química alimentar**, 103 (1), 101-105.
- Soares VM, Pereira, JG, Izidoro, TB, Martins, OA, Pinto JPDAN., & Biondi, G. F. (2011). Qualidade microbiológica de filés de peixe congelados distribuídos na cidade de Botucatu-SP. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, 85-88.
- Sousa LMD (2021). Efeitos de diferentes fontes alimentares no desenvolvimento de *Moina minuta* Hansen (1899) (Crustacea: *Branchiopoda*).
- Stejskal N, Miranda JM, Martucci JF, Ruseckaite RA, Barros-Velázquez J, Aubourg SP (2020). Quality enhancement of refrigerated hake muscle by active packaging with a protein concentrate from *Spirulina platensis*. **Food and Bioprocess Technology**, 13, 1110-1118.
- Takyar MBT, Khajavi SH, Safari R (2019). Evaluation of antioxidant properties of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* and their application in order to extend