

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**ESTUDO DA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR
Flavobacterium oreochromis EM PACU (*Piaractus
mesopotamicus*) ALIMENTADO COM RAÇÃO
COMERCIAL SUPLEMENTADA COM EXTRATO DE
*Ulva lactuca***

André do Vale Oliveira

Jaboticabal, SP
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**ESTUDO DA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR
Flavobacterium oreochromis EM PACU (*Piaractus
mesopotamicus*) ALIMENTADO COM RAÇÃO
COMERCIAL SUPLEMENTADA COM EXTRATO DE
*Ulva lactuca***

André do Vale Oliveira

Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal, SP

2023

O L I V E I R A
A. V.
2 0 2 3

Oliveira, André do Vale
O48e Estudo da inflamação induzida por *Flavobacterium oreochromis* em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com ração comercial suplementada com extrato de *Ulva lactuca* / André do Vale Oliveira. -- Jaboticabal, 2023
vi, 58 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2023
Orientadora: Fabiana Pikarski
Banca examinadora: Levi Pompermayer Machado, Róberson Sakabe
Bibliografia

1. Alga. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Columnariose. 4. Inflamação. 5. Pacu. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.09



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo da inflamação e resposta imune induzida por *Flavobacterium columnare* em pacus (*Piaractus mesopotamicus*), alimentados com dieta suplementada com extrato de *Ulva lactuca*

AUTOR: ANDRÉ DO VALE OLIVEIRA

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aquicultura, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FABIANA PILARSKI (Participação Virtual)
Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP, Jaboticabal-SP

Prof. Dr. RÓBERSON SAKABE (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia e Desenvolvimento Agrossocioambiental Sustentável / Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. LEVI POMPERMAYER MACHADO (Participação Virtual)
Departamento de Recursos Pesqueiros e Aquicultura / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - UNESP - Registro



Documento assinado digitalmente

LEVI POMPERMAYER MACHADO
Data: 10/10/2023 15:23:40-0300
Verifique em <https://validar.rli.gov.br>

Jaboticabal, 23 de janeiro de 2023

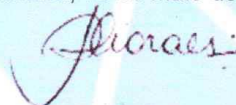
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo da inflamação induzida por *Flavobacterium columnare* em Pacus (*Piaractus mesopotamicus*), alimentados com dieta suplementada com extrato de *Ulva lactuca* e nucleotídeo**", protocolo nº 1172/21, sob a responsabilidade da Profª Drª Fabiana Pilarski, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 13 de maio de 2021.

Vigência do Projeto	30/05/2021 a 30/07/2021
Espécie / Linhagem	PACU (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)
Nº de animais	384
Peso / Idade	40-60g
Sexo	Indefinido
Origem	CAUNESP

Jaboticabal, 13 de maio de 2021.



Profa. Dra. Paola Castro Moraes

Vice- Coordenadora – CEUA

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	1
APOIO FINANCEIRO	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
REVISÃO DE LITERATURA.....	6
1.1 Produção de peixes no Brasil.....	6
1.2 <i>Flavobacterium oreochromis</i> na piscicultura.....	8
1.3 Uso da <i>Ulva lactuca</i> para peixes de produção.....	11
1.4 Inflamação em peixes.....	14
Referências bibliográficas.	16
CAPÍTULO I: Atividade antimicrobiana do extrato de <i>Ulva lactuca</i> contra bactérias isoladas em peixes nativos	20
Resumo.....	20
1. Introdução	21
2. Materiais e métodos	23
2.1 Obtenção do extrato	23
2.2 Citotoxicidade do extrato de <i>Ulva lactuca</i> por atividade hemolítica	23
2.3 Cepas bacterianas utilizadas no teste	24
2.4 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	24
3. Resultados	25
3.1 Composição do extrato de <i>Ulva lactuca</i>	25
3.2 Citotoxicidade do extrato de <i>Ulva lactuca</i> por atividade hemolítica	27
3.3 Susceptibilidade <i>in vitro</i> de bactérias patogênicas de peixes ao extrato de <i>Ulva lactuca</i>	27
4. Discussão.....	28
5. Conclusão	32
Agradecimentos	32
Referências bibliográficas	33
CAPÍTULO II: Avaliação dos parâmetros bioquímicos e da resposta inflamatória induzida por <i>Flavobacterium oreochromis</i> inativada em <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentado com dieta suplementada com extrato de <i>Ulva lactuca</i>	35
Resumo.....	35
1. Introdução	36
2. Materiais e métodos	37
2.1 Obtenção do extrato	37
2.2 Obtenção dos peixes, delineamento e preparo das dietas experimentais	39
2.4 Obtenção da cepa e preparo do inóculo	39

2.5 Indução da inflamação, coleta de sangue, exsudato e órgãos para histologia	40
3. Resultados	41
4. Discussão.....	46
5. Conclusão	49
6. Agradecimentos	49
Referências bibliográficas	49

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me guiar até aqui, iluminando toda a trajetória que, por vezes, estava escurecida por incertezas e provações de fé.

Agradeço também minha falecida avó, Maria Clarisse, que com certeza está rezando por mim lá de cima, cheguei até aqui para honrar o sonho que deixou de ser apenas meu e se tornou da minha família e principalmente dela. Este sonho só foi possível graças a ajuda da minha mãe, Maria Eunice, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, sem a ajuda dela eu não conseguiria me sustentar durante este mestrado e não teria me graduado em veterinária a 400km longe de casa. Trabalhar com peixes não surgiu na minha cabeça ao acaso, mas sim da convivência com meu pai, Sérgio, de quem herdei um hobby e decidi que trabalharia para que ele pudesse continuar pescando.

Morando em Jaboticabal desde 2015, tive a oportunidade de fazer parte de uma grande família de pessoas estranhas, a República In-dependência, cada um deles contribuíram com o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Alguns ex-moradores veteranos como Henrique (Pirrrr), Bruno (Vitelo), Lucas (Travado) e Frederico (Margarida) me ajudaram mais neste último ano, com ajuda técnica e conselhos profissionais. Túlio (Mintiu) e Guilherme (Coice) me ajudaram em momentos que eu mais precisei em horários inconvenientes. Outros moradores me incentivaram a não desistir deste caminho, especialmente meu irmão Aluísio (Cubiraci) e Eduardo (Tiporrei). Aproveito este espaço para deixar um grande abraço a dezena de ex-moradores que me possibilitaram esta experiência ímpar e aos atuais moradores (Primo, Piza, D' oeste, Mífase, Rot-Uius e Reserva) que escreverão a história desta casa pelos próximos anos.

Agradeço também a minha orientadora Dra. Fabiana Pilarski por aceitar a orientar um aluno sem nenhuma experiência durante o estágio e me acolhendo durante esta jornada de mestrado, com certeza aprendi muito sobre o que é ser excelente um profissional. Eu não teria conseguido fazer nada deste trabalho sem a ajuda de toda a equipe: Profa. Fabiana, Suzana, Evandro, Inácio, Daiane, Elielma, Daniel, Fernando, Carlos, Bruno, Raphael e Geovana. Todos me ajudaram muito, tanto no delineamento quanto na coleta e no processamento das amostras,

especialmente a Daiane (que ficou 32 horas acordada e trabalhando no primeiro dia da coleta, ajudando no cultivo da bactéria, lavagem e preparação do inóculo e depois na coleta).

Agradeço ao Prof. Marco Belo e a sua aluna Camila por permitir e acompanhar a utilização do espectrofotômetro para as análises bioquímicas; à Profa. Elisabeth Urbinati, sua aluna Áurea e a técnica Damaris por permitirem o uso da centrífuga refrigerada, por permitir o uso do espectrofotômetro e estufas no teste de citotoxicidade e por ensinar a analisar a lisozima; e ao Prof. Ângelo Berchieri e seu aluno Túlio (Mintiu) por permitir e acompanhar a utilização da incubadora shaker. Agradeço também ao Prof. Levy e seus alunos com a colaboração nas análises do extrato da macroalga.

Agradeço às agências de fomento que permitiram a execução do projeto. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (concessão número 301508/2019). Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa - processo nº 2018/24499-8.

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) [concessão 001] e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (concessão número 301508/2019).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2018/24499-8.

RESUMO

As algas verdes marinhas são consideradas uma das bioreservas mais ricas do mundo, compostas por inúmeros compostos bioativos com propriedades versáteis e múltiplas atividades, que podem ser usadas na aquicultura como imunoestimulantes, antioxidantes e bactericidas contra bactérias potencialmente patogênicas para os peixes. Os testes *in vitro* avaliaram a susceptibilidade das principais bactérias patogênicas para peixes nativos, indicando que 9.375 mg/mL do extrato apresenta atividade bactericida para a *Flavobacterium oreochromis* e bacteriostático para as demais cepas testadas. Posteriormente, foi avaliado o efeito do uso do extrato de *Ulva lactuca* nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, assim como a resposta celular à inflamação induzida na bexiga natatória por *F. oreochromis* em uma espécie nativa, em diferentes tempos de coleta. O extrato foi adicionado em ração comercial, separando quatro tratamentos: 10g/kg (extrato / ração), 20g/kg, 30g/kg e controle (ração não suplementada). Os materiais foram coletados em seis tempos: 0H – antes da indução, 3H – três horas após indução da inflamação, 6H, 12H, 24H e 48H. Dos componentes celulares presentes no sangue e no infiltrado inflamatório, apenas os trombócitos apresentaram diferenças significativas, principalmente nos peixes alimentados com 20g/kg de *U. lactuca*. As alterações histológicas são condizentes com quadros hemorrágicos e de inflamação. Nas análises bioquímicas, fosfatase alcalina, colesterol, triglicérides e albumina apresentaram interações entre tempo pós indução e tratamentos. De modo geral, a inclusão da macroalga não impacta de forma negativa na saúde do animal, mas o estudo carece de mais dados para comprovar a influência da macroalga na resposta inflamatória dos pacus.

Palavras-chave: alga, atividade antimicrobiana, bactérias, columnariose, peixes, inflamação, pacu.

ABSTRACT

Marine green algae are one of the richest bioreserves in the world, composed of bioactive compounds with versatile properties and multiple activities, which can be used in aquaculture as immunostimulants, antioxidants and bactericides against potentially pathogenic bacteria for fish. The *in vitro* tests evaluated the susceptibility of the main pathogenic bacteria for Brazilian's native fish, indicating that 9,375 mg/mL of the extract has bactericidal activity against *Flavobacterium oreochromis* and bacteriostatic for the other strains assessed. Subsequently, the effect of using *Ulva lactuca* extract on biochemical and hematological parameters was evaluated, as well as the cellular response to inflammation induced in the swim bladder by *F. oreochromis* in a native species, at different collection times. The extract was added to commercial feed, separating four treatments: 10g/kg (extract / feed), 20g/kg, 30g/kg and control (non-supplemented feed). The materials were collected at six times: 0H – before induction, 3H – three hours after inflammation induction, 6H, 12H, 24H and 48H. Of the cellular components present in the blood and in the inflammatory infiltrate, only thrombocytes showed significant differences, mainly in fish fed with 20g/kg of *U. lactuca*. Histological alterations are consistent with hemorrhagic and inflammation conditions. In biochemical analyses, alkaline phosphatase, cholesterol, triglycerides, and albumin showed interactions between post induction time and treatments. In general, the inclusion of macroalgae does not negatively impact the health of the animal, but the study lacks more data to prove the influence of macroalgae on the inflammatory response of pacu.

Key-words: algae, antimicrobial activity, bacteria, columnariosis, fish, inflammation, pacu.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Produção de peixes no Brasil

As projeções de crescimento populacional indicam que a demanda por alimentos crescerá exponencialmente, principalmente em países em desenvolvimento. Hoje, 89% da produção de animais aquáticos é destinada ao consumo humano (FAO, 2022) e considerando o território nacional, o Brasil é considerado um importante produtor de alimentos devido ao seu potencial de expansão na produção agrícola e pecuária (SAATH; FACHINELLO, 2018). A pandemia de COVID-19 impactou a produção aquícola mundial, pela redução do comércio e da captura extrativista, e os efeitos só foram atenuados porque a produção em cativeiro se manteve estável (FAO, 2022). Mesmo assim, houve uma redução na produção de organismos aquáticos durante os períodos de 2018-2020 quando comparado ao período de 2010-2018 (FAO, 2022).

Em 2019, o continente americano registrou uma produção um pouco maior do que quatro milhões de toneladas de peixes, crustáceos e moluscos, totalizando quase 20 milhões de dólares. Estes números tornam a América segunda colocada no ranking de produtores, atrás apenas da Ásia. Neste mesmo ano, o Brasil participou com a produção de mais de 600 mil toneladas de organismos aquáticos, arrecadando quase 1,2 milhões de dólares (FAO, 2021). A produção de algas ainda é menos explorada pelos países americanos, registrando aproximadamente 23 toneladas e totalizando mais de 61 milhões de dólares (FAO, 2021).

Em 2020, a aquicultura brasileira gerou 5,9 milhões de reais. A grande responsável por este montante foi a tilápia (2,3 milhões), seguida pelo camarão (1,3 milhão) e pelas espécies de peixes nativos, que juntas somam 1,5 milhão (IBGE, 2020). Algumas espécies se destacam em determinadas regiões brasileiras, como o tambacu, o pacu, a patinga e a tambatinga na região Centro-oeste; o camarão e a tilápia-do-Nilo no Nordeste; o tambaqui, o pirarucu, o pacu e a patinga na região Norte; a tilápia, o pacu e o lambari na região Sudeste e a tilápia-do-Nilo na região Sul (IBGE, 2020). A produção de plantas aquáticas em território brasileiro não apresenta a mesma significância em quantidade produzida e valor gerado, em relação às demais espécies de organismos aquáticos, posicionando o Brasil no 22º no ranking de países produtores em 2019 (FAO, 2021).

Considerando as estimativas de crescimento populacional, o Brasil se destaca como um dos maiores produtores de alimentos, tanto de origem vegetal quanto de origem animal – especialmente seu potencial para aquicultura; espera-se que o gigante sul-americano assuma um papel de protagonista. Para isso, é necessário incentivar e inovar o desenvolvimento da cadeia produtiva de peixes (SCHULTER; VIEIRA-FILHO, 2017).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie nativa da bacia do rio Paraná. A sobrepesca da espécie tem impactado os ecossistemas de água doce pois a espécie é um dos responsáveis pela dispersão de sementes, auxiliando na regeneração da vegetação. Além de sementes, eles podem se alimentar de folhas, caules, flores, frutos. Havendo necessidade, insetos, aracnídeos, moluscos e peixes menores também servem de alimento. As desovas ocorrem na estação chuvosa, entre outubro e dezembro, quando há uma abundância de alimentos nas áreas alagadas. A temperatura pode afetar a engorda do pacu em cativeiro, sendo tolerável até 22°C e uma oscilação térmica média de 6°C. O monitoramento da qualidade da água, uso de uma dieta balanceada e emprego de aeração mecânica podem otimizar o desempenho produtivo desta espécie. O pacu consegue tolerar concentrações de oxigênio dissolvido de até 3mg/L 0,025mg/L de amônia não ionizada e pH entre 6,5 e 9,0 (URBINATI; TAKAHASHI, 2020).

O sistema semi-intensivo é um dos principais utilizado por produtores de peixes redondos, como o pacu, devido seu baixo custo operacional, mas pode apresentar baixa produtividade por hectare. Pacu juvenil criado em sistema de bioflocos apresenta um desempenho produtivo maior do que juvenil criado em sistema de recirculação (SGNAULIN et al., 2021). A densidade de estocagem deve ser considerada para determinar a viabilidade da engorda do pacu em sistemas de tanques-rede, sendo que menores densidades apresentam maior desempenho (MACIEL et al., 2021; URBINATI; TAKAHASHI, 2020). O desenvolvimento da cadeia produtiva de peixes é impedido em parte por entraves econômicos como a burocracia no licenciamento ambiental, a falta de investimentos no desenvolvimento de novas tecnologias e qualificação de mão de obra e alta carga tributária (SCHULTER; VIEIRA-FILHO, 2017).

1.2 *Flavobacterium oreochromis* na piscicultura

Dentre os patógenos que acometem o pacu, destacam-se as bacterioses causadas por *Aeromonas veronii*, *A. hydrophila*, *A. dhakensis*, *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas putida*, *Streptococcus spp.*, *Vibrio fluvialis* e *Flavobacterium columnare*. Estas bacterioses são responsáveis por grandes prejuízos na produção de espécies nativas.

Pouco se sabe sobre a patogenia destas doenças no organismo de peixes nativos, o que dificulta o desenvolvimento de tratamentos para controle de surtos e sua prevenção (FERREIRA et al., 2022).

A *F. columnare*, responsável pela columnariose ou doença da sela ou coluna, é uma bactéria estritamente aeróbica, Gram-negativa, produtora de sulfeto de hidrogênio, capaz de degradar polissacarídeos complexos presentes no tecido conjuntivo. Está distribuída por todo o mundo, sendo parte da microbiota de peixes de água doce, bem como da água da produção. Um peixe morto por columnariose pode se tornar uma fonte de infecção com maior potencial do que um peixe vivo, porém este peixe que sobreviveu ao surto pode se tornar um portador saudável, transmitindo a bactéria para outros hospedeiros susceptíveis. Além disso, esta bactéria pode sobreviver no ambiente aquático em determinadas condições físicas e químicas. A matéria orgânica presente no sedimento possui nutrientes suficientes para a sobrevivência da bactéria no ambiente, sendo possível um novo surto em uma determinada propriedade. Quando a *F. columnare* não está no hospedeiro, ela modifica a morfologia da colônia para uma forma menos virulenta para poupar energia (DECLERCQ et al., 2013).

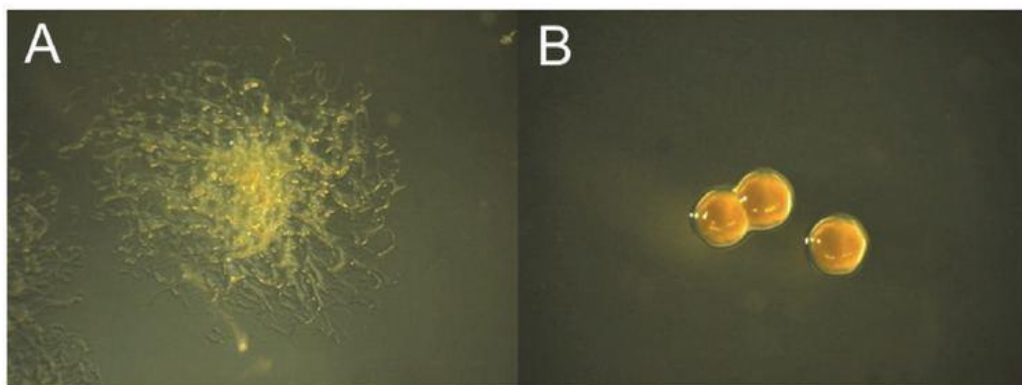


Figura 1. Características morfológicas das colônias de *Flavobacterium* spp. Fonte: LAANTO et al., 2012.

O avanço das técnicas moleculares permitiu uma melhor caracterização dos grupos genéticos da *F. columnare*, classificando-a em três dos quatro grupos como espécies diferentes através dos distintos perfis de ácidos graxos, MALDI-TOF, susceptibilidade a hospedeiros e virulência. Filogeneticamente, o grupo 1 se caracteriza como *F. columnare*, o grupo 2 se aproxima da *Flavobacterium covaie*, o grupo 3 se aproxima da *Flavobacterium davisii* e o grupo 4 se aproxima da *Flavobacterium oreochromis*. Embora a dispersão destes grupos ao redor do mundo seja um problema para peixes de produção e não de vida livre, o grupo 4 foi descrito apenas na América Latina e Ásia (LAFRENTZ et al., 2022).

Ferreira et al. (2022) observaram que no Brasil há uma nova cepa de *F. columnare* (hoje denominada de *F. oreochromis*) circulando no país, mais virulenta e resistente a baixas temperaturas. Em estudo de patogenicidade realizado para o pacu, a cepa, anteriormente isolada de tilápia-do-Nilo se mostrou altamente patogênica em doses baixas (1×10^2 , 1×10^4 e 1×10^5 UFC/ml com mortalidade de 50, 75 e 87,5%) para esta espécie nativa, o que pode ser um problema (transmissão da doença), principalmente para as espécies nativas que coabitam o mesmo ambiente das tilápias produzidas principalmente em tanques-rede.

A columnariose é caracterizada por lesões ulcerativas em brânquias, pele e nadadeiras dos peixes, possibilitando infecções secundárias por outros patógenos. Os sinais clínicos dependem da temperatura da água, idade do hospedeiro e da virulência da estirpe bacteriana. Estirpes com menor virulência, com temperatura da água acima de 21°C, podem provocar uma infecção progressiva e danos severos aos tecidos de peixes jovens antes da morte. Estirpes mais virulentas podem provocar infecções fulminantes, com alta mortalidade e sem danos severos aos tecidos de peixes jovens. As lesões são mais severas e agudas durante a fase juvenil de desenvolvimento do hospedeiro. Durante a fase adulta, a doença pode ser aguda, subaguda ou crônica, sendo que a forma aguda ou subaguda é marcada por lesões necróticas amareladas nas brânquias, evoluindo para total destruição do órgão. Na fase crônica, as lesões demoram mais para aparecer, surgindo próximas à nadadeira dorsal, circundadas por um alo avermelhado, podendo evoluir para completa deterioração da nadadeira. É possível a ocorrência de úlceras na mucosa oral, sendo esta lesão mais letal do que lesões na pele, uma vez que dificulta a alimentação do

peixe, resultando em anorexia e agravamento do quadro geral de saúde do hospedeiro (DECLERCQ et al., 2013).



Figura 2. *Piaractus mesopotamicus* apresentando lesões cutâneas compatíveis com columnaríose.

Fonte: arquivo pessoal.

No Brasil, alguns grupos de pesquisadores isolaram a *F. columnare* em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (FIGUEIREDO et al., 2005) e em quatro espécies tropicais (PILARSKI et al., 2008). Pilarski et al. (2008) demonstraram que a alta temperatura da água pode estar relacionada com a ocorrência de lesões externas e aumento da mortalidade dos peixes. Portanto, presume-se que esta bactéria é de extrema importância para piscicultura nacional, uma vez que as principais espécies de interesse comercial podem ser afetadas nas épocas que as condições climáticas favorecerem os surtos, ou seja, na primavera e verão, ocasionando mortalidade e grandes prejuízos econômicos.

A *F. columnare* pode apresentar resistência antimicrobiana geneticamente adquirida. Mutações em genes *gyrase* estão relacionados com a resistência à quinolonas de primeira e segunda geração em cepas isoladas de trutas e carpas, que também expressaram o gene *tetA* de resistência à tetraciclina com resistência fenotípica à oxitetraciclina (DECLERCQ et al., 2021).

Além da resistência aos antimicrobianos, o tempo residual dos medicamentos na carne dos pescados também gera preocupações com a saúde humana. Estas questões levaram alguns países a proibirem o uso de antimicrobianos como moduladores de produtividade. Desta forma, os aditivos funcionais nas rações são alternativas interessantes para reduzir o uso de antimicrobianos na aquicultura mundial.

1.3 Uso da *Ulva lactuca* para peixes de produção

Aditivos funcionais são ingredientes não nutritivos incluídos na formulação da ração, com a finalidade de melhorar a qualidade da ração e/ou a saúde dos animais. A imunoestimulação promovida pelos aditivos funcionais ocorre através da ativação direta do sistema imunológico ou através da microbiota nativa dos intestinos, resultando em uma melhor atividade fagocitária, ativação de macrófagos, ativação do sistema complemento, atividade da lisozima, recrutamento leucocitário, entre outros parâmetros. Os imunoestimulantes são compostos naturais que estimulam o sistema imune do hospedeiro. São classificados pela origem, modo de ação e pela via de administração (RODRÍGUEZ-ESTRADA; RANZANI-PAIVA, 2019).

As macroalgas apresentam um grande potencial como aditivo funcional devido à variedade de compostos de interesse para a indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. A *Ulva lactuca* é uma espécie de macroalga que desperta interesse da indústria devido sua composição química: 60% de carboidratos, 10-47% de proteínas, 1-3% de lipídeos e 7-38% de minerais. Os principais compostos bioativos desta alga são os fenólicos, pigmentos (carotenóides e clorofila) e polissacarídeos (ulvana). Os compostos fenólicos apresentam atividade antialérgica e determinadas concentrações de polifenóis podem prevenir obesidade e síndrome metabólica. Os carotenoides possuem atividade anti-inflamatória e antioxidante devido a habilidade de neutralizar radicais livres (PAPPOU et al., 2022).

Os polissacarídeos presentes na *U. lactuca* variam de 15 a 65% da massa seca. O principal polissacarídeo bioativo é a ulvana, polissacarídeo sulfatado composto por ramnose, ácido urônico, xilose e glucanos. A ulvana apresenta atividade antiviral, antioxidante, antitumoral, anticoagulante, anti-hiperlipidêmico, hepatoprotetor, imunoestimulante (PAPPOU et al., 2022), antioxidante (PAPPOU et al., 2022; SUNDARI; WIJAYA, 2021) e anti-inflamatória (MO'O et al., 2020; SUNDARI; WIJAYA, 2021).

Alguns estudos avaliaram a utilização do gênero *Ulva* spp. como aditivo na ração para organismos aquáticos para promover maior desempenho produtivo e performance digestiva e saúde (THARAKA et al., 2020). Cruz-Suárez et al. (2009) compararam a adição de *U. clathrata*, *Macrocystis pyrifera* e *Ascophyllum nodosum*

na ração de *Litopenaeus vannamei* (camarão-branco-do-pacífico), observando que os animais que receberam ração suplementada com *U. clathrata* tiveram maior crescimento e hidro estabilidade dos pellets. A inclusão de 5% de *U. lactuca* na dieta de juvenis de *Lutjanus stellatus* (pargo-pintado) contribuiu com o maior crescimento e higidez dos peixes devido à atividade antioxidante e saúde hepática (ZHU et al., 2016).

A suplementação de 50 g/kg de *Ulva lactuca* na dieta da roncadeira-austral (*Argyrosomus japonicus*) é recomendada, pois essa dose não ocasiona efeitos negativos no desempenho produtivo e na utilização do alimento. Estudos hematológicos e bioquímicos também demonstraram que essa dose é segura e não causa efeitos adversos na fisiologia desta espécie (MADIBANA et al., 2017).

THARAKA et al. (2020) alimentaram o falso-alabote-japonês (*Paralichthys olivaceus*) durante 12 semanas com uma combinação de algas em pó (*Ulva lactuca*, alface do mar e alga vermelha) incluídas na ração com baixa quantidade de proteína (44%) e observaram que a inclusão desta combinação mostrou efeitos positivos em todos os parâmetros avaliados (similares ou superiores ao grupo alimentado com ração contendo alta quantidade de proteína na dieta - 55%), como maior desempenho produtivo, utilização do alimento, digestibilidade, número de células caliciformes e vilosidades intestinais. A resposta imune não específica também foi superior nos peixes alimentados com a combinação de algas, principalmente a lisozima, imunoglobulinas, anti-protease, superóxido dismutase e catalase, além de maior sobrevivência após desafio com a bactéria *Edwardsiella tarda*.

Pesquisadores avaliaram a composição da *Ulva lactuca* e alimentaram tilápia-do-Nilo com uma combinação da alga com probióticos e L-carnitina e observaram que os peixes alimentados com essa combinação tiveram maior quantidade de células vermelhas, maior valor de hematócrito, de leucócitos, provavelmente devido a maior quantidade de carboidratos complexos e polissacarídeos presentes na alga. Este estudo também concluiu que a alga é rica em proteína (22%) e nutricionalmente superior as plantas terrestres, provendo proteína de qualidade tanto para peixes quanto para humanos (EL-MESSALAMY et al., 2021).

Na Tunísia, pesquisadores avaliaram a composição química e as propriedades funcionais da *U. lactuca* e verificaram que esta espécie é uma boa fonte de fibra alimentar, sendo a hemicelulose a porção mais abundante, além de ser rica em

proteínas e ácidos graxos poliinsaturados, como os ácidos oleicos, linoleicos e linolênicos. Entretanto, o teor de metais pesados das algas retiradas da região costeira daquele país impede o consumo humano, mas não impede a extração dos compostos específicos como a ulvana (polissacarídeo sulfatado) (YAICH et al., 2011).

Os efeitos anti-inflamatórios da ulvana são vasculares, atuando na via da bradicinina (MO'O et al., 2020). As proteases de mastócitos ativados lisam as proteínas C3 e C5 do sistema complemento, formando pequenos peptídeos C3a e C5a. Os peptídeos C3a e C5a promovem a degranulação dos mastócitos, compostos calicreínas. As calicreínas são proteases que atuam sobre os cininogênios, formando pequenos peptídeos vasoativos denominadas de cininas, como a bradicinina. As cininas apresentam atividade antimicrobiana, modulam a dor e prurido, estimulam os neutrófilos e aumentam a permeabilidade vascular (TIZARD, 2014).

Polissacarídeos hidrossolúveis de outro exemplar do gênero *Ulva* spp. pode melhorar o crescimento, resposta imune indireta e a atividade de enzimas antioxidantes. Akbary; Aminikhoei (AKBARY; AMINIKHOEI, 2018) investigaram os efeitos do extrato de *U. rígida* em juvenis de *Mugil cephalus*, tainha, e verificaram que 10mg/kg do extrato de polissacarídeos hidrossolúveis estimularam a atividade da lisozima, atividade respiratória dos leucócitos e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutatona e malondialdeído.

O uso de macroalgas como aditivos funcionais também é estudado em outras espécies animais. Um dos problemas mais investigados em ruminantes é a produção de metano. Machado et al. (2014) avaliaram a fermentação *in vitro* de 20 espécies de macroalgas incubadas com fluido ruminal por 72 horas, quantificando a produção total de gás e a produção de metano, e verificaram que macroalgas dos gêneros *Dictyota* spp. e *Asparagopsis* spp. reduzem em mais de 53% a produção total de gases e em mais de 90% a produção de metano. Posteriormente, Machado et al. (2016), estudaram os bioativos presentes na macroalga *A. taxiformis* e verificaram que o bromofórmio é o principal bioativo com potencial antimetanogênico *in vitro*, estando presente em quantidades suficientes na biomassa.

1.4 Inflamação em peixes

Diante de uma infecção por patógeno, o sistema imune responde de maneira inata e adaptativa. A resposta imune inata é ativada imediatamente após a entrada do microrganismo agressor para eliminá-lo. Esta resposta imune inata é mediada por células e moléculas. As células, especialmente os fagócitos, são responsáveis por fagocitar os patógenos e participam da apresentação do antígeno ao sistema imune. As moléculas se ligam aos antígenos para sinalizar a presença do patógeno. A inflamação é uma resposta inata ao processo de infecção, algumas das células envolvidas na inflamação também auxiliam no reparo dos tecidos acometidos (TIZARD, 2014).

A resposta imune adquirida envolvendo linfócitos B e T é menos desenvolvida em teleósteos, portanto, a resposta inata é o principal mecanismo de defesa, através de mediadores moleculares e celulares (SOUSA et al., 2022). As moléculas associadas diretamente ao patógeno são denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), enquanto as moléculas associadas às células mortas ou danificadas são denominadas de padrões moleculares associados à lesão (DAMPs) (TIZARD, 2014). DAMPs e PAMPs interagem com receptores de reconhecimento padrão (PRRs) de células sentinelas, resultando na ativação do sistema imune inato (TIZARD, 2014). Além dos PAMPs, as células hospedeiras também reconhecem os padrões moleculares associados à micróbios (MAMPs) (SOUZA et al., 2022).

Os principais PRRs são do tipo Toll-like receptors (TLRs) que estão localizados no interior e no exterior das células para detecção de patógenos intracelulares e extracelulares, respectivamente (TIZARD, 2014). Quando um PAMP se liga a um TLR específico, formam-se complexos proteicos que sinalizam e ativam a transdução de sinais, resultando na formação de citocinas pró-inflamatória (TIZARD, 2014). Dos 13 tipos de TLRs identificados em mamíferos, TLR6 e TLR10 não existem no genoma dos teleósteos (LIU et al., 2022). O número de TLR nos teleósteos varia entre as espécies, provavelmente devido a diversidade de microrganismos patogênicos no ambiente aquático que variam com as condições paleoclimáticas, como no caso do bacalhau (*Gadus morhua*) do ártico e do peixe-zebra (*Danio rerio*) que apresentam 43 e 24 tipos de TLRs, respectivamente (SOUSA et al., 2022). O TLR14, relatado em

diversas espécies de peixes, foi identificado como um possível substituto TLR6 ou TLR10 (LIU et al., 2022).

Em teleósteos, os TLRs podem recrutar cinco tipos de proteínas adaptadoras para iniciar a via de sinalização, sendo elas a MyD88, TRIF, TIRAP, SARM e BCAP (LIU et al., 2022). A via MyD88-dependente ativa duas vias distintas envolvendo o fator de transcrição NF- κ B e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), resultando na produção de citocinas pró inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (tnf- α), interleucina tipo 1 β (il-1 β) e interleucina tipo 6 (il-6) (LIU et al., 2022).

Outros PRRs que participam da resposta imune inata são os receptores similares ao domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NLRs ou NOD-like receptors), que ativam a via do NF- κ B e desencadeia a produção de citocinas pró inflamatórias e proteínas antimicrobianas, como a defensina (TIZARD, 2014). Os NLRs atuam como sentinelas intracelulares, juntamente com outros PRRs, traduzindo sinais de respostas pró-inflamatória e regulando a homeostase tecidual (CHUPHAL; RAI; ROY, 2022). Os teleósteos apresentam uma vasta variedade de NLRs, como o Zebrafish que possui aproximadamente 400 em seu genoma (CHUPHAL; RAI; ROY, 2022). Curiosamente, os NLRs de teleósteos compartilham semelhanças com NLRs de mamíferos, exceto p NLR C-like que é único nos peixes (CHUPHAL; RAI; ROY, 2022). Durante uma infecção bacteriana ou viral há uma maior expressão de NLR1 e NLR2 em peixes (CHUPHAL; RAI; ROY, 2022).

Os macrófagos, mastócitos, células dendríticas e células do epitélio do sistema respiratório e do intestino são chamadas de células sentinelas. Quando ativadas produzem quimiocinas que modulam a resposta inflamatória, estimulando a migração celular e controlando a duração do processo inflamatório (TIZARD, 2014).

As principais citocinas envolvidas na inflamação, tnf- α , il-1 β e il-6, também apresentam atividades metabólicas. Promovem catabolismo de proteínas da musculatura esquelética para disponibilizar aminoácidos, que são utilizados na produção de anticorpos e citocinas. O tnf- α inibe a captação de lipídeos pelos pré-adipócitos, resultando na perda de peso. Também ativam a síntese de proteínas de fase aguda, como PRRs solúveis, proteínas do sistema complemento, inibidores de proteases e proteínas ligantes de ferro. Estas proteínas ligantes de ferro são

importantes devido a competição das células do hospedeiro com as bactérias que também dependem do ferro para seu crescimento (TIZARD, 2014).

Diferentes espécies são utilizadas no estudo da inflamação em peixes. Marínque et al. (2017), verificaram que o pacu pode ser utilizado como modelo para estudar a resposta inflamatória granulomatosa crônica na musculatura induzida pelo bacilo Calmette-Guérin (BCG), por apresentar uma cinética celular semelhante a inflamação causada por *Mycobacterium marinum*. Tilápias-do-Nilo foram utilizadas por Charlie-Silva et al. (2019) para avaliar a expressão de proteínas de fase aguda (PFAs) durante aerocistite induzida por *Aeromonas hydrophila* e verificaram que a modulação da expressão de PFAs é semelhante aos humanos, com aumento de ceruplasmina, haptoglobina, α -2-macroglobulina e complemento C3, e redução da albumina e da transferrina. A cinética celular no exsudato demonstrou um acúmulo significativo de trombócitos, macrófagos, linfócitos e predominância de granulócitos, com maior produção de espécies reativas ao oxigênio.

A resposta celular pode ser avaliada através de agentes flogógeno, como bactérias (CHARLIE-SILVA et al., 2019) e a carragenina (RODRIGUES-SOARES et al., 2018), pois induzem a migração celular para o local de inflamação. Por ser um órgão cavitário e delimitado, é comum inocular agentes flogógenos na bexiga natatória para induzir uma aerocistite porque a inoculação e a coleta do exsudato inflamatório têm um acesso mais fácil (CHARLIE-SILVA, et al. 2019).

Apesar de todos os avanços obtidos na aquicultura com o uso de aditivos nutricionais e o estudo da inflamação induzida, não há relatos na literatura sobre o efeito da inclusão dietária de *Ulva lactuca* na inflamação induzida por *F. columnare* na bexiga natatória de pacu.

Referências bibliográficas.

AKBARY, P.; AMINIKHOEI, Z. Effect of water-soluble polysaccharide extract from the green alga *Ulva rigida* on growth performance, antioxidant enzyme activity, and immune stimulation of grey mullet *Mugil cephalus*. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 2, p. 1345–1353, 1 abr. 2018.

CHARLIE-SILVA, I. et al. Acute-phase proteins during inflammatory reaction by bacterial infection: Fish-model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

- CHUPHAL, B.; RAI, U.; ROY, B. Teleost NOD-like receptors and their downstream signaling pathways: A brief review. **Fish and Shellfish Immunology Reports**, v. 3, p. 100056, dez. 2022.
- CRUZ-SUAREZ, L. E. et al. Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. **Aquaculture Nutrition**, v. 15, n. 4, p. 421–430, ago. 2009.
- DECLERCQ, A. M. et al. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. **Veterinary Research**, v. 44, n. 27, 2013.
- DECLERCQ, A. M. et al. Comparative genomics of *Flavobacterium columnare* unveils novel insights in virulence and antimicrobial resistance mechanisms. **Veterinary Research**, v. 52, n. 1, 1 dez. 2021.
- EL-MESSALAMY, A. M. D. et al. Phytochemical constituents of *Ulva lactuca* and supplementation to improve the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) haemato-biochemical status. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 2663–2670, 2021.
- FAO. FAO STATISTICS. **FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2019**, 2021.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards blue transformation**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022.
- FERREIRA, D. DE A. R. et al. Morpho-molecular identification, pathogenicity for *Piaractus mesopotamicus*, and antimicrobial susceptibility of a virulent *Flavobacterium columnare* isolated from Nile tilapia cultured in Brazil. **Aquaculture**, p. 738486, jun. 2022.
- FIGUEIREDO, H. C. P. et al. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 199–204, 2005.
- IBGE. **Dados SIDRA - Produção da pecuária municipal 2019**. Rio de Janeiro, 2020.
- LAANTO, E. et al. Phage-driven loss of virulence in a fish pathogenic bacterium. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 31 dez. 2012.
- LAFRENTZ, B. R. et al. The fish pathogen *Flavobacterium columnare* represents four distinct species: *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium covae* sp. nov., *Flavobacterium davisii* sp. nov. and *Flavobacterium oreochromis* sp. nov., and emended description of *Flavobacterium columnare*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 45, n. 2, 1 abr. 2022.
- LIU, R. et al. Fish-specific Toll-like receptor 14 (TLR14) from Asian swamp eel (*Monopterus albus*) is involved in immune response to bacterial infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 124, p. 313–323, 1 maio 2022.
- MACHADO, L. et al. Effects of marine and freshwater macroalgae on in vitro total gas and methane production. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 22 jan. 2014.
- MACHADO, L. et al. Identification of bioactives from the red seaweed *Asparagopsis taxiformis* that promote antimethanogenic activity in vitro. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 5, p. 3117–3126, 1 out. 2016.
- MACIEL, H. M. et al. Densidade de estocagem de peixes nativos e seus híbridos criados em tanques-rede. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e225101018591, 18 ago. 2021.

- MADIBANA, M. J. 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**, v. 43, p. 249–254, 2017.
- MANRIQUE, W. G. et al. Inflamación crónica granulomatosa en el pez teleósteo *Piaractus mesopotamicus*: Modelo de estudio histopatológico. **Revista MVZ Cordoba**, v. 22, n. 1, p. 5738–5746, 1 jan. 2017.
- MO'O, F. R. C. et al. Ulvan, a polysaccharide from Macroalga *Ulva* sp.: A review of chemistry, biological activities and potential for food and biomedical applications. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 10, n. 16, 1 ago. 2020.
- PAPPOU, S. et al. Extraction of Bioactive Compounds from *Ulva lactuca*. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 12, n. 4, 1 fev. 2022.
- PILARSKI, F.; ROSSINI, A. J.; CECCARELLI, P. S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. **Braz. J. Biol**, v. 68, n. 2, p. 409–414, maio 2008.
- RODRIGUES-SOARES, J. P. et al. Induced aerocystitis and hemato-immunological parameters in Nile Tilapia fed supplemented diet with essential oil of *Lippia alba*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 1, 2018.
- RODRÍGUEZ-ESTRADA, U.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Aditivos funcionais nas rações para aquicultura. Em: RANZANI-PAIVA, M. J. T. et al. (Eds.). **Biotecnologia e sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Associação de Patologistas de Organismos Aquáticos (ABRAPOA), 2019. p. 81–110.
- SAATH, K. C. DE O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 2, p. 195–212, 1 abr. 2018.
- SCHULTER, E. P.; VIEIRA-FILHO, J. E. R. **Texto para discussão - Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico da cadeia produtiva de tilápia**. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.ipea.gov.br>>. Acesso em: 22 maio. 2022.
- SGNAULIN, T. et al. Culture of pacu *Piaractus mesopotamicus* in biofloc technology (BFT): insights on dietary protein sparing and stomach content. **Aquaculture International**, v. 29, n. 5, p. 2319–2335, 1 out. 2021.
- SOUSA, C. et al. Toll-Like Receptor Evolution: Does Temperature Matter? **Frontiers in Immunology**, v. 13, 14 fev. 2022.
- SUNDARI, L. P. R.; WIJAYA, P. A. W. Sea lettuce (*Ulva lactuca*) as a source of dietary antioxidant. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 5, n. 4, p. 603–608, 1 abr. 2021.
- THARAKA, K. et al. Algae-clay powder (sea lettuce, *Ulva lactuca* and red algae, *Solieria chordalis* in exfoliated micronized montmorillonite) supplementation in a fish meal-reduced diet for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 1–8, 2020.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. v. 1
- URBINATI, E. C.; TAKAHASHI, L. S. Pacu (*Piaractus mesopotâmicus*). Em: BALDISSEROTTO, B. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 3ª ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2020. v. 1p. 169–200.

YAICH, H. et al. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 895–901, 15 out. 2011.

ZHU, D. et al. The green alga *Ulva lactuca* as a potential ingredient in diets for juvenile white spotted snapper *Lutjanus stellatus* Akazaki. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 703–711, 1 fev. 2016.

CAPÍTULO I: Atividade antimicrobiana do extrato de *Ulva lactuca* contra bactérias isoladas em peixes nativos

Andre Vale-Oliveira¹, Inácio Mateus Assane^{1,2}, Daiane Vaneci-Silva¹, Elielma Lima de Sousa³, Daniel de Abreu Reis Ferreira³, Geovana Dotta⁴, Levi Pompermayer Machado⁵, Fabiana Pilarski^{1,3*}

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Jaboticabal. Centro de Aquicultura (CAUNESP), Jaboticabal, SP, Brasil;

² Universidade de Zambeze (UniZambeze), Escola de Ciências da Agricultura, Zambeze, Moçambique;

³ Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Jaboticabal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Jaboticabal, SP, Brasil;

⁴ Universidade Federal da Bahia (UFBA). Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, BA, Brasil.

⁵ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Experimental de Registro.

*Autor correspondente: Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, Brasil. E-mail:

fabiana.pilarski@unesp.br.

Resumo

As algas verdes marinhas são consideradas uma das bioreservas mais ricas do mundo, compostas por inúmeros compostos bioativos com propriedades versáteis e múltiplas atividades, que podem ser usadas na aquicultura como imunoestimulantes, antioxidantes e bactericidas contra bactérias potencialmente patogênicas para os peixes. Este estudo avaliou a susceptibilidade *in vitro* de bactérias Gram negativas (*Aeromonas hydrophila*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas* spp., *Citrobacter freundii* e *Flavobacterium oreochromis*) e Gram positivas (*Streptococcus agalactiae* sorotipo III, *S. agalactiae* sorotipo II, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Lactococcus lactis*, *L. garvieae*) isoladas de peixes ao extrato de *U. lactuca*. Os resultados demonstraram que o extrato (9.375 mg/mL) apresentou atividade bactericida para a *F. oreochromis* e bacteriostático para as demais cepas testadas. Este resultado é promissor, pois permitirá o estabelecimento de protocolos para testes *in vivo* com a alga contra uma das mais importantes bactérias emergentes de peixes, a *F. oreochromis*.

Palavras-chave: alga, bactérias, peixes, atividade bactericida

1. Introdução

A resistência aos antimicrobianos é um dos principais problemas de saúde em todo o mundo, sendo uma das principais causas de mortalidade, especialmente em países em desenvolvimento e pobres. Em 2019, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Actinobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* foram relacionadas com mais de 1,27 milhões de mortes em decorrência da resistência antimicrobiana (MURRAY et al., 2022). Mais de 60 países compartilharam relatórios sobre a resistência antimicrobiana com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o que significa um estado crítico de vigilância no uso dessas moléculas (WHO, 2021).

O isolamento da *K. pneumoniae* em carpas na Índia (*Labeo rohita*) (DAS et al., 2018), piraíbas (*Brachyplatystoma filamentosum*) (CERDEIRA et al., 2020) e tilápia-do-Nilo no Brasil (*Oreochromis niloticus*) (VANECCI-SILVA et al., 2022) evidenciam o risco para saúde humana e de espécies nativas, devido a sua capacidade de transferir genes de resistência através de plasmídeos (WYRES; HOLT, 2018). Além da transmissão genética, a resistência antimicrobiana também tem relação com o uso excessivo e com o mau uso de antimicrobianos (WATTS et al., 2017).

As bacterioses representam um grande prejuízo na produção de peixes, pois ocasionam mortalidade em massa e reduzem o desempenho produtivo dos peixes sobreviventes (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017). Na aquicultura, é comum o uso de antimicrobianos pelo menos uma vez durante o ciclo produtivo para controlar surtos de bacterioses na piscicultura, ocorridos pelo desequilíbrio fisiológico, desnutrição ou pressões no meio aquático, como alteração na qualidade da água que aumentam o estresse metabólico. Esses antimicrobianos, quando utilizados de forma indiscriminada e sem critérios, contribuem para o aumento da resistência antimicrobiana, causam danos a microbiota da água e acúmulo de resíduos, que são um risco à saúde humana (EL-SAYED et al., 2022).

A sazonalidade dos surtos proporcionado por diferentes bactérias isoladamente ou em coinfeção (DELPHINO et al., 2019) ressalta a necessidade de alternativas para a prevenção e controle das bacterioses.

Pesquisadores de todo o mundo estão buscando novas moléculas que tenham efeito imunoestimulante, sejam bactericidas, tenham custo acessível e não produzam efeitos colaterais, principalmente para animais de produção.

Dentre as alternativas promissoras, destacam-se as macroalgas, pertencentes ao gênero *Ulva* spp. (Chlorophyta), as quais possuem uma grande variedade de metabólitos e compostos bioativos naturais, considerados potentes agentes terapêuticos, dentre eles, uma grande quantidade de polissacarídeos. Esse gênero é muito utilizado na área farmacêutica e médica (terapêutica e regenerativa) (MOAWAD et al., 2022).

Estudo com Zebrafish (*Danio rerio*) demonstrou que a inclusão de 1% de *Ulva intestinalis* na dieta pode melhorar a imunidade, pois aumenta a expressão genética de enzimas antioxidantes, interleucina IL-1 β e lisozima, além de aumentar a expressão de genes relacionados com o crescimento (GH e IGF-1). Outros trabalhos com peixes marinhos e camarões também relataram maior resistência a patógenos após enriquecimento da dieta com macroalgas do gênero *Ulva* spp. (ROUHANI et al., 2022). Outros estudos demonstram que o uso de macroalgas promove maior desempenho produtivo e menor conversão alimentar em tilápia-do-Nilo (ASHOUR et al., 2020). Já em camarão branco do Pacífico, a suplementação de ração com 5 g/kg de *Ulva intestinalis* promoveu maior desempenho produtivo, estimulação do sistema imunológico e proteção dos camarões contra a bactéria *Vibrio parahaemolyticus* (KLONGKLAEW et al., 2021).

A macroalga *Ulva lactuca*, conhecida mundialmente como alface do mar apresenta um potencial farmacológico significativo devido seus compostos fenólicos e polissacarídeos, especialmente a ulvana, com atividades antifúngicas, antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (SHOBIER; EL ASHRY, 2021; BENSY et al., 2022; IBRAHIM et al., 2022).

Neste cenário, o presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *U. lactuca* contra bactérias patogênicas para peixes com a finalidade de verificar o seu potencial no controle dos surtos nas pisciculturas brasileiras.

2. Materiais e métodos

2.1 Obtenção do extrato

O extrato foi obtido do litoral da China e processado pela empresa FocusHerb Corp®. As macroalgas coletadas foram recebidas como matéria prima na empresa, onde passaram por inspeção e lavagem com água destilada. Após a lavagem, a matéria prima bruta foi macerada e em seguida diluída com água destilada. A mistura foi centrifugada e o precipitado filtrado. O extrato ainda úmido foi seco por spray e o produto foi peneirado em malha fina para que partes maiores não fossem para a embalagem, facilitando a utilização do produto. O resultado foi um extrato em pó solúvel em água.

Antes do extrato seguir para o envase, foram realizadas análises laboratoriais para certificação da qualidade e comprovaram que o extrato atende os padrões físicos, químicos e não apresenta contaminação por fungos e bactérias.

2.2 Citotoxicidade do extrato de *Ulva lactuca* por atividade hemolítica

A toxicidade do extrato da macroalga foi avaliada através da hemólise de eritrócitos de pacus, após o sangue fresco ter sido coletado de pacus juvenis saudáveis, seguindo a metodologia de Assane et al. (2021). Os eritrócitos foram lavados três vezes por centrifugação (500 x g por 5 min, 4 °C) com tampão fosfato (PBS – pH 7,4), descartando o sobrenadante. As células decantadas foram suspensas com PBS, formando uma solução de eritrócitos a 1% (v/v). Esta solução de eritrócitos foi adicionada em tubos de 2 mL contendo diferentes concentrações da solução da macroalga diluída em água destilada, em tubos contendo uma solução Triton X-100 a 1% (v/v) como controle positivo (que provocará 100% de hemólise) e em tubos contendo apenas PBS como controle negativo (que não provocará hemólise). Estes tubos foram incubados por 1h em 28 °C e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 500 x g por 5 min (4°C). 100 µL do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para microplacas de 96 poços e a absorbância foi determinada a 540 nm.

A fórmula $\% \text{ of lysis} = \frac{(A_s - A_{pbs})}{(A_{triton} - A_{pbs})} \times 100$ foi utilizada para determinar a porcentagem de hemólise de cada amostra com base na absorbância, onde A_s representa a leitura das amostras, A_{pbs} representa o PBS e A_{triton} representa o

Triton X. A média das leituras de cada amostra foi analisada utilizando one-way ANOVA e teste Holm-Sidak de múltipla comparação, com nível de significância de 0.05.

2.3 Cepas bacterianas utilizadas no teste

Foram selecionadas 12 cepas de bactérias patogênicas para peixes nativos e tilápias, sete gram negativas: *Aeromonas hydrophila* (NH591949), *A. veronii* (KJ561035), *A. jandaei* (KJ561033), *Edwardsiella tarda* (KJ560941), *Pseudomonas* spp. (KJ561095), *Citrobacter freundii* (KJ561090) e *Flavobacterium oreochromis* (MW186708) e cinco bactérias gram positivas: *Streptococcus agalactiae* sorotipo III (OR648673), *S. agalactiae* sorotipo II (KJ561055), *Enterococcus faecalis* (KJ560969), *Lactococcus lactis* (KJ561005), *L. garveiae* (KJ560993) com a finalidade de determinar a susceptibilidade *in vitro* ao extrato de *U. lactuca*. Uma cepa de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™ - CP009072) foi utilizada como controle de qualidade da metodologia, baseado na interação com o antimicrobiano florfenicol (FFC).

As cepas foram isoladas de surtos de doenças em peixes que apresentavam sinais clínicos sugestivos de bacteriose, diagnosticado positivamente após análise microbiológica e molecular e armazenadas no banco de cepas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos, no Centro de Aquicultura da UNESP.

2.4 Atividade antimicrobiana *in vitro*

As concentrações mínimas inibitória (CIM) e mínima bactericida (CBM) foram determinadas através do método de microdiluição em caldo, elaborado pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2020). Anteriormente, o florfenicol (FFC – massa molar de 358,21 e pureza $\geq 99\%$, fabricado por Sigma®), foi diluído em 95% de etanol e diluída em água destilada para o preparo das soluções estoque, na concentração de 1,280 µg/mL. O extrato da macroalga foi diluído em água destilada, obtendo uma solução estoque de 0,15 g/mL.

Primeiramente, as bactérias foram ativadas em ágar Muller-Hinton (Sigma Aldrich®), com temperatura de incubação ajustada para cada bactéria. As colônias foram adicionadas em meio líquido de Muller-Hinton (Sigma Aldrich®) até atingir a concentração de 5×10^5 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

Para a realização do teste *in vitro*, foram plaqueados 100 µL do meio líquido Muller-Hinton® (ajustado para cada bactéria) em poços isolados de uma placa de microtitulação e 100 µL do extrato de *Ulva lactuca* adicionado no primeiro poço e completando os demais poços com diluição seriada (100 µl do poço anterior). Após foi adicionado 100 µL de cada bactéria nos poços testes (96 poços) e incubados a 28°C-35°C por 24 - 48 horas, dependendo da biologia de cada bactéria. As CIMs foram determinadas em duplicatas, tendo dois poços como controle de viabilidade da cepa e de esterilidade do meio de cultura em cada fileira de poços. O caldo Mueller-Hinton cation ajustado (Sigma-Aldrich®) foi usado para testar a susceptibilidade de todas as cepas, sendo enriquecido de acordo com a necessidade de cada uma.

Após a incubação, os poços foram inspecionados visualmente após adição de 20 µL de cloreto de trifeniltetrazólio (Sigma-Aldrich® - 5 mg/mL) para avaliar macroscopicamente o crescimento bacteriano nos poços. A concentração mais baixa de cada antimicrobiano em que nenhum crescimento foi observado na suspensão da cultura (não corada em rosa) foi definida como a CIM. As suspensões sem crescimento bacteriano visível foram então semeadas em placas de Agar Mueller-Hinton (Sigma Aldrich®) e incubadas por 24-48 horas (dependendo de cada bactéria) em duplicata. A concentração mais baixa na qual nenhum crescimento foi observado visualmente na placa foi considerada como CBM. A razão CBM-CIM foi usada para identificar as concentrações do extrato como bactericida ou bacteriostática.

3. Resultados

3.1 Composição do extrato de *Ulva lactuca*

Uma amostra de 36g gramas do extrato foi enviada para análise de sua composição no Laboratório C.B.O. Análises Laboratoriais Ltda (Campinas, SP).

Os glicídios foram os componentes principais do extrato (56,42%) juntamente com a glicose total (56,42%). Os valores são descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Composição bromatológica do extrato de *Ulva lactuca*.

Ensaio	Resultado (em %)	Ensaio	Resultado (em%)
Ác. Aspartico	0.1	Leucina	0.04
Ác. Glutâmico	0.25	Fenilalanina	0.03
Serina	0.03	Lisina	0.03
Glicina	0.07	Triptofano	0.04
Histidina	0.04	Hidroxiprolina	< 0.01
Taurina	< 0.01	Aminoácidos Totais	0.88
Arginina	0.02	Fucose	< 0.01
Treonina	0.02	Arabinose	< 0.01
Alanina	0.07	Ramnose	< 0.01
Prolina	0.06	Galactose total	< 0.01
Tirosina	< 0.01	Glicose total	56.42
Valina	< 0.01	Xilose	< 0.01
Metionina	< 0.01	Manose	< 0.01
Cistina	< 0.01	Glicídios totais	56.42
Isoleucina	0.02	Proteínas totais	5.92

Outra amostra da alga foi enviada ao Laboratório de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas – LAFEN da Unesp, Campus de Registro, para determinação dos micronutrientes (B; Cu; Fe; Mn e Zn) e macronutrientes (N; P: K; Ca; Mg e S). O nitrogênio foi determinado pelo método Kjeldahl (GALVANI; GAERTNER, 2006), o fósforo por colorimetria, o enxofre por turbidimetria do sulfato de bário, o boro por Azometina-H e o potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e o zinco em espectrofotômetro de absorção atômica, após digestão nítrico-perclórica de acordo com metodologia de Malavolta; Vitti; Oliveira (1989). Os resultados (Tabela 2) foram expressos em teores de g do elemento por kg de biomassa seca do extrato (g.kg⁻¹).

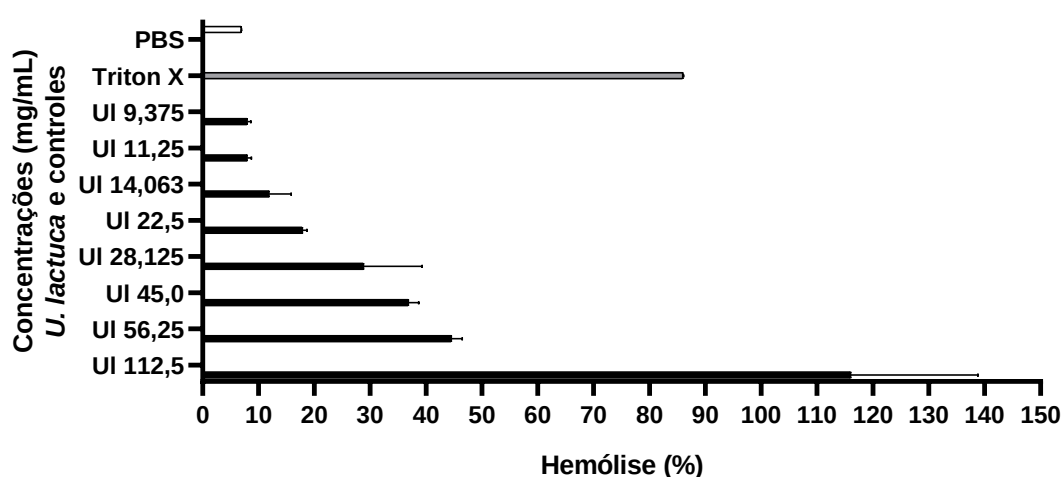
Tabela 2. Composição de macro e micronutrientes do extrato de *Ulva lactuca*

Nutrientes minerais	Extrato solúvel de U. lactuca	Desvio padrão
Nitrogênio (g/kg)	8	1.2
Fósforo (g/kg)	0.6	0.09
Potássio (g/kg)	4	0.6
Cálcio (g/kg)	8	1.185
Magnésio (g/kg)	10	1.5
Enxofre (g/kg)	18.0	2.7
Boro (mg/kg)	31	4.65
Cobre (mg/kg)	6.8	1.02
Ferro (g/kg)	0.539	0.08
Manganês (mg/kg)	17	2.475
Zinco (mg/kg)	9.8	1.47

3.2 Citotoxicidade do extrato de *Ulva lactuca* por atividade hemolítica

As amostras do extrato de *U. lactuca* diluída em água destilada com concentrações 45,0 mg/mL e 56,25 mg/mL apresentaram mais de 30% de lise dos eritrócitos de pacus juvenis. As concentrações 9,375 mg/mL e 11,25 mg/mL apresentaram porcentagem de lise próximas ao obtido pelo PBS (controle negativo). A concentração de 112,5 mg/mL apresentou uma porcentagem de lise superior à 100%, que foi o valor obtido pelo Triton X (controle positivo).

Figura 3. Citotoxicidade por hemólise do extrato de *Ulva lactuca* em comparação com PBS e Triton X como controles negativo e positivo, respectivamente, $p < 0.05$.



3.3 Susceptibilidade *in vitro* de bactérias patogênicas de peixes ao extrato de *Ulva lactuca*

O extrato de *U. lactuca* demonstrou atividade bactericida para *F. oreochromis*, uma das mais importantes bactérias da aquicultura mundial e atividade bacteriostática para *A. hydrophila*, *S. agalactiae* (sorotipo II e III), *E. faecalis*, *C. freundii*, *L. lactis* e *garvieae*, *E. tarda* e *Pseudomonas* spp. (Tabela 4). As CIMs e CBMs da *E. coli* para o florfenicol (FFC) indicaram os valores esperados, comprovando que a análise respeitou os procedimentos operacionais estabelecidos pelo CLSI.

Tabela 3: Atividade antimicrobiana do extrato de *U. lactuca* contra 12 cepas bacterianas de interesse na piscicultura e do florfenicol contra *Escherichia coli* como controle de qualidade da técnica

Cepas	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>A. hydrophila</i>	37.500	> 37.500
<i>A. veronii</i>	> 37.500	> 37.500
<i>A. jandaei</i>	9.375	> 37.500
<i>S. agalactiae</i> sorotipo II	9.375	> 37.500
<i>S. agalactiae</i> sorotipo III	4.687	> 37.500
<i>E. faecalis</i>	18.750	> 37.500
<i>C. freundii</i>	18.750	> 37.500
<i>L. lactis</i>	9.375	> 37.500
<i>L. garvieae</i>	9.375	> 37.500
<i>E. tarda</i>	9.375	> 37.500
<i>Pseudomonas</i> spp.	9.375	> 37.500
<i>F. oreochromis</i>	9.375	9.375
<i>E. coli</i> (controle de qualidade com FFC)	0,008	>0.064

4. Discussão

Em todo o mundo, há uma emergência por novas moléculas com atividade bactericida como alternativa aos antimicrobianos para uso na aquicultura, pela ocorrência de resistência bacteriana aos principais produtos aprovados, causados principalmente pelo uso inadequado dessas moléculas pelos piscicultores (ASSANE et al., 2021; SOUSA et al., 2021).

Na piscicultura brasileira, surtos de bacterioses são comuns quando há um desequilíbrio fisiológico, causado por atividades de rotina como manejo, transporte, vacinação, alimentação inadequada e qualidade de água inadequada. Na tentativa de conter esses surtos, antimicrobianos são utilizados, muitas vezes sem um diagnóstico apropriado da doença e sem respeitar a dose recomendada pelo fabricante, aumentando os riscos de resistência bacteriana e do acúmulo de resíduos na carne do pescado.

Dentre os surtos que mais acometem os peixes, principalmente alevinos e juvenis está a columnariose, causada pela *F. oreochromis*, uma bactéria emergente na aquicultura mundial e principalmente no Brasil. Estudo demonstrou que uma nova cepa desta bactéria circula no país, tendo similaridade genética com cepas da Tailândia, sendo altamente virulenta tanto para tilápia-do-Nilo quanto para peixes

nativos e que ela foi resistente a um dos antimicrobianos mais utilizados na aquicultura (*off label*), como a enrofloxacin (FERREIRA et al., 2022).

Desta forma, o uso de novas substâncias, como óleos essenciais, extratos de plantas e de algas tem sido tem estimulado na piscicultura, pois são seguros para os animais, não causam efeitos colaterais, tem poucas possibilidades de causar resistência e não deixam resíduos na carne do pescado (ASSANE; VALLADÃO; PILARSKI, 2021; ČMIKOVÁ et al., 2022; KAČÁNIOVÁ et al., 2017; LIU et al., 2020; MOAWAD et al., 2022; SOUZA et al., 2019; VITTHAL WAGHMODE et al., 2021).

A produção sustentável de biomassa de algas marinhas durante o ano todo é facilitada pela baixa exigência de insumos, não depende de terra arável, água doce ou fertilizantes. As algas possuem em média 50% de carboidratos na matéria seca, de 1 a 3% de lipídeos, 7 a 38% de minerais e de 10 a 47% de proteínas, com maior proporção de aminoácidos essenciais. São importante fonte de minerais, como Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn. A composição de nutrientes pode ser distinta em algas extraídas de diferentes regiões. Podem ser empregadas no monitoramento da poluição aquática, especialmente em regiões com alta industrialização, devido à afinidade por metais pesados, permitindo também a remoção de forma sustentável destes metais (ČMIKOVÁ et al., 2022). O extrato utilizado no presente estudo possui pouco mais de 5% de proteínas totais e 56% de glicídios totais, teores que provavelmente foram influenciados pela extração. Dentre os minerais avaliados neste mesmo extrato, os mais notáveis foram magnésio, enxofre, boro e manganês.

Vijayabaskar et al. (2012), estudaram a alga marrom *Sargassum swartzii*, cuja composição era rica em carboidratos e sulfatos, semelhante ao extrato utilizando neste presente estudo, e verificaram que os polissacarídeos sulfatados apresentavam atividade antioxidante e antibacteriana contra uma cepa patogênica de *Escherichia coli*.

Posteriormente, Sayin et al. (2016) avaliaram a atividade antibacteriana e de inibição do biofilme de dois compostos de boro, o ácido bórico (AB) e o octaborato dissódico tetra hidratado (ODT) contra *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri* e *Lactococcus garviea*. O AB nas concentrações entre 0,77 e 3,09 mg/ml foi bactericida contra *A. hydrophila*, *B. melitensis*, *B. abortus* e *Y. ruckeri* e

bacteriostático contra as demais. O ODT nas concentrações entre 0,644 e 10,312 mg/mL foi bactericida contra *V. anguillarum* e bacteriostático contra as demais. Ainda não se sabe exatamente qual é o mecanismo de ação destes compostos de boro, o que se acredita é que o boro prejudica a síntese proteica e a atividade de algumas enzimas importantes no metabolismo bacteriano.

Dong et al. (2017) verificaram que a associação do manganês com a luteolina potencializou a atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* e *P. aeruginosa*. A luteolina é um glicosídeo flavonoide encontrada em plantas com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antidiabéticas e antimicrobianas.

Aminoácidos não proteicos de origem natural ou sintéticos são focos de estudos de novas moléculas com potencial antibacteriano, antifúngico e antiprotozoário, que são microrganismos com representantes apresentando multirresistência às moléculas comercializadas. A atividade antimicrobiana ocorre principalmente na atuação de enzimas envolvidas na síntese de peptídeoglicano, que compõe a parede celular das bactérias. Esta atividade é comprometida pela baixa absorção dos aminoácidos pela parede celular, exigindo um veículo mais lipofílico ou associação com nano-carregadores (NOWAK; SKWARECKI; MILEWSKA, 2021). Embora a porcentagem de aminoácidos no extrato utilizado neste estudo seja relativamente baixa, a presença do ácido glutâmico em associação com os demais nutrientes pode ter influenciado nos resultados obtidos.

Nair et al. (2023) estudaram biopolímeros compostos por ácido glutâmico, sintetizados por microrganismos, que possuem propriedades de interesse industrial. Na medicina, os biopolímeros são aplicados na regeneração de ossos e cartilagens, na fabricação de medicamentos como veículos de outras moléculas, desenvolvimento de vacinas, tratamentos odontológicos e de artrite reumatoide e curativos pós cirúrgicos e lesões. Também exercem funções de biofertilizantes e superabsorventes de água, permitindo o uso na agricultura. Também podem ser empregados no tratamento de águas residuais, por sequestrar metais e agir como biofloculante. São aplicáveis nas indústrias cosmética (fabricação de cremes e enxaguante bucal) e alimentícia (fabricação de embalagens, agente aromatizante e espessante).

O extrato de *Ulva lactuca* utilizado neste estudo demonstrou atividade bactericida para a *F. oreochromis* e atividade bacteriostática para o restante das cepas testadas. Este resultado é muito promissor, pois torna-se uma excelente alternativa de uso na piscicultura brasileira, uma vez que as algas existem em quase todos os ecossistemas do mundo, pois tem a capacidade de sobreviver em condições extremas e em ambientes competitivos, o que facilita sua produção e utilização (BHOWMICK et al., 2020). O fato de o extrato ter atividade bacteriostática para quase todas as bactérias testadas, com exceção da *Aeromonas veronii* é muito importante para o setor produtivo, pois permite que o sistema imunológico dos peixes consiga combater e eliminar a bactéria, aumentando a chance de sobrevivência a uma infecção.

O extrato de algas verdes já é mundialmente reconhecido por suas propriedades nutricionais e antibacterianas, pois possui moléculas bioativas como pigmentos, ácidos graxos, polifenóis (florotaninos, flavonóis, bromofenóis e catequinas), polissacarídeos, proteínas e peptídeos, além de ter um custo razoavelmente acessível (BENSY et al., 2022).

Nos últimos anos, o número de estudos investigando a atividade antibacteriana de vários extratos de algas ou seus metabólitos aumentou. Esse é o primeiro estudo realizado no Brasil da susceptibilidade *in vitro* de bactérias patogênicas de peixes ao extrato de *Ulva lactuca*, com resultados positivos contra *F. oreochromis*. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura para outras bactérias. Os polissacarídeos isolados da *U. lactuca* mostraram atividade *in vitro* contra o vírus da influenza, tanto de aves quanto de humanos (IVANOVA et al., 1994). Outro estudo revelou que heteropolissacarídeos isolados desta alga foram capazes de estimular macrófagos e células T de camundongos (EL SAYED et al., 2011). Em estudo prévio (BENSY et al., 2022) realizado *in vitro* contra bactérias patogênicas para humanos, foi observado que o extrato de *U. lactuca* mostrou atividade contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus* e que o extrato tem potencial para tratar várias infecções bacterianas por sua excelente atividade antimicrobiana. O polissacarídeo sulfatado (ulvana) extraído da *U. lactuca* foi utilizado para fabricar um enxaguante bucal e testado *in vitro* contra as bactérias responsáveis por doenças periodontais. A atividade antimicrobiana do enxaguante bucal foi tão eficaz quanto os antimicrobianos convencionais contra *Lactobacillus* spp., *Candida albicans* e superior para *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*,

demonstrando que a biomassa de algas pode ser uma excelente alternativa aos antimicrobianos orais (VIKNESHAN et al., 2020).

Recentemente, El-Sayed; El-Sheekh; Makhlof, (2023) verificaram que 2,5mg/mL do extrato metanoico da *U. lactuca* pode apresentar sinergismo com 4µg/ml de gentamicina contra *Klebsiella pneumoniae*. É possível que se o extrato deste presente estudo tivesse passado por um processamento semelhante e viesse da mesma origem, as bactérias que tiveram atividade bacteriostática poderiam apresentar um resultado semelhante ao obtido contra *F. oreochromis*.

Produtos de origem natural também podem apresentar toxicidade dependendo da concentração utilizada e das espécies estudadas, tanto humanos quanto peixes. Alguns óleos essenciais, por exemplo, com concentrações acima de 33 µg/mL podem ser tóxicos para eritrócitos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) juvenis (ASSANE; VALLADÃO; PILARSKI, 2021). Vale observar que a concentração mínima bactericida para *F. oreochromis* apresentou uma toxicidade equivalente ao tampão fosfato (PBS), demonstrando que é uma concentração segura para pacus juvenis.

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo são promissores para uso na aquicultura brasileira, uma vez que o extrato de *U. lactuca* apresentou atividade bactericida para *F. oreochromis* e bacteriostática para as bactérias testadas, todas muito importantes para a aquicultura mundial. A estrutura da parede celular ou o metabolismo da *F. oreochromis* pode ser mais sensível aos componentes do extrato, mas ainda são necessários estudos que façam essas comparações.

5. Conclusão

A atividade antibacteriana do extrato de *U. lactuca* contra *F. oreochromis* e bacteriostática contra as mais importantes bactérias causadoras de epizootias demonstra seu potencial para prevenção e controle de doenças bacterianas na aquicultura.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) [concessão 001], ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (concessão número 301508/2019)

e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo nº 2018/24499-8) pelo aporte financeiro ao projeto de pesquisa.

Referências bibliográficas

ASHOUR, M. 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**, v. 32, p. 3467–3479, 2020.

ASSANE, I. M. et al. Cytotoxicity and antimicrobial activity of synthetic peptides alone or in combination with conventional antimicrobials against fish pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 4, p. 1762–1774, 1 out. 2021.

ASSANE, I. M.; VALLADÃO, G. M. R.; PILARSKI, F. Chemical composition, cytotoxicity and antimicrobial activity of selected plant-derived essential oils against fish pathogens. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 2, p. 793–809, 1 fev. 2021.

BENSY, A. D. V. et al. Green synthesis of iron nanoparticles from *Ulva lactuca* and bactericidal activity against enteropathogens. **Journal of King Saud University - Science**, v. 34, n. 3, 1 abr. 2022.

BHOWMICK, S. et al. Algal metabolites: An inevitable substitute for antibiotics. **Biotechnology Advances**, v. 43, 1 nov. 2020.

ČMIKOVÁ, N. et al. Determination of antioxidant, antimicrobial activity, heavy metals and elements content of seaweed extracts. **Plants**, v. 11, n. 11, 1 jun. 2022.

DONG, H. et al. Enhanced antioxidant activity, antibacterial activity and hypoglycemic effect of luteolin by complexation with manganese (II) and its inhibition kinetics on xanthine oxidase. **RSC Advances**, v. 7, n. 84, p. 53385–53395, 2017.

EL SAYED, H. et al. Studies on the constituents of the green alga *Ulva lactuca*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 3, p. 335–338, 2011.

EL-SAYED, H. S. et al. Ocean acidification induced changes in *Ulva fasciata* biochemistry may improve *Dicentrarchus labrax* aquaculture via enhanced antimicrobial activity. **Aquaculture**, v. 560, 15 nov. 2022.

EL-SAYED, A. I. M.; EL-SHEEKH, M. M.; MAKHLOF, M. E. M. Synergistic antibacterial effects of *Ulva lactuca* methanolic extract alone and in combination with different antibiotics on multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1, 1 dez. 2023.

FERREIRA, D. DE A. R. et al. Morpho-molecular identification, pathogenicity for *Piaractus mesopotamicus*, and antimicrobial susceptibility of a virulent *Flavobacterium columnare* isolated from Nile tilapia cultured in Brazil. **Aquaculture**, p. 738486, jun. 2022.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta. Em: **Circular Técnica**. 63. ed. Corumbá: Embrapa, 2006. p. 1–9.

IVANOVA, V. et al. Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*. **Preparative Biochemistry**, v. 24, n. 2, p. 83–97, 1 maio 1994.

- KAČÁNIOVÁ, M. et al. The antioxidant and antimicrobial activity of essential oils against *Pseudomonas* spp. isolated from fish. **Saudi Pharmaceutical Journal**. Elsevier B.V., 1 dez. 2017.
- KLONGKLAEW, N. et al. Chemical composition of a hot water crude extract (HWCE) from *Ulva intestinalis* and its potential effects on growth performance, immune responses, and resistance to white spot syndrome virus and yellowhead virus in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 112, p. 8–22, 1 maio 2021.
- LIU, H. et al. Antimicrobial activity and virulence attenuation of citral against the fish pathogen *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture**, v. 515, 15 jan. 2020.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas; princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafos, 1989.
- MOAWAD, M. N. et al. Chemical characterization and biochemical activity of polysaccharides isolated from Egyptian *Ulva fasciata* Delile. **Oceanologia**, v. 64, n. 1, p. 117–130, 1 jan. 2022.
- NAIR, P.; NAVALE, G. R.; DHARNE, M. S. Poly-gamma-glutamic acid biopolymer: a sleeping giant with diverse applications and unique opportunities for commercialization. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, p. 4555–4573, 2023.
- NOWAK, M. G.; SKWARECKI, A. S.; MILEWSKA, M. J. Amino acid based antimicrobial agents – synthesis and properties. **ChemMedChem**. John Wiley and Sons Ltd, 6 dez. 2021.
- ROUHANI, E. et al. Effect of dietary administration of green macroalgae (*Ulva intestinalis*) on mucosal and systemic immune parameters, antioxidant defense, and related gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquaculture Nutrition**, v. 2022, 2022.
- SAYIN, Z.; UCAN, U. S.; SAKMANOGLU, A. Antibacterial and antibiofilm effects of boron on different bacteria. **Biological Trace Element Research**, v. 173, n. 1, p. 241–246, 1 set. 2016.
- SOUZA, M. F. C. et al. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de óleos essenciais contra patógenos de peixes. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 17911–17921, 2019.
- VIJAYABASKAR, P.; VASEELA, N.; THIRUMARAN, G. Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 6, p. 421–428, 2012.
- VIKNESHAN, M. et al. Algal biomass as a source for novel oral nano-antimicrobial agent. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 12, p. 3753–3758, 1 dez. 2020.
- VITTHAL WAGHMODE, A. et al. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity of some common seaweed along west coast of Maharashtra. **Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries**, v. 25, n. 6, p. 129–143, 2021.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report. Geneva. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240027336>>. Acesso em: 23 set. 2023.

**CAPÍTULO II: Avaliação dos parâmetros bioquímicos e da resposta
inflamatória induzida por *Flavobacterium oreochromis* inativada em *Piaractus
mesopotamicus* alimentado com dieta suplementada com extrato de *Ulva
lactuca***

Andre Vale-Oliveira¹, Inácio Mateus Assane^{1,2}, Daiane Vaneci-Silva¹, Elielma Lima de Souza³, Camila Carlino da Costa³, Jesaias Ismael da Costa⁵, Geovana Dotta⁴, Fabiana Pilarski^{1,3*}

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Jaboticabal. Centro de Aquicultura (CAUNESP), Jaboticabal, SP, Brasil;

² Universidade de Zambeze (UniZambeze), Escola de Ciências da Agricultura, Zambeze, Moçambique;

³ Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Jaboticabal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Jaboticabal, SP, Brasil;

⁴ Universidade Federal da Bahia (UFBA). Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, BA, Brasil.

⁵ Instituto Federal do Amazonas (IFAM). Campus Presidente, Presidente Figueiredo, AM, Brasil.

*Autor correspondente: Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, Brasil. E-mail:

fabiana.pilarski@unesp.br.

Resumo

Este trabalho avaliou o efeito do uso do extrato de *U. lactuca* nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, assim como a resposta celular à inflamação induzida na bexiga natatória por *F. oreochromis* em uma espécie nativa, em diferentes tempos de coleta. O extrato foi adicionado em ração comercial, separando quatro tratamentos: 10g/kg (extrato / ração), 20g/kg, 30g/kg e controle (ração não suplementada). Os materiais foram coletados em seis tempos: 0H – antes da indução, 3H – três horas após indução da inflamação, 6H, 12H, 24H e 48H. Dos componentes celulares presentes no sangue e no infiltrado inflamatório, apenas os trombócitos apresentaram diferenças significativas, principalmente nos peixes alimentados com 20g/kg de *U. lactuca*. As alterações histológicas são condizentes com quadros hemorrágicos e de inflamação. Nas análises bioquímicas, fosfatase alcalina, colesterol, triglicérides e

albumina apresentaram interações entre tempo pós indução e tratamentos. De modo geral, a inclusão da macroalga não impacta de forma negativa na saúde do animal, mas o estudo carece de mais dados para comprovar a influência da macroalga na resposta inflamatória dos pacus.

Palavras-chave: alga, columnariose, inflamação, pacu.

1. Introdução

Em um cenário em que a demanda por proteína de origem animal aumenta, exigindo a intensificação da produção, a imunidade dos animais se torna alvo de estudo para diferentes grupos de pesquisadores. Com peixes nativos brasileiros não é diferente, pois ainda é necessário entender o funcionamento dos mecanismos envolvidos na resposta do sistema imune no combate à um agente agressor (MATTOS et al., 2021) e o pacu pode ser um bom modelo de estudo da resposta inflamatória (MANRIQUE et al., 2017).

O processo inflamatório é uma das principais ferramentas do sistema imune inato, pois recruta células da circulação sanguínea, como os monócitos/macrófagos, linfócitos, células granulocíticas especiais (CGE) e leucócitos polimorfonucleares que foram produzidas pela porção cranial do rim, timo ou baço e estão envolvidos na resposta imune. Além dos componentes celulares, componentes proteicos também participam do combate ao patógeno, como lisozima, peptídeos antimicrobianos, lectinas, imunoglobulinas e as proteínas do sistema complemento. Outro importante órgão linfóide é o fígado, que produz proteínas do sistema complemento e proteínas da fase aguda da inflamação (MATTOS et al., 2021).

Aditivos funcionais são ingredientes não nutritivos incluídos na formulação da ração que podem potencializar a saúde dos animais alimentados através da ativação direta do sistema imune ou através da microbiota intestinal, melhorando a atividade fagocitária, ativação de macrófagos, ativação do sistema complemento, atividade da lisozima e o recrutamento leucocitário (RODRÍGUEZ-ESTRADA; RANZANI-PAIVA, 2019).

Polissacarídeos derivados de macroalgas, como a ulvana presente em espécies do gênero *Ulva* spp., apresentam um potencial nutracêutico interessante, especialmente como imunomodulador. Ponce et al. (PONCE et al., 2020) verificaram que a ulvana pode melhorar a expressão de genes relacionados com a defesa

antibacteriana e antiviral, expressão de proteínas do sistema complemento e proteínas de fase aguda e reduzir a mortalidade de juvenis de linguado do Senegal (*Solea senegalensis*) após desafio com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

A composição química de espécies do gênero *Ulva* spp. pode variar, entretanto, o potencial deste gênero em melhorar a resposta imune não é afetado. Metabólitos secundários presentes neste gênero, como os carotenóides, podem aumentar a resistência à patógenos. O fornecimento de diferentes concentrações do extrato de diferentes espécies de *Ulva* spp. alterar os parâmetros hematológicos e bioquímicos, que são ferramentas utilizadas para monitorar a saúde dos peixes (PRATIWI; PRATIWI, 2022).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso do extrato de *U. lactuca* nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, assim como a resposta celular à inflamação induzida na bexiga natatória por *F. oreochromis* em uma espécie nativa, em diferentes tempos de coleta.

2. Materiais e métodos

2.1 Obtenção do extrato

O extrato foi obtido do litoral da China e processado pela empresa FocusHerb Corp®. As macroalgas coletadas foram recebidas como matéria prima na empresa, onde passaram por inspeção e lavagem com água destilada. Após a lavagem, a matéria prima bruta foi macerada e em seguida diluída com água destilada. A mistura foi centrifugada e o precipitado filtrado. O extrato ainda úmido foi seco por spray e o produto foi peneirado em malha fina para que partes maiores não fossem para a embalagem, facilitando a utilização do produto. O resultado foi um extrato em pó solúvel em água.

Antes do extrato seguir para o envase, foram realizadas análises laboratoriais para certificação da qualidade e comprovaram que o extrato atende os padrões físicos, químicos e não apresenta contaminação por fungos e bactérias.

Uma amostra de 36g gramas do extrato foi enviada para análise de sua composição no Laboratório C.B.O. Análises Laboratoriais Ltda (Campinas, SP). Os glicídios foram os componentes principais do extrato (56,42%) juntamente com a glicose total (56,42%). Os valores são descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Composição bromatológica do extrato de *Ulva lactuca*.

Ensaio	Resultado (em %)	Ensaio	Resultado (em%)
Ác. Aspartico	0,1	Leucina	0,04
Ác. Glutâmico	0,25	Fenilalanina	0,03
Serina	0,03	Lisina	0,03
Glicina	0,07	Triptofano	0,04
Histidina	0,04	Hidroxiprolina	< 0,01
Taurina	< 0,01	Aminoácidos Totais	0,88
Arginina	0,02	Fucose	< 0,01
Treonina	0,02	Arabinose	< 0,01
Alanina	0,07	Ramnose	< 0,01
Prolina	0,06	Galactose total	< 0,01
Tirosina	< 0,01	Glicose total	56,42
Valina	< 0,01	Xilose	< 0,01
Metionina	< 0, 01	Manose	< 0,01
Cistina	< 0,01	Glicídios totais	56,42
Isoleucina	0,02	Proteínas totais	5,92

Outra amostra da alga foi enviada ao Laboratório de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas – LAFEN da Unesp, Campus de Registro, para determinação dos micronutrientes (B; Cu; Fe; Mn e Zn) e macronutrientes (N; P: K; Ca; Mg e S). O nitrogênio foi determinado pelo método Kjeldahl (GALVANI; GAERTNER, 2006), o fósforo por colorimetria, o enxofre por turbidimetria do sulfato de bário, o boro por Azometina-H e o potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e o zinco em espectrofotômetro de absorção atômica, após digestão nítrico-perclórica de acordo com metodologia de Malavolta; Vitti; Oliveira (1997). Os resultados foram expressos em teores de g do elemento por kg de biomassa seca do extrato (g.kg-1).

Tabela 2. Composição de macro e micronutrientes do extrato de *Ulva lactuca*

Nutrientes minerais	Extrato solúvel de <i>U. lactuca</i>	Desvio padrão
Nitrogênio (g/kg)	8	1.2
Fósforo (g/kg)	0.6	0.09
Potássio (g/kg)	4	0.6
Cálcio (g/kg)	8	1.185
Magnésio (g/kg)	10	1.5
Enxofre (g/kg)	18.0	2.7
Boro (mg/kg)	31	4.65
Cobre (mg/kg)	6.8	1.02
Ferro (g/kg)	0.539	0.08
Manganês (mg/kg)	17	2.475
Zinco (mg/kg)	9.8	1.47

2.2 Obtenção dos peixes, delineamento e preparo das dietas experimentais

Os juvenis de pacus (n=192) foram obtidos do Laboratório de Reprodução de Peixes do Centro de Aquicultura da UNESP após aprovação do CEUA (1172/21), atendendo as normas do CONCEA. Foram aclimatados em caixas de 120L em sistema aberto e alimentados com ração comercial até atingirem aproximadamente 130g.

Foram utilizadas 16 caixas contendo 12 peixes compondo quatro grupos experimentais com quatro repetições: T1= 10g do extrato de *Ulva lactuca* por kg de ração, T2= 20g extrato por kg de ração, T3=30g do extrato por kg de ração, CTRL= controle (apenas ração comercial). O extrato foi adicionado à ração com a utilização de carboximetilcelulose (20mL por kg de ração), misturado manualmente em uma bandeja de plástico, armazenada em sacos plásticos e acondicionadas sob refrigeração. As porções diárias eram distribuídas em potes plásticos diariamente e fornecidas três vezes ao dia durante 30 dias.

Após o período de alimentação, as coletas ocorreram em seis tempos: zero horas (0H), três horas após indução da inflamação (3H), seis horas após indução (6H), 12 horas após indução (12H), 24 horas após a indução (24H) e 48 horas após a indução (48H). A indução da inflamação ocorreu logo após a coleta no tempo T0.

2.4 Obtenção da cepa e preparo do inóculo

Para a indução da inflamação na bexiga natatória, foi utilizada uma cepa de *Flavobacterium oreochromis* isolada de um surto em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) que apresentavam sinais clínicos sugestivos de columnariose, diagnosticado positivamente após análise microbiológica e molecular e armazenadas no banco de cepas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos, do Centro de Aquicultura da UNESP e que após estudo de Ferreira et al. (2022), concluíram que esta cepa é patogênica para *Piaractus mesopotamicus*.

A cepa foi cultivada em caldo Shieh adaptado para crescimento de *F. columnare* e incubada por 48h à 28°C. O meio foi depositado em tubos de 50mL com tampa para centrifugação refrigerada, separando as colônias do meio de cultura, suspendendo o decantado com PBS estéril. O inóculo foi ajustado à 1×10^9 UFC/mL e

inativado por calor (56°C por 30 minutos). A solução de azul de Evans foi adicionada ao final do processo para facilitar o procedimento da coleta do exsudato.

2.5 Indução da inflamação, coleta de sangue, exsudato e órgãos para histologia

A coleta de sangue para análise hematológica e para obtenção de soro ocorreu por punção do vaso caudal, com auxílio de agulhas e seringas estéreis, após sedação dos peixes em solução alcóolica de benzocaína.

O processo inflamatório foi induzido pela inoculação de 1mL do inóculo diretamente na bexiga natatória de 160 peixes após a primeira coleta (0H), posicionando sobre a linha lateral entre 1 e 1,5cm do opérculo, como o animal anestesiado. Após a inoculação, os peixes foram devolvidos para suas respectivas caixas e retirados para a coleta de sangue e órgãos para histologia nos tempos pré-determinados.

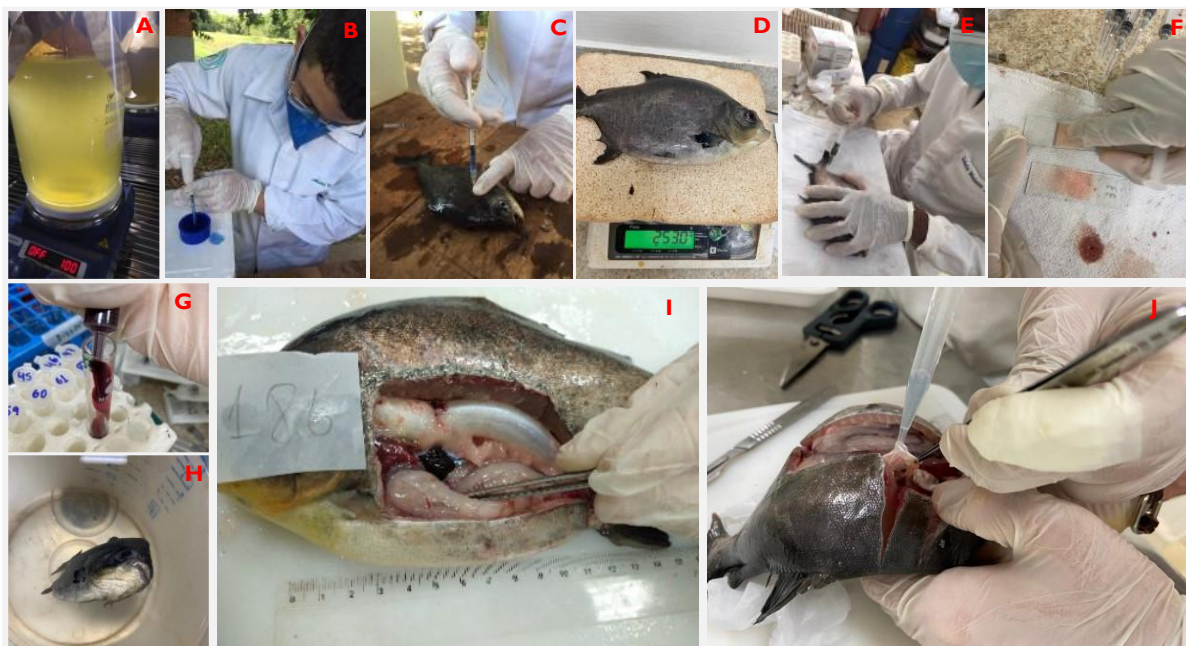


Figura 1. Etapas da coleta. A) *Flavobacterium oreochromis* cultivada em meio líquido, utilizado para o preparo do inóculo; B) inóculo pronto e corado com azul de Evans; C) inoculação do inóculo na bexiga natatória; D) biometria dos pacus; E) coleta do sangue por punção do vaso caudal; F) preparo da extensão sanguínea; G) alíquotas de sangue para análises hematológicas; H) eutanásia dos pacus para coleta de exsudato e órgãos; I) abertura da janela na musculatura para exposição da bexiga natatória e vísceras; J) coleta do exsudato.

Após a coleta de sangue dos peixes nos tempos 0H, 3H, 6H, 12H, 24h e 48H; os peixes foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico, em benzocaína, para exposição da bexiga natatória e coleta do baço, fígado, rim cranial,

exsudato da bexiga e da própria bexiga. Os órgãos foram depositados em solução de formol tamponado à 10% por no mínimo 24 horas e depois transferido para o álcool 70°.

Após a exposição da bexiga natatória, foi realizado um acesso com auxílio de uma tesoura de ponta fina para lavagem da bexiga natatória com 0,5mL da solução de PBS + 0,01 mL de EDTA 5%. Com o auxílio de pipetas Pasteur, todo o conteúdo da bexiga natatória foi retirado e depositado em tubos plásticos de 15mL e mantidos sob refrigeração constante.

Duas alíquotas de 10µL do conteúdo retirado da bexiga natatória, homogeneizado, preencheram uma câmara de Neubauer para contagem total de células inflamatórias de forma manual. O restante foi centrifugado e o precipitado foi utilizado para confecção da extensão das lâminas para contagem diferencial das células inflamatórias. Todas as lâminas, de sangue e exsudato, foram coradas com MGGW, seguindo metodologia descrita por Ranzani-Paiva et al. (2013).

3. Resultados

Nas contagens totais e diferenciais das extensões sanguíneas, apenas os trombócitos apresentaram interação entre tempos da coleta, após indução da inflamação, e concentrações dos extratos nas dietas experimentais. Resultado semelhante na contagem diferencial de células inflamatórias no exsudato, na qual houve diferença significativa apenas pelo tempo. Os índices hematimétricos e demais tipos celulares no sangue e exsudato não apresentaram diferenças significativas. No sangue, os trombócitos aumentaram em peixes alimentados com 20g/kg do extrato três horas após a indução da inflamação, reduzindo nos tempos seguintes de forma discreta até a coleta 24 horas após a indução, quando apresentou o menor valor entre os demais tratamentos. No exsudato, os trombócitos apresentaram um aumento discreto nos animais alimentados com o extrato após 12 horas da indução, com os maiores valores sendo obtidos nos peixes alimentados com 20g/kg do extrato nos tempos 24H e 48H.

Nas análises bioquímicas, fosfatase alcalina, colesterol, triglicérides e albumina apresentaram interações entre tempo pós indução e tratamentos, entretanto, nas

análises imunológicas, a atividade respiratória dos leucócitos, proteínas totais e creatinina não apresentaram diferenças significativas.

A alteração mais encontrada nos cortes histológicos de baço, fígado e rim foi a presença e concentração de hemossiderina, principalmente próximo a vasos sanguíneos. Alguns peixes apresentaram hemorragia dentro da bexiga natatória, resultante da inativação incompleta da bactéria, a qual apresentou resistência ao calor. (fato descoberto durante a coleta). Um dos peixes, identificado como 186, apresentou sinais mais agudos da infecção, e seus órgãos demonstraram maior concentração de hemossiderina no baço.

Tabela 3. Classificação das lesões histopatológicas identificadas em fragmentos de fígado, baço e intestino de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dieta suplementada com *Ulva lactuca* em diferentes concentrações após injeção de *Flavobacterium oreochromis* inativada na bexiga natatória nos tempos 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Dieta suplementada com *Ulva lactuca* (10g/kg) + aerocistite induzida por *F. oreochromis* inativada: T1 – 10g, Dieta suplementada com *U. lactuca* (20g/kg) + aerocistite induzida por *F. oreochromis* inativada: T2 – 20g, Dieta suplementada com *U. lactuca* (30g/kg) + inflamação induzida por *F. oreochromis* inativada: T3 – 30g, Não Suplementados (controle).

Tempo	Tratamento	Baço	Fígado	Rim
0 horas	T1 – 10g	Normal	Degeneração glicogênica (++)	Hemossiderina (+)
	T2 – 20g	Normal	Degeneração glicogênica (++) , hemossiderina (+)	Hemossiderina (+)
	T3 – 30g	Normal	Degeneração glicogênica (++)	Hemossiderina (+)
	controle	Normal	Degeneração glicogênica (++)	Hemossiderina (+)
3 horas	T1 – 10g	Normal	Degeneração glicogênica (++) , hemossiderina (+)	Normal
	T2 – 20g	Normal	Degeneração glicogênica (+) , hemossiderina (+)	Hemossiderina (+)
	T3 – 30g	Normal	Degeneração glicogênica (+) , hemossiderina (+)	Normal
6 horas	T1 – 10g	Hemossiderina (+++)	Degeneração glicogênica (+) , hemossiderina (+)	Normal
	T2 – 20g	Hemossiderina (+++), polpa vermelha > polpa branca	Degeneração glicogênica (+) , hemossiderina (++)	Hemossiderina (+)
	T3 – 30g	Hemossiderina (+)	Degeneração glicogênica (+) , hemossiderina (+)	Hemossiderina (+)
12 horas	T1 – 10g	Hemossiderina (+++), polpa vermelha >> polpa branca	Degeneração glicogênica (+) , hemossiderina (+)	Hemossiderina (+)
	T2 – 20g	Polpa vermelha > polpa branca	Degeneração glicogênica (+) , hemossiderina (+)	Hemossiderina (+)
	T3 – 30g	Normal	Degeneração glicogênica (+) , hemossiderina (+)	Hemossiderina (++) , redução do tecido hematopoiético

24 horas	T1 – 10g	Normal	Degeneração glicogênica (+), hemossiderina (+)	Hemossiderina (+)
	T2 – 20g	Normal	Degeneração glicogênica (+), hemossiderina (+)	Hemossiderina (+)
	T3 – 30g	Hemossiderina (+)	Degeneração glicogênica (+), hemossiderina (+)	Hemossiderina (+)
48 horas	T1 – 10g	Hemossiderina (+)	Degeneração glicogênica (+), hemossiderina (+)	Hemossiderina (+)
	T2 – 20g	Hemossiderina (+), polpa branca > poupa vermelha	Degeneração glicogênica (+), hemossiderina (+)	Hemossiderina (+)
	T3 – 30g	Hemossiderina (++)	Degeneração glicogênica (+), hemossiderina (+)	Hemossiderina (++)
	Peixe 186	Hemossiderina (++++)	Hemossiderina (+)	Hemossiderina (++)

Figura 2. Contagem total de trombócitos na extensão sanguínea de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dieta suplementada com *Ulva lactuca* em diferentes concentrações após injeção de *Flavobacterium oreochromis* inativada na bexiga natatória nos tempos 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Dieta suplementada com *Ulva lactuca* (10g/kg) + aerocistite induzida por *F. oreochromis* inativada; Dieta suplementada com *U. lactuca* (20mg/kg) + aerocistite induzida por *F. oreochromis* inativada; Dieta suplementada com *U. lactuca* (30mg/kg) + aerocistite induzida por *F. oreochromis* inativada; Não Suplementados (controle).

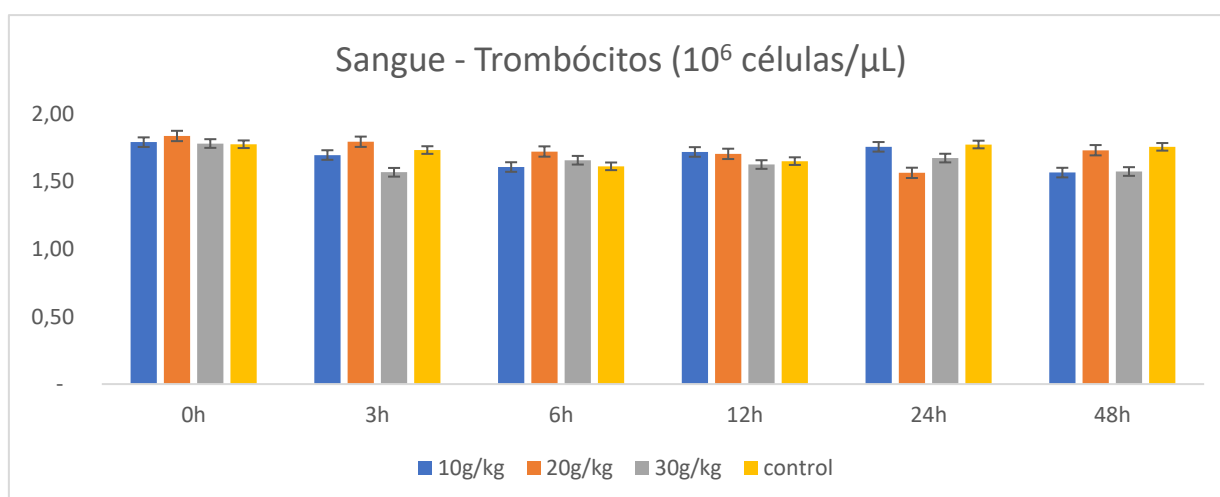


Figura 3. Contagem total de trombócitos na extensão de exsudato de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dieta suplementada com *Ulva lactuca* em diferentes concentrações após injeção de *Flavobacterium oreochromis* inativada na bexiga natatória nos tempos 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Dieta suplementada com *Ulva lactuca* (10g/kg) + aerocistite induzida por *F. oreochromis* inativada; Dieta suplementada com *U. lactuca* (20mg/kg) + inflamação induzida por *F. oreochromis* inativada; Dieta suplementada com *U. lactuca* (30mg/kg) + inflamação induzida por *F. oreochromis* inativada; Não Suplementados (controle).

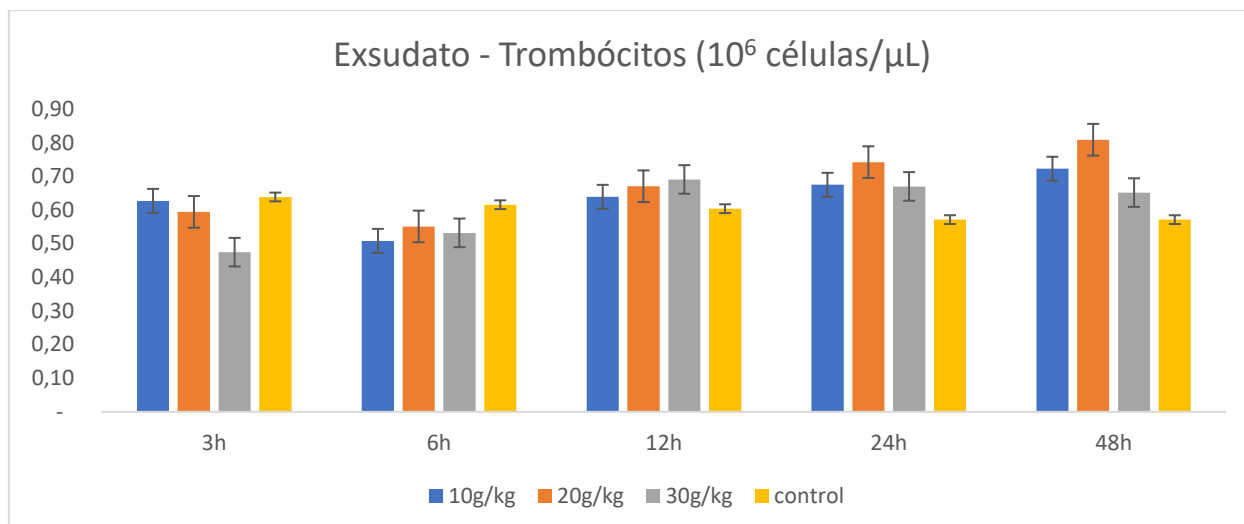


Figura 4. Quantificação da lisozima no soro de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dieta suplementada com *Ulva lactuca* em diferentes concentrações após injeção de *Flavobacterium oreochromis* inativada na bexiga natatória nos tempos 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Dieta suplementada com *Ulva lactuca* (10g/kg) + inflamação induzida por *F. oreochromis* inativada; Dieta suplementada com *U. lactuca* (20mg/kg) + inflamação induzida por *F. oreochromis* inativada; Dieta suplementada com *U. lactuca* (30mg/kg) + aerocistite induzida por *F. oreochromis* inativada; Não Suplementados (controle).

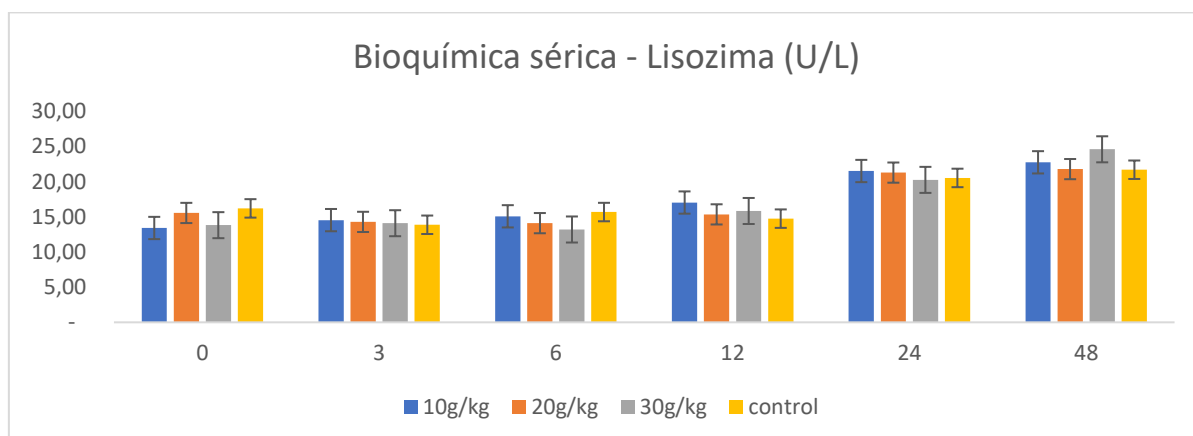


Figura 5. Quantificação da fosfatase alcalina no soro de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dieta suplementada com *Ulva lactuca* em diferentes concentrações após injeção de *Flavobacterium oreochromis* inativada na bexiga natatória nos tempos 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Dieta suplementada com *Ulva lactuca* (10g/kg) + inflamação induzida por *F. oreochromis* inativada; Dieta suplementada com *U. lactuca* (20mg/kg) + inflamação induzida por *F. oreochromis* inativada; Dieta suplementada com *U. lactuca* (30mg/kg) + inflamação induzida por *F. oreochromis* inativada; Não Suplementados (controle). Foi usada a comparação por ranks, pois os dados não foram normais nem após a transformação de BOXCOX.

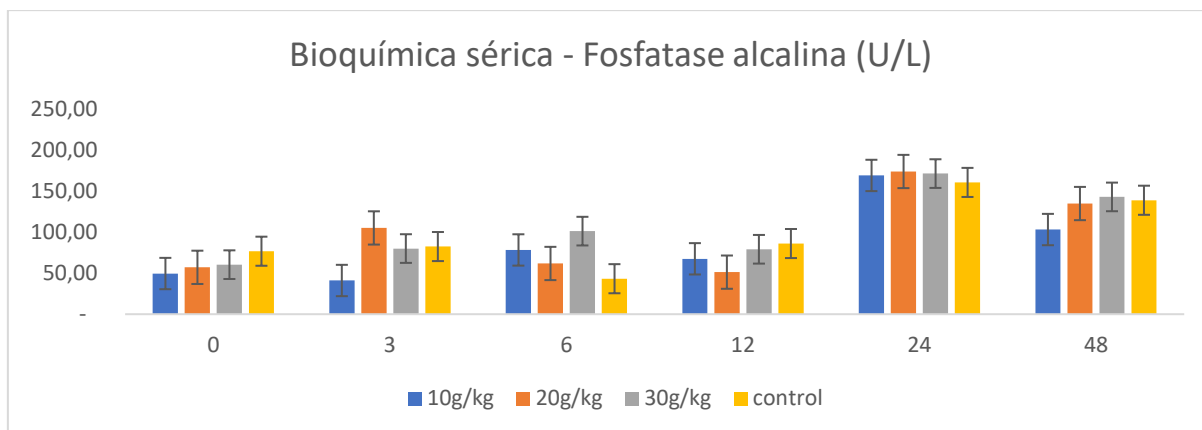


Figura 6. Quantificação do colesterol no soro de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dieta suplementada com *Ulva lactuca* em diferentes concentrações após injeção de *Flavobacterium oreochromis* inativada na bexiga natatória nos tempos 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Dieta suplementada com *Ulva lactuca* (10g/kg) + inflamação induzida por *F. oreochromis* inativada; Dieta suplementada com *U. lactuca* (20mg/kg) + inflamação induzida por *F. oreochromis* inativada; Dieta suplementada com *U. lactuca* (30mg/kg) + inflamação induzida por *F. oreochromis* inativada; Não Suplementados (controle). Foi usada a comparação por ranks, pois os dados não foram normais nem após a transformação de BOXCOX.

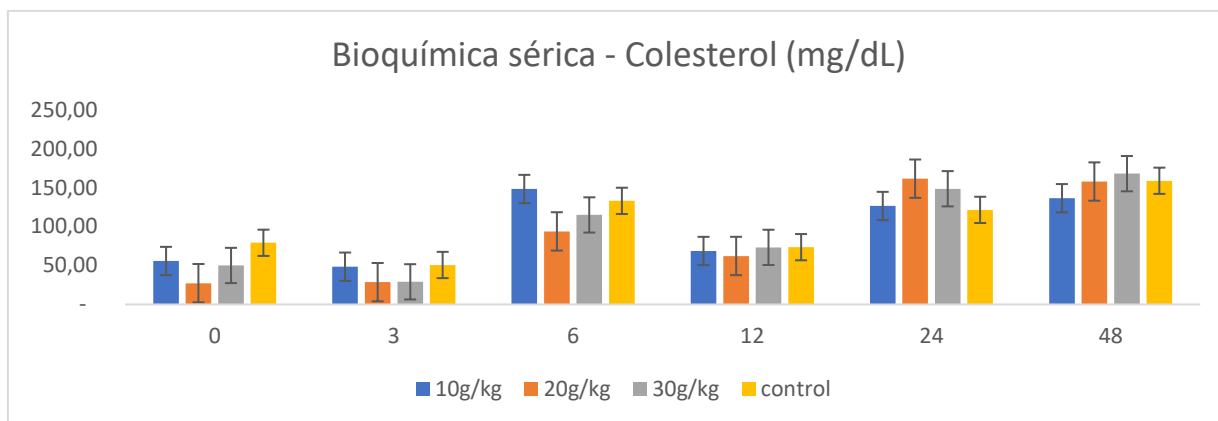


Figura 7. Quantificação de triglicérides no soro de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dieta suplementada com *Ulva lactuca* em diferentes concentrações após injeção de *Flavobacterium oreochromis* inativada na bexiga natatória nos tempos 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Dieta suplementada com *Ulva lactuca* (10g/kg) + inflamação induzida por *F. oreochromis* inativada; Dieta suplementada com *U. lactuca* (20mg/kg) + inflamação induzida por *F. oreochromis* inativada; Dieta suplementada com *U. lactuca* (30mg/kg) + a inflamação induzida por *F. oreochromis* inativada; Não Suplementados (controle). Foi usada a comparação por ranks, pois os dados não foram normais nem após a transformação de BOXCOX.

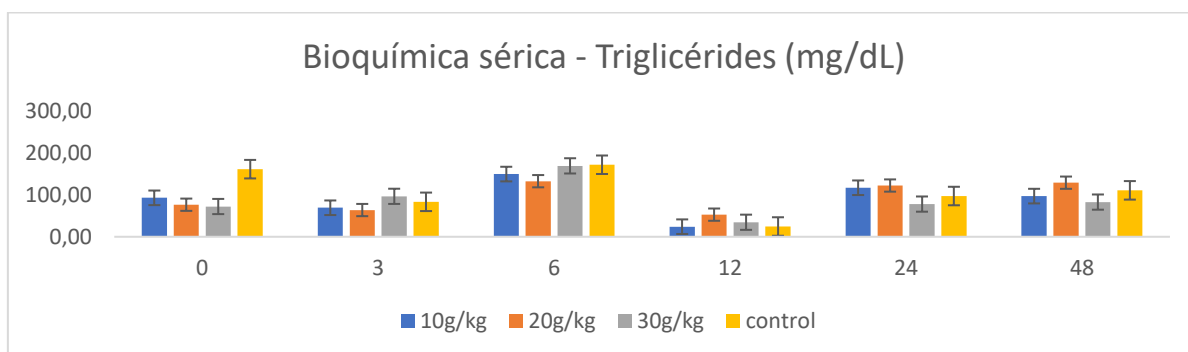
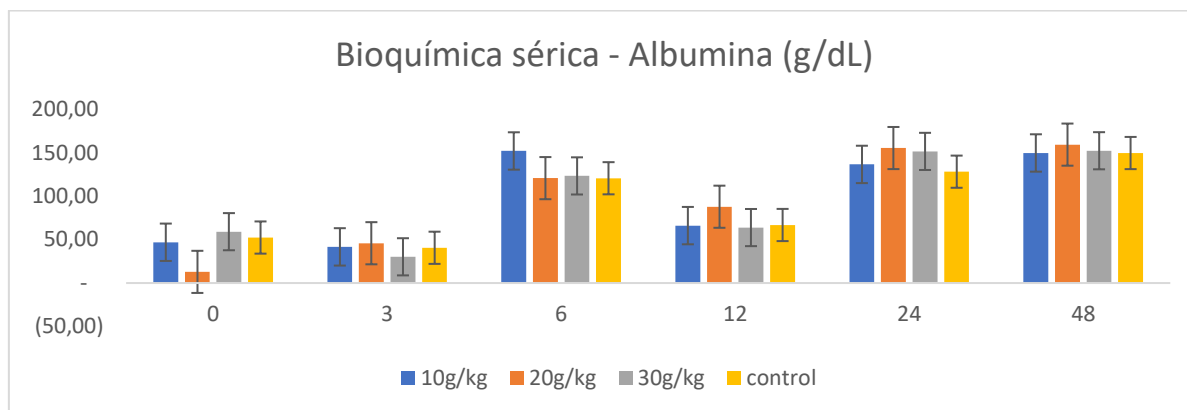


Figura 8. Quantificação da fosfatase alcalina no soro de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dieta suplementada com *Ulva lactuca* em diferentes concentrações após injeção de *Flavobacterium oreochromis* inativada na bexiga natatória nos tempos 3, 6, 12, 24 e 48 horas. Dieta suplementada com *Ulva lactuca* (10g/kg) + induzida por *F. oreochromis* inativada; Dieta suplementada com *U. lactuca* (20mg/kg) + induzida por *F. oreochromis* inativada; Dieta suplementada com *U. lactuca* (30mg/kg) + induzida por *F. oreochromis* inativada; Não Suplementados (controle). Foi usada a comparação por ranks, pois os dados não foram normais nem após a transformação de BOXCOX.



4. Discussão

A composição das plantas marinhas é influenciada pelo ambiente. A eutrofização do habitat pode aumentar o teor de proteínas devido a disponibilidade de nitrogênio dissolvido. A degradação ambiental altera a composição química das macroalgas e isso pode influenciar na resposta à doença dos vertebrados (BASTOS et al., 2022).

Tola; Fukada; Masumoto (2019) compararam dietas com formulações diferentes, uma com proteína de soja concentrada e outra com farinha de peixe. Verificaram que o ácido glutâmico pode aumentar a palatabilidade da dieta com proteína de soja concentrada. Embora não a palatabilidade da ração não tenha sido estudada no presente estudo, durante as alimentações foi observado que os peixes alimentados com a macroalga demonstraram um comportamento mais ativo na captura da ração, mas dados não foram coletados para comprovar que a concentração de ácido glutâmico no extrato de *Ulva lactuca* foi o responsável por esse comportamento.

Embora as concentrações de *Ulva lactuca* nas dietas influenciaram no número de trombócitos no sangue, a contagem total de eritrócitos e de leucócitos, bem como a contagem diferencial de leucócitos, não tiveram diferenças relevantes. Khalafalla; El-Hais (KHALAFALLA; EL-HAIS, 2015) também verificaram que alevinos de tilápia-

do-Nilo que receberam dietas enriquecidas com *Ulva rígida* e *Pterocladia capillacea*as, uma espécie de alga vermelha, não apresentaram diferença significativa no número de leucócitos totais, eritrócitos e quantidade de hemoglobina. Quezada-Rodríguez; Fajer-Ávila (QUEZADA-RODRÍGUEZ; FAJER-ÁVILA, 2017) verificaram que a suplementação com ulvana pode aumentar a quantidade total de leucócitos, o que poderia ser replicado se o extrato utilizado neste estudo tivesse alto teor de ulvana na sua composição.

El-Messallamy et al. (2021) verificaram que tilápias alimentadas com dietas enriquecidas com a associação de *U. lactuca* e L-carnitina tiveram número aumentado de eritrócitos, hematócrito, trombócitos e linfócitos, além da dieta ter influenciado os níveis séricos de proteínas totais, albumina e globulina.

Os resultados também demonstraram que os animais que ingeriram 20g/kg (extrato de *U. lactuca* por quilograma de ração comercial) tiveram os maiores níveis de albumina após o desafio. Albumina é uma proteína globular solúvel em água e não glicosilada. A síntese da albumina ocorre nos hepatócitos, 30% da albumina se encontra no plasma, o restante é estocado nos músculos e na pele. Pode se ligar à cátions de metais, ácidos graxos, hormônios, bilirrubina, transferrina, óxido nítrico e alguns fármacos (BELINSKAIA et al., 2021). Por ter baixo peso molecular e alta concentração plasmática, a albumina é responsável pela regulação da osmolaridade, portanto, a hiperalbuminemia ocorre com mais frequência nos casos de desidratação aguda (PEYGHAN et al., 2010). A injeção intraperitoneal de *Aeromonas hydrophila* em carpas *Cyprinus carpio* pode causar aumento da albumina (PEYGHAN et al., 2010).

Recentemente, Azadikhah et al. (2023) avaliaram a resposta bioquímica e patofisiológica de carpas *Capoeta capoeta* sob exposição de doses letais e sub-letais de nanopartículas de prata. A intoxicação com nanopartículas de prata pode reduzir os níveis de eritrócitos (RBC) leucócitos (WBC) e hematócrito, entretanto, pode aumentar os triglicérides, colesterol e albumina. A hipercolesterolemia pode ter relação com a diminuição da atividade enzimática do colesterol para ácido biliar.

Uma particularidade observada durante a aclimação dos peixes utilizados neste experimento é que eles paravam de se alimentar após o estresse do manejo (limpeza das caixas), desta forma, estes peixes não se alimentaram após a captura

dos primeiros peixes no tempo 0H e isso pode ter influenciado nos parâmetros bioquímicos mensurados no tempo 6H.

O extrato de *U. lactuca* utilizado neste estudo apresenta pouco mais de 56% de glicídios na sua composição. A ingestão de carboidrato induz a secreção de insulina, resultando na redução da lipólise e dos níveis de triglicérides (MADURO et al., 2020). Essa redução dos triglicérides foi observada nos pacus alimentados com 20g/kg do extrato até seis horas após o desafio, enquanto no tempo 0H todos os tratamentos com o extrato apresentaram níveis menores do que o grupo que ingeriu apenas a ração comercial. Infelizmente não foi possível mensurar os níveis de glicose por falha na amostragem.

Também foi observada redução nos níveis de colesterol nos grupos que ingeriram 20g/kg e 30g/kg do extrato até seis horas após o desafio. Em mamíferos, polissacarídeos não amiláceos, presentes na parede celular de vegetais, promovem hipocolesterolemia e hipertrigliceridemia através da redução da absorção de lipídeos pelo intestino (PEREIRA et al., 2022).

Tilápias-do-Nilo suplementadas com extrato de *U. fasciata*, na concentração de 100mg/kg, apresentaram aumento da atividade de lisozima, atividade fagocitária e contagem de leucócitos totais (ABO-RAYA et al., 2021). Neste estudo, os peixes alimentados com as dietas contendo diferentes concentrações de *U. lactuca* apresentaram resultado mais discreto na atividade da lisozima. O aumento na atividade foi maior após 24 horas da indução da inflamação, sem diferenças significativas entre as concentrações do extrato. Com 24 horas, as concentrações 10g/kg e 20g/kg apresentaram um leve aumento em relação ao grupo controle. A concentração de 30g/kg apresentou a maior média entre os tratamentos, porém, este resultado foi registrado 48 horas após o desafio.

Com 24 horas houve o pico dos níveis de fosfatase alcalina, levemente maior nos grupos que ingeriram o extrato da macroalga (20g/kg > 30g/kg > 10g/kg). Esta enzima indica dano hepático, juntamente com ALT e AST (HARZER; STIPP; HERRERIAS, 2015). O menor nível após três horas do desafio foi registrado no grupo alimentado com 10g/kg, após seis horas o menor nível foi registrado no grupo controle e após 12h o menor nível foi registrado no grupo alimentado com 20g/kg. As variações

dos níveis de fosfatase alcalina, associada com o registro das alterações histológicas, permitem inferir a evolução do processo inflamatório.

5. Conclusão

O presente estudo é o primeiro que avalia as interações de diferentes concentrações do extrato de *Ulva lactuca* na dieta de pacus, avaliando diferentes tempos de coleta após indução de um processo inflamatório causado pela *F. oreochromis*. De modo geral, a inclusão da macroalga não impacta de forma negativa na saúde do animal, mas o estudo carece de mais dados para comprovar a influência da macroalga na resposta inflamatória dos pacus.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) [concessão 001], ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (concessão número 301508/2019) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo nº 2018/24499-8) pelo aporte financeiro ao projeto de pesquisa.

Referências bibliográficas

- ABO-RAYA, M. H. et al. Assessment of growth-related parameters and immune-biochemical profile of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed dietary *Ulva fasciata* extract. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 7, p. 3233–3246, 1 jul. 2021.
- AZADIKHAH, D. et al. Biochemical and pathophysiological responses in *Capoeta capoeta* under lethal and sub-lethal exposures of silver nanoparticles. **Water (Switzerland)**, v. 15, n. 3, 1 fev. 2023.
- BASTOS, K. V. et al. Coastal degradation impacts on green turtle's (*Chelonia mydas*) diet in southeastern Brazil: Nutritional richness and health. **Science of the Total Environment**, v. 823, 1 jun. 2022.
- BELINSKAIA, D. A. et al. Serum albumin. **Encyclopedia**, v. 1, p. 65–75, 25 jan. 2021.
- EL-MESSALAMY, A. M. D. et al. Phytochemical constituents of *Ulva lactuca* and supplementation to improve the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) haemato-biochemical status. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 2663–2670, 2021.
- HARZER, B.; STIPP, M. C.; HERRERIAS, T. Avaliação da função hepática de peixes *Rhamdia quelen* expostos aos desreguladores endócrinos estriol e estrona. **Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade**, v. 8, n. 1, p. 82–99, fev. 2015.

KHALAFALLA, M. M.; EL-HAIS, A. M. A. Evaluation of seaweeds *Ulva rigida* and *Pterocladia capillacea* as dietary supplements in Nile Tilapia fingerlings. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 06, n. 03, 2015.

MADURO, A. H. P. et al. Perfil metabólico de filhotes de peixe-boi da Amazonia (*Trichechus inunguis*) em cativeiro, alimentados com diferentes sucedâneos do leite materno. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 5, p. 1830–1838, 1 out. 2020.

MANRIQUE, W. G. et al. Inflamación crónica granulomatosa en el pez teleósteo *Piaractus mesopotamicus*: Modelo de estudio histopatológico. **Revista MVZ Cordoba**, v. 22, n. 1, p. 5738–5746, 1 jan. 2017.

MATTOS, B. O. DE et al. **Aquicultura na Amazônia: estudos técnico-científicos e difusão de tecnologias**. Ponta Grossa: Atena Editora, 2021. v. 1

PEREIRA, T. P. et al. Análise de colesterol e triglicerídeos séricos em cães adultos suplementados com óleo de linhaça. **Nutritime Revista Eletrônica**, p. 9046–9051, jan. 2022.

PEYGHAN, R. et al. Effect of intraperitoneal and intramuscular injection of killed *Aeromonas hydrophila* on lymphocytes and serum proteins of common carp, *Cyprinus carpio*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 01, n. 01, p. 26–29, 2010.

PONCE, M. et al. Effects of the sulfated polysaccharide ulvan from *Ulva ohnoi* on the modulation of the immune response in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 100, p. 27–40, 1 maio 2020.

PRATIWI, D. Y.; PRATIWI, F. M. A review-the effect of dietary supplementation of *Ulva* on the growth performance and haematological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 10, n. 1, p. 29–32, 2022.

QUEZADA-RODRÍGUEZ, P. DEL R.; FAJER-ÁVILA, E. J. The dietary effect of ulvan from *Ulva clathrata* on hematological-immunological parameters and growth of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 1, p. 423–431, 1 fev. 2017.

RODRÍGUEZ-ESTRADA, U.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Aditivos funcionais nas rações para aquicultura. Em: RANZANI-PAIVA, M. J. T. et al. (Eds.). **Biotecnologia e sanidade de organismos aquáticos**. 1. ed. São Paulo: Associação de Patologistas de Organismos Aquáticos (ABRAPOA), 2019. v. 1p. 81–110.

TOLA, S.; FUKADA, H.; MASUMOTO, T. Effects of natural feeding stimulants and glutamic acid supplementation on the feed intake, growth performance and digestive enzyme activities of red sea bream (*Pagrus major*) fed fish meal-free soy protein concentrate (SPC)-based diet. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 7, p. 1912–1920, 1 jul. 2019.