

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

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

Leticia Franchin Rodrigues
Médica Veterinária

**Dezembro
2021**

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

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

Leticia Franchin Rodrigues

Orientadora: Profa. Dra. Karina Paes Bürger

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

**Dezembro
2021**

R696a

Rodrigues, Leticia Franchin

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

81 p. : tabs., fotos

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

Orientadora: Karina Paes Bürger

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

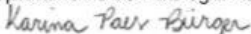
AUTORA: LETÍCIA FRANCHIN RODRIGUES

ORIENTADORA: KARINA PAES BÜRGER

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



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

pl 

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

pl 

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

Jaboticabal, 20 de dezembro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

“O conhecimento nos faz responsáveis”

Che Guevara

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

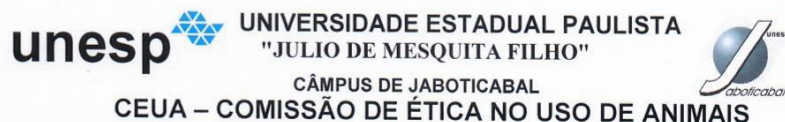
Sumário

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

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

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

CERTIFICADOS DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

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

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

Jaboticabal, 23 de junho de 2020.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

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

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

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

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

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem
°C – graus Celsius
IL – interleucinas
INF – interferons
TNF – fator de necrose tumoral
 β – beta
ROS – espécies reativas de oxigênio
h – horas
g – gramas.
CEUA – comissão de ética no uso de animais
L – Litros.
min – minutos
NaCl – Cloreto de sódio
mg - miligramas
pH – Potencial hidrogeniônico
cm – centímetro
 μ S - microssegundo
NRC - National Research Council
Kg – quilograma
UNESP – Universidade Estadual Paulista
FCAV – faculdade de ciências agrárias e veterinárias
T – tratamento
HPI – horas pós-inoculação
PF – padrão fisiológico
mL – Mililitros.
LAPOA – Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos
CAUNESP – Centro de Aquicultura da UNESP
PBS – Phosphate buffered saline
rpm – rotações por minuto
EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

μl – microlitro

UI – unidades internacionais

VCM – volume corpuscular médio

CHCM – concentração hemoglobina corpuscular media

HT – hematócrito

HG – hemoglobina

NBT - Nitroblue Tetrazolium

DMF - dimetil-formamida

nm – nanômetro

p – Período

DPA – dias pós abate

L* - luminosidade

a* - Intensidade de vermelho

b* - Intensidade de amarelo

C - croma

H_{ab}^0 – ângulo de inclinação de matriz

ΔE – delta

α – alfa

γ – gama

Nº - número

BOD – Biologyc Oxigen Demand

NMP - Número Mais Provável

LST – Lauril sulfato Triptose

EC – *Escherichia coli*

PCA – Plate Count Agar

UFC – Unidade formadora de colônia

BHI - brain heart infusion

TBARs – Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

PUFAs - ácidos graxos poli-insaturados

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Distribuição da tilápias nos diferentes tratamentos para estudos da inflamação aguda.....	16
--	----

Capítulo 3

Tabela 1. Distribuição das amostras dos filés nos diferentes tratamentos para determinação da análise microbiológica e físico-química.....	39
---	----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1. Avaliação do exsudato inflamatório. (1A). Células inflamatórias; (1B). Macrófagos; (1C). Granulócito; (1D). Linfócito; (1 E). Trombócito. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPS); Tratamentos: 10g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e não tratados com *Chlorella*.....20

Figura 2. Avaliação do Burst respiratório. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPS); Tratamentos: Padrão Fisiológico: valores de referência peixes amostrados sem nenhum estímulo; 10g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e não tratados com *Chlorella*.....21

Figura 3. Avaliação hematológica. (3A). Eritrócito; (3B). Hemoglobina; (3C). Hematócrito; (3D). VCM; (3E). CHCM. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPS); Tratamentos: Padrão Fisiológico: valores de referência peixes amostrados sem nenhum estímulo; 10g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e não tratados com *Chlorella*.22

Figura 4. Avaliação de leucograma. (4A). Leucócitos totais; (4B). Monócito; (4C). Neutrófilo; (4D). Linfócito; (4E). Trombócito. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada

período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPS); Tratamentos: Padrão Fisiológico: valores de referência peixes amostrados sem nenhum estímulo; 10g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e não tratados com *Chlorella*.....24

Figura 5. Avaliação bioquímica sérica. (5A). Albumina; (5B). Colesterol; (5C). Triglicerídeos; (5D). Creatinina; (5E). Proteína total; (5F) globulina. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPS); Tratamentos: Padrão Fisiológico: valores de referência peixes amostrados sem nenhum estímulo; 10g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e não tratados com *Chlorella*.26

Figura 6. Análise somática dos órgãos. (6A). Peso; (6B). Índice reno-somático; (6C). Índice hepatossomático; (6D) Índice esplenossomático. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPS); Tratamentos: Padrão Fisiológico: valores de referência peixes amostrados sem nenhum estímulo; 10g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e não tratados com *Chlorella*.....27

Capítulo 3

Figura 1. Análise Microbiológica. (1A). Coliformes totais; (1B). Coliformes termotolerantes; (1C). Microrganismos Mesófilos; (1D) Microrganismos psicrófilos; (1E) Enterobacteriaceae; (1F) *Staphylococcus aureus*. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos

experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPS); Tratamentos: 10g – tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - não tratados com *Chlorella*.....45

Figura 2. Análise de TBARs (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e pH. (2A). TBARs; (2B). pH; Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPS); Tratamentos: 10g – tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - não tratados com *Chlorella*.47

Figura 3. Análise colorimétrica. (3A). Luminosidade (L^*); (3B). Vermelho-verde (a^*); (3C). Amarelo-azul (b^*); (3D) Croma (C^*); (3E) Delta E (ΔE); (3F) Hue ($H^{0_{ab}}$). Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPS); Tratamentos: 10g – tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - não tratados com *Chlorella*.....49

Figura 4. Análise sensorial. (4A). brilho; (4B). firmeza; (4C). aparência; (4D) odor;. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPS); Tratamentos: 10g – tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - não tratados com *Chlorella*.....51

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.2. Tilapicultura no Brasil

A tilápia, no final dos anos 90, se tornou o peixe mais cultivado no Brasil, com crescimento anual superior a 20% em 2004, responsável por 40% do volume total da aquicultura nacional (Zimmermann, 2004). Em 2020, o Brasil, produziu cerca de 802.930 toneladas de peixes. O país é o quarto maior produtor mundial de tilápia, espécie que representa 60% da produção. Os peixes nativos, liderados pelo tambaqui, participam com 35% e outras espécies com 5% (Peixe BR, 2021).

A piscicultura brasileira apresentou um aumento de 71% na exportação no 3º trimestre de 2021, comparado com o mesmo período de 2020. A tilápia foi a espécie mais exportada no trimestre, com alta de 42%, sendo o Mato Grosso do Sul o maior exportador da espécie. As exportações para os Estados Unidos apresentaram um aumento de 121% com relação ao segundo trimestre. Para a China apresentaram queda de 3%, enquanto que para a Colômbia houve aumento de 10% (Peixe BR, 2021).

A piscicultura brasileira ainda é uma atividade característica de pequenas propriedades (Zimmermann, 2004). No Brasil, as tilápias são criadas principalmente em lagoas e gaiolas. Quando esses sistemas são inadequadamente dimensionados, projetados e manipulados, algumas questões ambientais podem surgir, como a alta geração de efluentes, podendo levar a surtos de patógenos e altos índices de poluição devido a rações e fezes (Sousa et al, 2019).

A produção de tilápia é de extrema importância para a produção mundial de aquicultura, sendo a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) a segunda espécie mais cultivada no mundo e a primeira no Brasil. Isto se deve ao seu excelente desempenho em diferentes sistemas de criação, sendo considerada uma espécie rústica de rápido crescimento, excelente capacidade de adaptação a alimentos inertes e boa aceitação no mercado. (Sousa et al, 2019).

2.3. *Aeromonas hydrophila*

O manejo sanitário precário propicia o surgimento de doenças causadas por microrganismos aquáticos oportunistas, como a *Aeromonas hydrophila* (Marteninghe et al, 2008). Agente habitual na piscicultura tropical, considerada cosmopolita, podendo ser encontradas em fontes naturais de água, no solo, em animais de água

doce e crescendo em temperaturas que variam de 5°C a 37°C (Davis et al., 1990; Kozinska, 2007).

A. hydrophila é um habitante comum da água e faz parte da microbiota intestinal de peixes saudáveis, provocando enfermidades quando o hospedeiro se encontrar debilitado em consequências de alguns fatores, tais como, o estresse gerado por alterações na qualidade da água e nas práticas de manejo na piscicultura intensiva, são alguns dos fatores de predisposição que podem ocasionar surtos por essa bactéria (Cipriano, 2001; Moraes, 2009; Yogananth et al., 2009).

Aeromonas hydrophila é uma das bactérias mais comuns envolvidas em processos infecciosos de peixes (Escandell et al., 2017). Nos peixes de água doce a infecção por *A. hydrophila* geralmente inicia-se com necroses, furúnculos ou ulcerações no pedúnculo caudal, evoluindo para descamações cutâneas, formando-se lesões ulcerativas na região corpórea e nadadeiras com exposição da musculatura, a quadros típicos de septicemia (Bharadwaj et al., 2013) causando perdas na produção e na qualidade do pescado. Os peixes infectados normalmente morrem entre 02 e 10 dias após o início dos sinais clínicos, sendo a doença transmitida horizontalmente por meio das excretas dos peixes ou lesões da pele (Leira et al., 2016).

Estudos mostram que isolados de *A. hydrophila* possuem alta resistência a alguns antibióticos usados na prática clínica, podendo causar dificuldades no tratamento de doenças causadas por esta bactéria (Leira et al., 2016).

Os principais fatores de virulência das cepas de *A. hydrophila* estão relacionados à produção de enzimas extracelulares e toxinas por esses agentes, como proteases, citosinas, elastases, amilases, nucleases, lípases e hemolisinas, que estão vinculadas aos sinais clínicos de aeromonose (Kozinska, 2007; Kozinska; Pekala, 2010; Orozova et al., 2008).

2.4. Reação inflamatória em peixes teleósteos

A inflamação é um processo que pode ser definido como a reação dos tecidos vivos à agressão local. Caracteriza-se morfológicamente pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício. Este fenômeno é parte primordial das defesas

naturais (imunidade inata e adaptativa) do indivíduo, além de apresentar participação efetiva na reparação tecidual (Abbas et al., 2012).

Da mesma maneira que os mamíferos, os peixes têm vários mecanismos de defesa específicos e não-específicos contra microrganismos invasores, os quais são essenciais e constitui-se processo controlado e coordenado, buscando reduzir os danos teciduais e restabelecer condições fisiológicas normais (Kim et al., 2007).

Na inflamação aguda ocorre vasodilatação, exsudação e infiltração de neutrófilos. Este processo é ativado e acrescentado por uma sucessão de fatores extracelulares que estruturam o processo inflamatório (Adams-chapman; Stoll, 2001; Sherwood; Toliver-kinsky, 2004) e envolvem os sistemas imunológico, cardiovascular, endócrino e nervoso (Kim; Deutschman, 2000).

A reação inflamatória em peixes teleósteos igualmente aos mamíferos, possuem papel importante na defesa do organismo, ocasionando em alterações vasculares locais com aumento de permeabilidade e instituição de edema; aumento da viscosidade sanguínea e marginação leucocitária, diapedese, quimiotaxia, acúmulo de leucócitos no foco lesado e fagocitose por células competentes que propiciam mecanismos quimiotáticos com recrutamento e acúmulo de leucócitos no sítio lesado (Belo et al., 2014).

De acordo com Castro et al., (2014) a inflamação aguda começa imediatamente após a injúria tecidual e apresenta substâncias originárias de metabólitos do ácido aracdônico, tais como, as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos, que por sua vez são responsáveis pelas alterações iniciais da reação inflamatória. As prostaglandinas promovem vasodilatação, agregação de plaquetas e degranulação celular (White, 1999). Os leucotrienos responsáveis pela quimiotaxia de células fagocitárias e contração da musculatura lisa (Baumann; Gauldie, 1994). Tais mecanismos são fundamentais para provocar um processo de proteção, de maneira que os importantes componentes do sistema de defesa alcancem o local da agressão (White, 1999). Mudanças sistêmicas e metabólicas na fase aguda promovem uma defesa inicial não-específica contra o agressor, até que uma imunidade específica seja adquirida (Gruys et al., 2006).

Dentre os vários eventos que ocorrem nesta fase, está à liberação de citocinas, tais como as interleucinas (IL), interferons (INF) e fator de necrose tumoral (TNF),

secretadas por células de defesa durante a resposta inflamatória e então, lançadas ao redor do foco inflamado adicionalmente na corrente sanguínea para efeitos sistêmicos, com ação em órgãos-alvo (Dinarello, 2000). Algumas citocinas provocam a inflamação e são chamadas de pró-inflamatórias (IL-1 β ; IL-6; IL-8 e TNF- α) à medida que outras inibem os genes das citocinas pró-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13) são chamadas de anti-inflamatórias (Elluru et al., 2006). Estudo utilizando a *C. Pyrenoidosa* observou a sua capacidade de reduzir os níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no soro de camundongos, demonstrando uma atividade anti-inflamatória (Chen et al., 2014).

2.1. *Chlorella pyrenoidosa*

Pesquisas, atualmente, mostram que microalgas vêm ganhando especial atenção a coleta e cultivo para serem usadas na alimentação humana, através do desenvolvimento de alimentos funcionais, para obtenção de compostos bioativos que tem propriedades nutricionais e farmacêuticas (Teixeira et al., 2008). Existem 80% de espécies de algas na Terra, que fornecem várias substâncias naturais biologicamente ativas, incluindo medicamentos antidiabéticos, antioxidantes, antibacterianos e antivirais para humanos (Wan et al., 2019).

O uso de antioxidantes na dieta pode ajudar na prevenção e tratamento de várias doenças, algumas delas são diabetes, hipertensão, aterosclerose, doença cardiovascular, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e câncer (Hormozi et al, 2019). Segundo Wan et. al (2019), a alga possui vários efeitos farmacológicos,

Nas classes de algas verdes (*Chlorophyceae*) a *Chlorella pyrenoidosa* é uma das principais espécies de microalgas, tendo perfil bioquímico único e suposta atividade biológica potente (Wan et al., 2019). As microalgas crescem rapidamente, possuem baixos custos de cultivo e são ricas em proteínas, gorduras poli-insaturadas, polissacarídeos (Chen et al., 2019), β -caroteno e clorofilas (Wan et al., 2019), importantes para dieta humana e animal (Teixeira et al., 2008).

Nas produções da aquicultura a adição de carotenóides à dieta é uma prática comum, visto que a presença de cor na pele e no filé do pescado é um atributo desejável para o consumidor e um indicador de qualidade. O uso de carotenóis na alimentação animal oferece benefícios para a saúde, como melhorar o sistema

imunológico e possuir propriedades antioxidantes que neutralizam os radicais livres resultantes do estresse oxidativo (Rosas et al, 2019).

2.5. Shelf-life

O tempo de prateleira é uma função do tempo, fatores ambientais e suscetibilidade que o produto sofre mudando sua qualidade. A deterioração que ocorre nos produtos alimentícios é devida á alterações físicas, químicas e biológicas, podendo comprometer a qualidade nutricional, microbiológica ou sensorial do alimento (Giménez, 2012).

Qualidade dos alimentos é questão de grande importância, pois se refere a particularidades que tornam os alimentos aceitáveis para os consumidores. O pescado por ser mais sensível e perecível comparado com outros produtos de origem animal (Amaral et al, 2013), devido à sua complexidade microbiológica. (Tsironi et al, 2019), é mais avaliado pelos consumidores (Amaral et al, 2013).

Ao longo do processo de deterioração, o pescado apresenta sinais de alterações, como aromas e sabores desagradáveis, formação de muco, produção de gás, coloração anormal, alterações na textura, isto se deve à devido à autólise, oxidação, atividade bacteriana ou ainda pela combinação desses processos, interferindo diretamente no prazo de validade. O principal método para avaliação da qualidade do peixe fresco é a sensorial, sendo a principal forma de avaliar o frescor do pescado (Amaral, 2013).

No pescado fresco a qualidade pode ser influenciada diretamente pelas condições higiênicas dos manipuladores e armazenamento, pelas superfícies (bancadas e mesas) e utensílios não higienizados (facas) (Lima et al, 2014). O pescado possui bastante proteína e alto teor de umidade na sua carne (cerca de 70%), sendo uma excelente fonte para o desenvolvimento e multiplicação de microrganismos (Lima et al, 2014).

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2012) **Cellular and molecular immunology**. Elsevier: Philadelphia, p. 545.
- Adams-Chapman I, Stoll BJ (2001) Systemic Inflammatory Response Syndrome. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases** 12:5-16.
- Amaral GVD, Freitas DDGC (2013). Método do índice de qualidade na determinação do frescor de peixes. **Ciência Rural**, 43, 2093-2100.
- Baumann H, Gauldie J (1994) The acute phase response. **Immunology Today** 15:74-80.
- Belo MAA, Schalch SHC, Moraes FR, Soares VE, Otoboni AMMB, Moraes JER (2005) Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology** 133:146-154.
- Belo MAA, Moraes JRED, Soares VE, Martins ML, Brum CD, Moraes FRD (2012) Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** 47:1015-1021.
- Belo MAA, Souza DGF, Faria VP, Prado EJ, Moraes FR, Onaka EM (2013). Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. **Journal of fish biology** 82:1403-1410.
- Belo MAA, Moraes FR, Yoshida L, Prado EJ, Moraes JRE, Soares VE, Silva MG (2014) Deleterious effects of low level of vitamin E and high stocking density on the hematology response of pacus, during chronic inflammatory reaction. **Aquaculture** 422-423:124-128.
- Bharadwaj A, Abraham TJ, Joardar NS (2013) 22 Immune effector activities in challenged rohu, *Labeo rohita* after vaccinating with *Aeromonas bacterin*. **Aquaculture** 392–395:16–22.
- BRASIL 1º 2014: anuário brasileiro da pesca e aquicultura, Ministério da Pesca e Aquicultura, 2014. p. 136.
- Chen Y, Chen J, Chang C, Chen J, Cao F, Zhao J, Zhu J. (2019). Physicochemical and functional properties of proteins extracted from three microalgal species. **Food Hydrocolloids** 96:510-517.
- Chen PB, Wang HC, Liu YW, Lin SH, Chou HN, Sheen LY (2014). Immunomodulatory activities of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa* in a mouse model of Parkinson's disease. **Journal of Functional Foods**, 11:103-113.

- Castro MP, Claudiano GS, Petrillo TR, Shimada MT, Belo MA, Marzocchi-Machado CM, Moraes FR (2014) Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbochelate and *Saccharomyces cerevisiae*. **Fish & Shellfish Immunology** 31:284-290.
- Cipriano, RC (2001) *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. **Fish Disease Leaflet**, 68:1-25.
- Davis BD, Dulbecco R, Eisen H, Ginsberg HS (1990) Microbiology. New York, 4. ed. Philadelphia: Kyoto (1990) p. 561-587.
- Dinarello CA (2000). **Proinflammatory cytokines**. Chest, 118:503-508.
- Elluru S, Duong Van Huyen JP, Prost F, Delignat S, Bayry J, Ephrem A, Siberil S, Misra N, Lacroix-desmzes S, Kazatchkine MD; Kaveri SV (2006) Comparative study of the anti-inflammatory effect of two intravenous immunoglobulin preparations manufactured by different processes. **Immunology Letters**, 107:58-62.
- Escandell, C, Sánchez, P (2017). Caracterización del cuadro clínico, Leucograma diferencial y hallazgos de Necropsia en Tilapias nilóticas (*Oreochromis Niloticus*) infectadas experimentalmente con *Aeromonas Hydrophila* (Bacteria: *Aeromonadaceae*).
- Giménez A, Ares F, Ares G (2012). Sensory shelf-life estimation: **A review of current methodological approaches**. Food research international, 49:311-325.
- Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ, Van Dijk E, Melen RH (2006) Monitoring health by values of acute phase proteins. **Acta Histochemica** 108: 229-232.
- Hongyang S, Yalei Z, Chunmin Z, Xuefei Z, Jinpeng L (2011). Cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* em efluente de processamento de soja. **Bioresource Technology**, 102 (21), 9884-9890.
- Hormozi M, Ghoreishi S, Baharvand P (2019). Astaxanthin induces apoptosis and increases activity of antioxidant enzymes in LS-180 cells. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology** 47:891-895.
- Kim HJ, Yasuike M, Kondo H, Hirono I, Aoki T (2007) Molecular characterization and gene expression of a CXC chemokine gene from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Fish Shellfish Immunol**. London, 23:1275-1284.
- Kim PK, Deutschman CS (2000) Inflammatory responses and mediators. **Critical care of the trauma patient** 80:885-894.

- Kozinska A (2007) Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. **Journal of Fish Diseases** 30:293-301.
- Kozinska A, Pekala A. (2010) serotyping of *Aeromonas* species isolated from Polish fish farms in relation to species and virulence phenotype of the bacteria. **Bull Veterinary Institute Pulawy** 54:315-320.
- Lima JS, Araujo JM, Dias SS, Silva EA, Silva EAL, Aquino AB, Aquino LCLS (2014). Análise microbiológica e sensorial de “fishburger” elaborado com tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) com adição de conservantes naturais. **REVISTA GEINTEC-GESTAO INOVACAO E TECNOLOGIAS** 4: 560-567.
- Leira MH, Assis AL, Botelho HA, Melo CCV, Mendonça FG, Nascimento AF, FREITAS RTF (2016) Principais infecções bacterianas na criação de peixes de água doce do Brasil—Uma revisão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, 3:44-59.
- Marteninghe, A. et al (2008). Patogenicidade da infecção por *Aeromonas hydrophila* em alevinos de jundiás (*Rhamdia quelen*). **Anais do congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Gramado, p.108.
- Moraes FR, Moraes JRE (2009). Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá. p. 625-723.
- Orozova P, Chikova V, Kolarova V, Nevora R, Konovska M, Najdenski H (2008). Antibiotic resistance of potentially pathogenic *Aeromonas strains*. **Trakia Journal of Sciences**, v. 6, p. 71-77.
- Peixebr. Anuário Peixe BR da Piscicultura, São Paulo: PeixeBR, São Paulo, Brasil, 2021. <https://www.peixebr.com.br/exportacao-3-tri-2021/>.
- Reque VR, Moraes JRE, Belo, MAA, Moraes FR (2010). Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. **Aquaculture**, 300(1-4), 37-42.
- Rosas VT, Monserrat JM, Bessonart M, Magnone L, Romano LA, Tesser MB (2019). Comparison of β -carotene and Spirulina (*Arthrospira platensis*) in mullet (*Mugil liza*) diets and effects on antioxidant performance and fillet colouration. **Journal of Applied Phycology**, 31(4), 2391-2399.
- Sherwood ER, Toliver-Kinsky T (2004). Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**. v. 18, n. 3, p. 285- 405.
- Shi Y, Sheng J, Yang F, Hu Q (2007). Purificação e identificação de polissacarídeo derivado de *Chlorella pyrenoidosa*. **Química alimentar**, 103 (1), 101-105.

- Sousa AA, Pinho SM, Rombenso AN, Mello GL, Emerenciano, MGC (2019). Pizzeria by-product: a complementary feed source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised in biofloc technology?. **Aquaculture**, 501, 359-367.
- Sousa LMD (2021). Efeitos de diferentes fontes alimentares no desenvolvimento de *Moina minuta* Hansen (1899) (Crustacea: Branchiopoda).
- Takyar MBT, Khajavi SH, Safari, R (2019). Evaluation of antioxidant properties of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* and their application in order to extend the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during refrigerated storage. **Lwt**, 100, 244-249.
- Teixeira C, Silva E, Cruz M, Navarro AC (2008). A eficácia da *chlorella* como inibidor de apetite associada ao exercício físico e dieta balanceada alterando a composição corporal. **RBONE-Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, 2(11), 3.
- Tsironi T, Anjos L, Pinto PI, Dimopoulos G, Santos S, Santa C, Power D (2019). High pressure processing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets and tools for flesh quality and shelf life monitoring. **Journal of Food Engineering**, 262, 83-91.
- Yogananth N, Bhakayaraj R, Chanthuru A, Anbalagan T, Mullai Nila, K (2009). Detection of Virulence Gene in *Aeromonas hydrophila* Isolated from Fish Samples Using PCR Technique, **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 4, p. 51-53.
- White M (1999). Mediators of inflammation and the inflammatory process. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, n. 3, p. 378-381.
- Wan XZ, Li TT, Zhong RT, Chen HB, Xia X, Gao LY, Zhao C (2019). Antidiabetic activity of PUFA-rich extracts of *Chlorella pyrenoidosa* and *Spirulina platensis* in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 128, 233-239.
- Zimmermann S (2004) Oportunidades na aquicultura: piscicultura. **Food Ingredientes Catálogo Oficial**. São Paulo.

CAPITULO 2 – Atividade imunomoduladora através da suplementação com *Chlorella pyrenoidosa* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) desafiadas com *Aeromonas hydrophila*

Leticia Franchin Rodrigues¹, Mayumi Fernanda Aracati¹, Susana Luporini de Oliveira¹, Camila Carlino da Costa¹, Ives Charlie da Silva², Beatriz Caroline Cabral Ibelli³; Beatriz Baldissarelli³; Marco Antonio de Andrade Belo^{1,3}

¹ Department of Preventive Veterinary Medicine of Unesp, School of Agrarian and Veterinary Sciences, Sao Paulo State University (UNESP), Jaboticabal/SP.

² Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (ICB-USP), São Paulo/SP.

³ Laboratory of Animal Pharmacology and Toxicology, University of Brazil, Descalvado/SP.

RESUMO - *Chlorella pyrenoidosa* é uma das principais espécies de microalgas das classes de algas verdes e a adição na dieta é uma prática comum na aquicultura. *Aeromonas hydrophila* faz parte da microbiota intestinal de peixes saudáveis, se tornando oportunista quando o hospedeiro se encontrar debilitado. Partindo-se da importância da aeromonose para o manejo sanitário da piscicultura e da importância da reação inflamatória na resposta de defesa dos peixes teleosteo, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito imunomodulador da *C. pyrenoidosa*, administrada via oral na ração em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre o mecanismo de defesa da tilápia desafiadas com *A. hydrophila*, por meio de análise hematológica, bioquímica, avaliação do exsudato inflamatório e *burst* respiratório. Para o estudo foram utilizadas 90 tilápias do Nilo (± 100 g) sendo acondicionadas aleatoriamente em 10 aquários (n=9), com capacidade de 100L de água cada. Após aclimação, rações contendo *C. pyrenoidosa* foram ministradas por trinta dias previamente as análises, constituindo o seguinte tratamento PF (sem tratamento e sem inóculo de *A. hydrophila*); T0 (sem tratamento com *C. pyrenoidosa* e inoculados com *A. hydrophila*); T1 (tratados com 5g de *C. pyrenoidosa*/kg de ração e inoculados com *A. hydrophila*); T2 (tratados com 10g de *C. pyrenoidosa*/kg e inoculados com *A. hydrophila*). Amostras de sangue foram coletados 6, 24 e 48 horas pós-inoculação para coleta do exsudato presente na bexiga natatória e amostras de sangue para determinação hematológica, espécies reativas de oxigênio (ROS), bioquímicos séricos e análise somática dos órgãos. Tilápias suplementadas com *C. pyrenoidosa* apresentaram aumento de células inflamatórias totais no exsudato em 6h, diminuição do ROS, aumento dos leucócitos totais 24h, aumento de creatinina 6h e diminuição com 24h, aumento de proteínas totais, globulina, albumina e não apresentaram diferença estatística na avaliação somática dos órgãos, sugerindo então, que a *C. pyrenoidosa* possa ter auxiliado na reação inflamatória de tilápias do Nilo, além disso a inibição significativa de mediadores inflamatórios e citocinas através de *Chlorella* sugere que essa microalga seja uma fonte potencial de desenvolvimento de agentes antiinflamatórios, sendo uma boa alternativa para os antiinflamatórios convencionais.

Palavra-chave: antioxidantes, carotenoides, ciclideos, inflamação aguda, “*shelf life*”, teleosteo

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem um grande potencial para o desenvolvimento da aquicultura, possuindo clima extremamente favorável, mão-de-obra abundante e crescente demanda por pescado no mercado interno (Brasil, 2014). Neste contexto, a criação em cativeiro de algumas espécies de peixes vem crescendo significativamente nos últimos anos. Destacando a tilápia, por apresentarem elevada precocidade, rusticidade e sua carne ser altamente apreciada pelo consumidor (Brasil, 2014). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um dos peixes teleósteos de água doce mais estudados e utilizados na aquicultura brasileira (MPA, 2011).

A elevação do adensamento populacional na aquicultura, causa perda na qualidade da água, expondo os peixes às condições de estresse (Belo et al., 2014), ocasionando aumento dos níveis circulantes de cortisol (Belo et al., 2012). Essa condição de estresse é um dos fatores de predisposição que podem ocasionar surtos por bactérias, outro fator, são práticas inadequadas de manejo na piscicultura (Cipriano, 2001; Moraes, 2009; Yogananth et al., 2009).

Os agentes etiológicos que possivelmente ocasionam perdas às populações de peixes em seu habitat natural, podem tornar-se causador de doenças de grande importância econômica quando submetidos às condições de criação (Belo et al., 2012), como a *Aeromonas hydrophila* (Reque et al., 2010).

A. hydrophila é um habitante comum da água e faz parte da microbiota intestinal de peixes saudáveis, provocando enfermidades quando o hospedeiro se encontrar debilitado, causando surtos (Cipriano, 2001; Moraes, 2009; Yogananth et al., 2009). Este patógeno são causadores de lesões ulcerativas e septicemias hemorrágicas em peixes, acarretando em perdas na produção (Reque et al., 2010).

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

Partindo-se da importância da aeromonose para o manejo sanitário de piscicultura e da importância da reação inflamatória na resposta de defesa dos peixes teleósteos, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito imunomodulador da *Chlorella pyrenoidosa*, administrada via oral na ração em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, sobre o mecanismo de defesa da tilápia desafiadas com *Aeromonas hydrophila*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP/FCAV – Campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil sob o protocolo número 3423/20. Inicialmente foi realizada avaliação da atividade moduladora da alga verde *Chlorella* durante reação inflamatória em tilápias (*Oreochromis niloticus*) desafiadas com *Aeromonas hydrophila*.

2.1. Animais e condicionamento

Para o estudo foram utilizadas 90 tilápias do Nilo (± 100 g) (*Oreochromis niloticus*) (± 100 g) oriundas da mesma desova, acondicionadas em 10 aquários (n=9), com capacidade de 100L de água cada, abastecidos com água corrente desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano, com vazão de 1 L/min. Após o transporte para os aquários, os peixes foram aclimatados durante 15 dias para a concentração plasmática de cortisol e osmolaridade voltem aos níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banhos em solução de NaCl na concentração de 6,0g/L (Carneiro e Urbinati, 2001). Receberam ração comercial peletizada (32% de proteína bruta), constituindo a dieta basal. O arraçãoamento dos animais foi feito três vezes ao dia, correspondendo a 2% da biomassa dos aquários. A qualidade da água foi monitorada nos momentos da alimentação durante todo período experimental, utilizando pHmetro YSI-63 e oxímetro YSI-55, e seus valores permaneceram dentro da faixa apropriada para o bem-estar dos peixes tropicais (Boyd, 1990) (dissolvido oxigênio = $4,07 \pm 0,89$ mg L⁻¹; temperatura = $27,64 \pm 2,05$ °C; pH = $7,64 \pm 0,54$; e condutividade = $208,29 \pm 97,57$ µS/cm).

2.2. Dieta Experimental

A composição da dieta basal seguiu às exigências para tilápias, estabelecidas no NRC, através da utilização de ração comercial peletizada (LAGUNA® - contendo 32% de proteína bruta, 7%, extrato etéreo, 5% de fibra bruta e 12% de matéria mineral). O arraçoamento dos animais foi feito três vezes ao dia, sendo 8:00 horas, 13:00h e 18:00h, correspondendo a 2% da biomassa dos aquários.

Para a padronização da dieta experimental contendo a *Chlorella pyrenoidosa*, foi adicionado a ração comercial 5 e 10 g/Kg de ração, seguindo o estudo de Abdulrahman et al. (2014).

Para o preparo das dietas, a ração foi pesada na proporção do peso médio da tilápia de cada tanque e adicionado 2% de óleo vegetal mais as respectivas quantidades de *Chlorella* (5 e 10g/kg) e armazenadas em sacos plásticos escuro mantidos a 9°C para uso durante o período experimental de um mês previamente ao abate dos animais. A dieta dos animais controle sem *Chlorella* foi misturada com 2% de óleo vegetal para manter a padronização do equilíbrio nutricional.

2.3. Delineamento experimental

Todo o delineamento e análises foram realizados na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP/FCAV – Campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil, departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

As tilápias foram distribuídas aleatoriamente em 10 aquários (100 L de água, n=9) para compor os seguintes tratamentos: padrão fisiológico (sem tratamento e sem inóculo de *Aeromonas hydrophila*); T0 (sem tratamento com *Chlorella pyrenoidosa* e inoculados com *Aeromonas hydrophila*); T1 (tratados com 5g de *Chlorella pyrenoidosa*/kg de ração e inoculados com *Aeromonas hydrophila*); T2 (tratados com 10g de *Chlorella pyrenoidosa*/kg e inoculados com *Aeromonas hydrophila*).

Após um mês de suplementação com *C. pyrenoidosa*, os animais foram estimulados com inóculo de bacterina *Aeromonas hydrophila* administrado na bexiga natatória, exceto o padrão fisiológico. Foram avaliados 9 animais por tratamento em três períodos: 6, 24 e 48 horas pós-inoculação (HPI) (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição da tilápias nos diferentes tratamentos para estudos da inflamação aguda.

Grupos	Tratamentos ¹	HPI (Horas pós-inoculação ²)		
		6	24	48
T 0	Inoculado e não tratado com <i>Chlorella</i>	N = 9	N = 9	N = 9
T 1	Inoculado e tratado com 5g de <i>Chlorella</i>	N = 9	N = 9	N = 9
T 2	Inoculado e tratado com 10g de <i>Chlorella</i>	N = 9	N = 9	N = 9
Padrão Fisiológico (PF)		N = 9		

¹ T0 (controle) – inoculado e não tratado; T1 – inoculado e tratado com 5g; T2 – inoculado e tratado com 10g e Padrão fisiológico (PF) - valores de referência.

Inoculação da bacterina de *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória das tilápias

2.4. Anestesia

As tilápias foram anestesiadas por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 para inoculação das bacterinas de *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória de cada animal. A benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1g/mL), completando o volume para 1L (Wedemeyer, 1980). Após o manejo experimental, os animais foram recolocados em seus respectivos aquários com fluxo contínuo de água e aeração. Para eutanásia, os animais foram insensibilizados no gelo esteril e em seguida foi realizada a descerebração do tronco encefálico.

2.5. Produção dos inóculos de bacterina de *Aeromonas hydrophila*

Isolados de *A. hydrophila* foram fornecidas pelo LAPOA (Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos), CAUNESP. O inóculo foi obtido por centrifugação (4000 rpm, 4°C, por 20 minutos), após três lavagens sucessivas com solução de PBS estéril (pH 7,4) para retirada completa do meio de cultura e então ressuspendida em 100 mL de PBS. A concentração da bacterina foi ajustada para $1,5 \times 10^9$ células mL⁻¹.

Para inativação adicionou-se 0,5% de formol (volume/volume) à suspensão bacteriana, que permaneceu em agitação constante a temperatura ambiente, em seguida, mantida a 4°C, durante 24 horas.

2.6. Inoculação experimental de bacterinas de *A. hydrophila*

Foram avaliados nove animais por tratamento em três períodos, isto é: seis, 24 e 48 horas após inoculação da bacterina de *Aeromonas hydrophila*. Foram feitas as devidas antissepsia com álcool antes do procedimento e posteriormente foi retirado algumas escamas de cada animal para facilitar a administração do inóculo da bacterina. Logo em seguida, foi administrado 0,5mL do inóculo na bexiga natatória da tilápia com material estéril.

2.7. Avaliação do exsudato inflamatório na bexiga natatória

Para a avaliação do acúmulo de células totais, ao término dos tempos pré-estabelecidos de 6, 24, 48 horas após o desafio, os animais foram dissecados após anestesia profunda em hipotermia seguida de descerebração do tronco encefálico. Primeiramente foi realizado um corte longitudinal ventral do ânus ao opérculo; outro do ânus até a cabeça seguindo a linha lateral e um terceiro passando pela nadadeira peitoral dando acesso a bexiga natatória. Em seguida, esta foi lavada cuidadosamente com 1 ml de solução gelada de PBS, contendo EDTA a 0,09%. O mesmo volume injetado foi coletado com o auxílio de micropipeta monocal (100 a 1000µl), e transferido para eppendorf mantidos em gelo. A solução PBS-EDTA-exsudato foi centrifugada a 1000 rpm, por cinco minutos, em centrífuga clínica. O sobrenadante foi retirado e o sedimento total ressuspensionado com adição de 100 µL do sobrenadante previamente retirado e uma alíquota desse volume transferida para câmara de Neubauer para contagem das células inflamatórias totais em microscopia de luz, conforme descrito por Belo et al. (2013). Para a contagem diferencial de trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos foi colocada uma gota deste exsudato sobre lâmina histológica, juntamente com uma gota de soro de tilápia, extraída no dia anterior e mantidos refrigerados. Após homogeneização, foi feita a extensão do exsudato, a lâmina deixada secar em temperatura ambiente para posterior fixação em álcool, por um minuto. Depois de secas, foram coradas pancromicamente com corante May-Grunwald-Giemsa-Wright (Belo et al., 2013) para contagem em microscopia de luz de até 200 células dentre os diferentes tipos acumulados no foco inflamatório.

2.8. Avaliação hematológica

Nove peixes por tratamento (um aquário para cada tratamento) foram anestesiados para obter dois mL de amostras de sangue através do vaso caudal 6, 24 e 48 horas pós-inoculação (HPI), que foram aliquotadas em dois conjuntos: um usando seringa revestida com heparina (5000 UI) e outra sem anticoagulante para obtenção de amostras de plasma e soro, respectivamente. O hemograma foi realizado em hemocitômetro (câmara de Neubauer) e solução de Natt e Herrick (1952) (relação 1:100 v:v). Foram realizadas a determinação do percentual de hematócrito em microcentrífuga e da quantidade de hemoglobina circulante com reagente de Drabkin's para leitura em comprimento de onda de 540nm e os valores de volume corpuscular médio (VCM) foram obtidos pelo cálculo $VCM = (HT/Eritrócito) \times 10$ e concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM) pelo cálculo $CHCM = (HG/HT) \times 100$. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sangüíneas com a contagem de 200 células, estabelecendo o percentual de cada tipo celular de interesse, após coloração prévia das extensões com May-Grünwald-Giemsa-Wright (Belo et al., 2013).

2.9. Avaliação da atividade respiratória dos leucócitos (*burst* respiratório)

O sangue coletado para as análises hematológicas e bioquímicas também foi utilizado para a análise da atividade respiratória dos leucócitos (*burst* respiratório), segundo protocolo de Anderson e Siwichi (1995). O método consistiu em determinar as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pelo *burst* respiratório por meio do ensaio calorimétrico baseado na redução do corante Nitroblue Tetrazolium (NBT) que formam grânulos de formazan, que são precipitados de material insolúvel e apresentam coloração escuro no interior dos fagócitos. Uma alíquota de 0,1 mL de sangue heparinizado foi colocada em tubos com 0,1mL de NBT (Sigma, St. Louis, MO, USA). A solução foi homogeneizada e incubada por 30 min em 25°C. Após esse período, 50 µL da suspensão formada colocada em tubos de ensaio com 1 mL de n,n-dimetil-formamida (DMF, Sigma, St. Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 rpm por 5 min. O DMF produz a lise da parede celular dos grânulos de formazan e assim libera na solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectro em comprimento de onda de 540 nm (Sahoo et al., 2005).

2.10. Avaliação do bioquímico sérico

Amostras de sangue colhidas sem anticoagulante foram centrifugadas a 5000 rpm por cinco minutos para obtenção de soro. O estudo do bioquímico sérico de albumina, creatinina, proteínas totais, colesterol e triglicerídeos foram determinadas enzimática e colorimetricamente em analisador bioquímico semi-automático (Modelo LabQuest – Bioplus).

2.11. Avaliação somática dos órgãos

Para avaliação somática dos órgãos todos os animais foram pesados. Após serem eutanasiados, foram dessecados e retirado fígado, baço e rim. Todos os órgãos foram pesados.

2.12. Análise estatística

As diferenças entre os tratamentos (10g, 5g e controle) e o tempo (6, 24 e 48 horas) foram determinadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal e Wallis (1952) com o software GraphPad Prism versão 9.0. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1. Resultado da inflamação

3.1.1. Análise do exsudato inflamatório

Na avaliação das células inflamatórias presentes no exsudato (Figura 1) notou-se superioridade significativa das células inflamatórias totais associados ao aumento na contagem diferencial de linfócitos nos grupos dos animais tratados com a *Chlorella* (10 e 5g) quando comparados aos animais controles. Embora não tenha diferença significativa na contagem diferencial de macrófago e granulócitos observou-se perfil semelhante, sendo seus maiores valores nos animais submetidos a ambos os tratamentos com a alga em relação ao grupo controle.

Ao longo do tempo os animais submetidos ao tratamento com 5g de *Chrorella* e grupo controle apresentaram aumento progressivo de células inflamatórias totais, linfócitos e trombócitos.

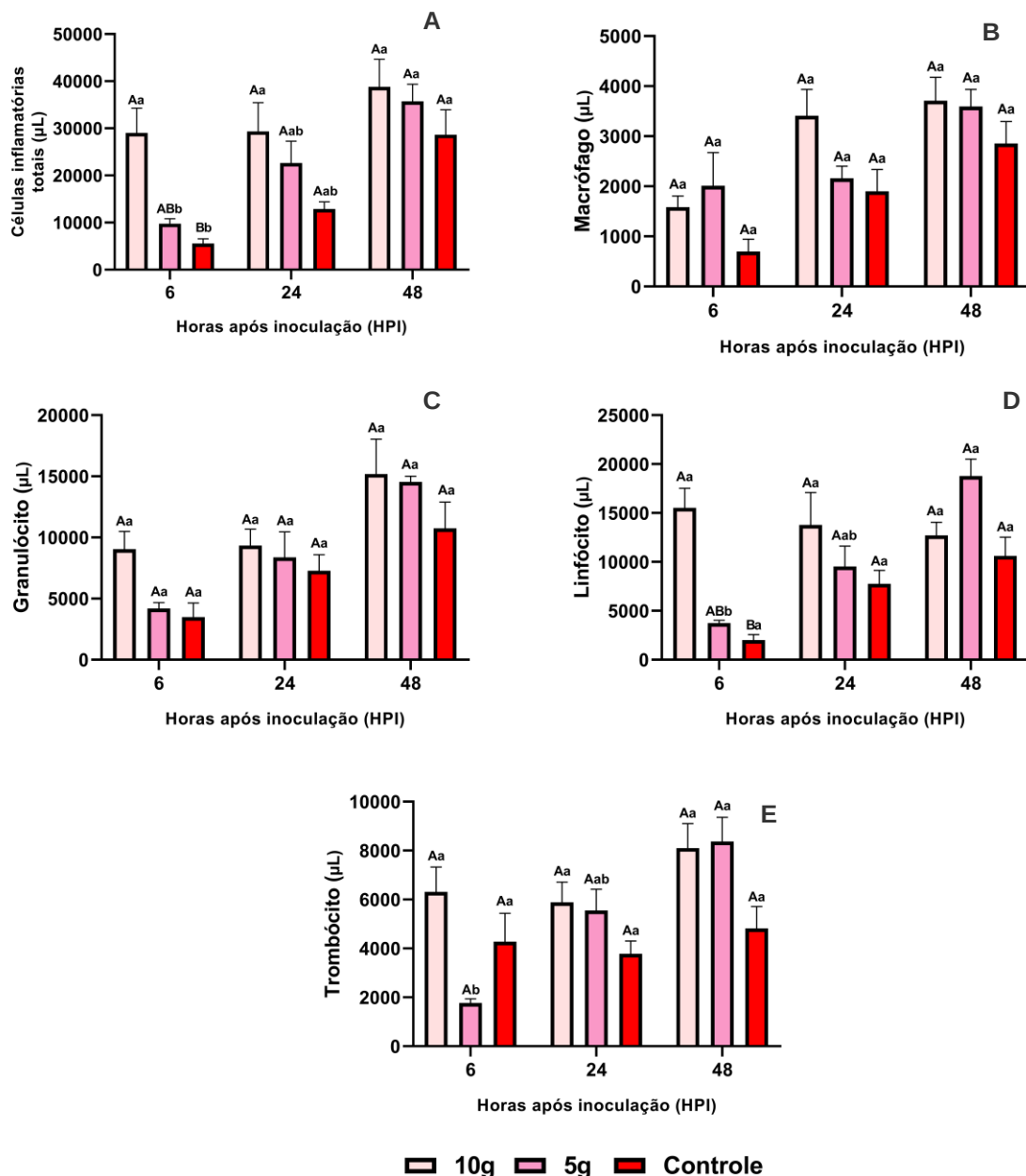


Figura 1. Avaliação do exsudato inflamatório. (1A). Células inflamatórias; (1B). Macrófagos; (1C). Granulócito; (1D). Linfócito; (1 E). Trombócito. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPA); Tratamentos: 10g – Animais estimulados com *Aeromonas*

hydrophila e tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e não tratados com *Chlorella*.

3.1.2. Burst respiratório

As análises de produção de reativos de oxigênio (ROS) (Figura 2) apresentou diminuição significativa em animais submetidos a ambos os tratamentos com *Chlorella* (10 e 5g) em 24 e 48 HPI quando comparados ao grupo controle. Ao longo do processo inflamatório, foi observado aumento progressivo nos animais tratados com 5mg do antioxidante.

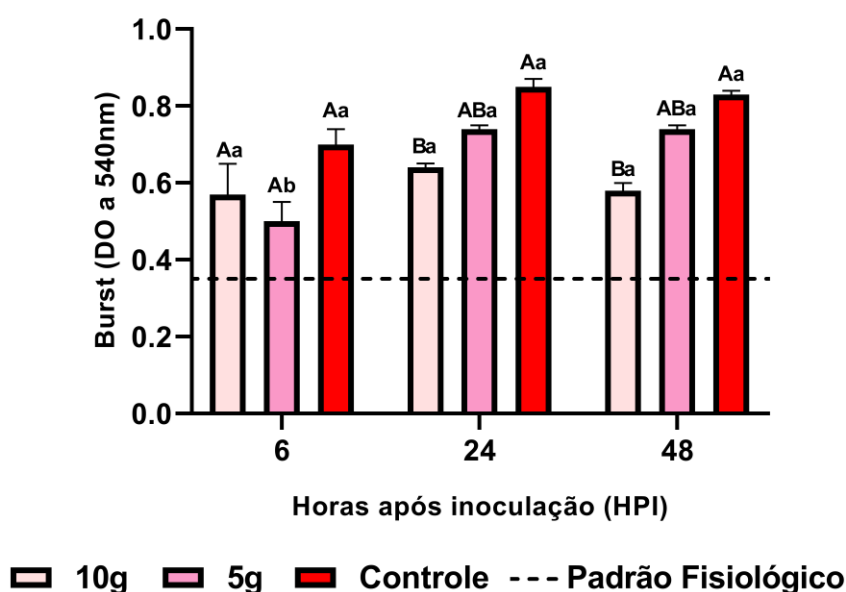


Figura 2. Avaliação do Burst respiratório. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPA); Tratamentos: Padrão Fisiológico: valores de referência peixes amostrados sem nenhum estímulo; 10g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e não tratados com *Chlorella*.

3.1.3. Análise hematológica

Na fase inicial do processo inflamatório foi observado que os animais submetidos a estímulo inflamatório apresentaram anemia macrocítica hiperocrômica (Figura 3), ou seja, diminuição da contagem de eritrócitos associado ao aumento de hemoglobina, hematócrito, VCM e CHCM, quando comparados aos animais do padrão fisiológico.

Entretanto, ao longo do processo inflamatório houve recuperação dos valores de eritrócitos em todos os grupos.

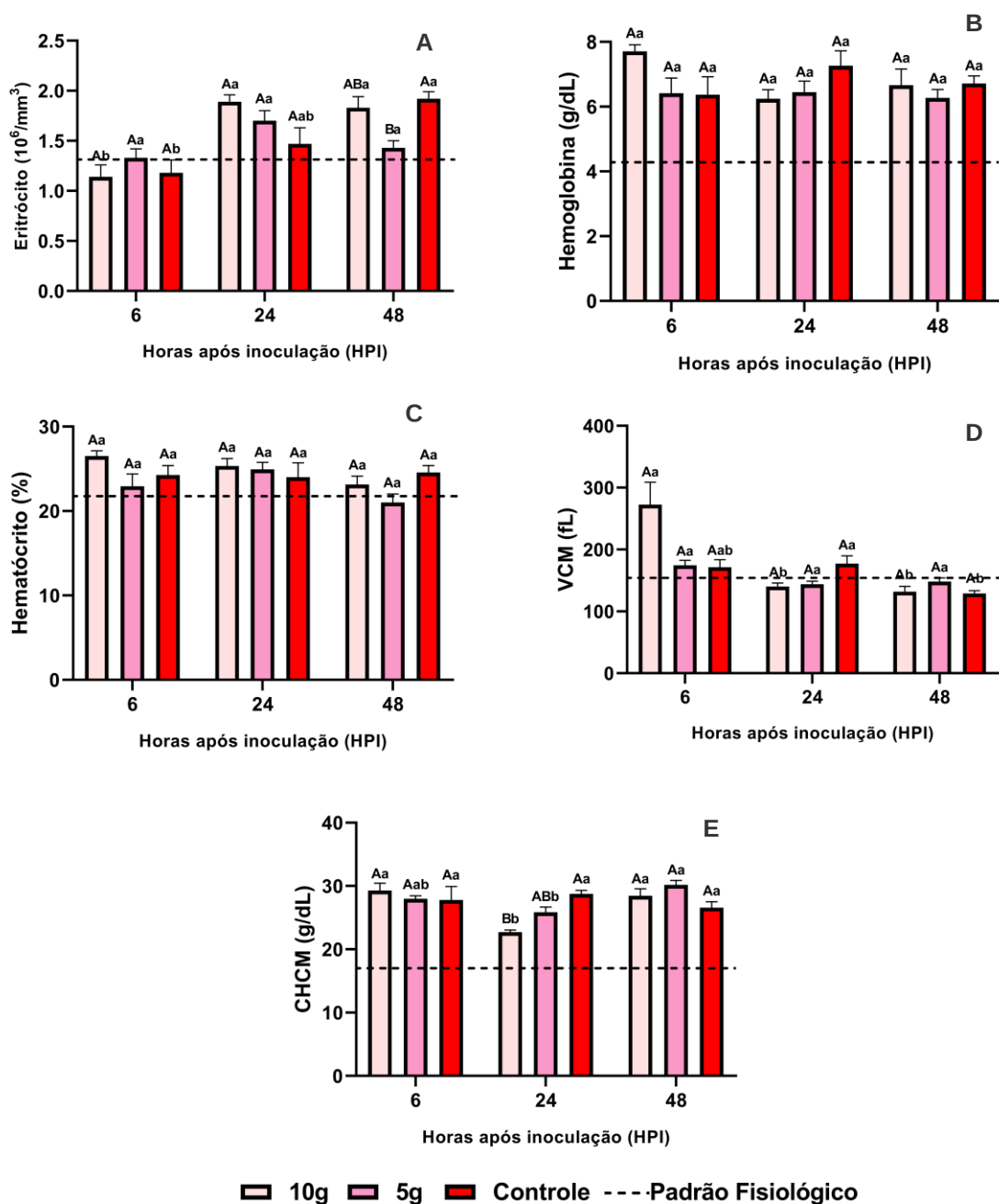


Figura 3. Avaliação hematológica. (3A). Eritrócito; (3B). Hemoglobina; (3C). Hematócrito; (3D). VCM; (3E). CHCM. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPA); Tratamentos: Padrão Fisiológico: valores de referência peixes amostrados sem nenhum estímulo; 10g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e não tratados com *Chlorella*.

Os resultados observados no leucograma (Figura 4) das tilápias durante aerocistite mostrou que animais submetidos a ambos os tratamentos (10 e 5g) obtiveram leucocitose devido a linfocitose e trombocitose em comparação ao controle em 24HPI.

Embora não foi observado diferença estatística significativa na contagem de monócitos e neutrófilos, pode-se observar que a contagem diferencial nos animais submetidos ao estímulo inflamatório foram superiores ao padrão fisiológico.

De modo geral, foi observado pico das células de defesa em 24h em todos os grupos, entretanto observou-se recuperação dos valores diferenciais nos animais submetidos a ambos os tratamentos (10 e 5g) em 48HPI diferentemente do grupo controle que manteve seus valores aumentados.

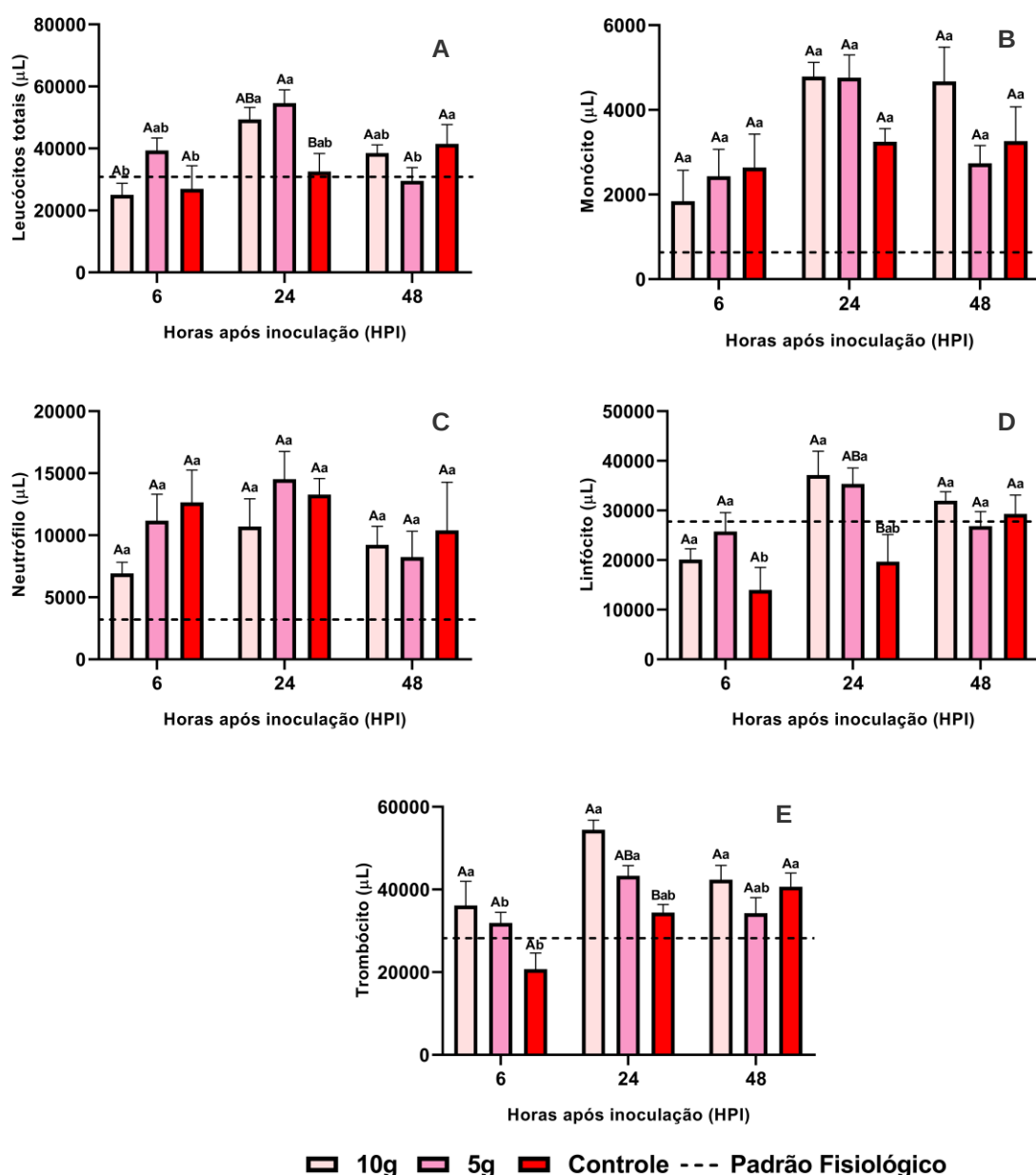


Figura 4. Avaliação de leucograma. (4A). Leucócitos totais; (4B). Monócito; (4C). Neutrófilo; (4D). Linfócito; (4E). Trombócito. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPA); Tratamentos: Padrão Fisiológico: valores de referência peixes amostrados sem nenhum estímulo; 10g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e não tratados com *Chlorella*.

3.1.4. Avaliação bioquímico sérico

Determinação bioquímica sérica de creatinina (Figura 5) nos animais tratados com ambas as doses de *Chlorella* (10 e 5g) apresentaram aumento significativo 6HPI em comparação ao grupo controle. Em contrapartida, em 24HPI houve diminuição no nível sérico de creatinina nos grupos tratados e aumento no grupo controle.

As determinações circulantes de proteína total e globulina apresentaram-se elevadas nos animais tratados (10 e 5g) em 6 e 24HPI quando comparado aos animais controles. Foi possível observar também um aumento nos valores de albumina 6HPI.

Ao longo do tempo os níveis séricos de colesterol e proteína total dos animais controle apresentaram aumento em 24 e 48HPI. Os animais submetidos ao tratamento com 10g de *Chlorella* apresentaram pico dos níveis de triglicerídeos em 24HPI. Os valores séricos de creatinina dos animais tratados com 5g começaram a reduzir a partir de 24HPI.

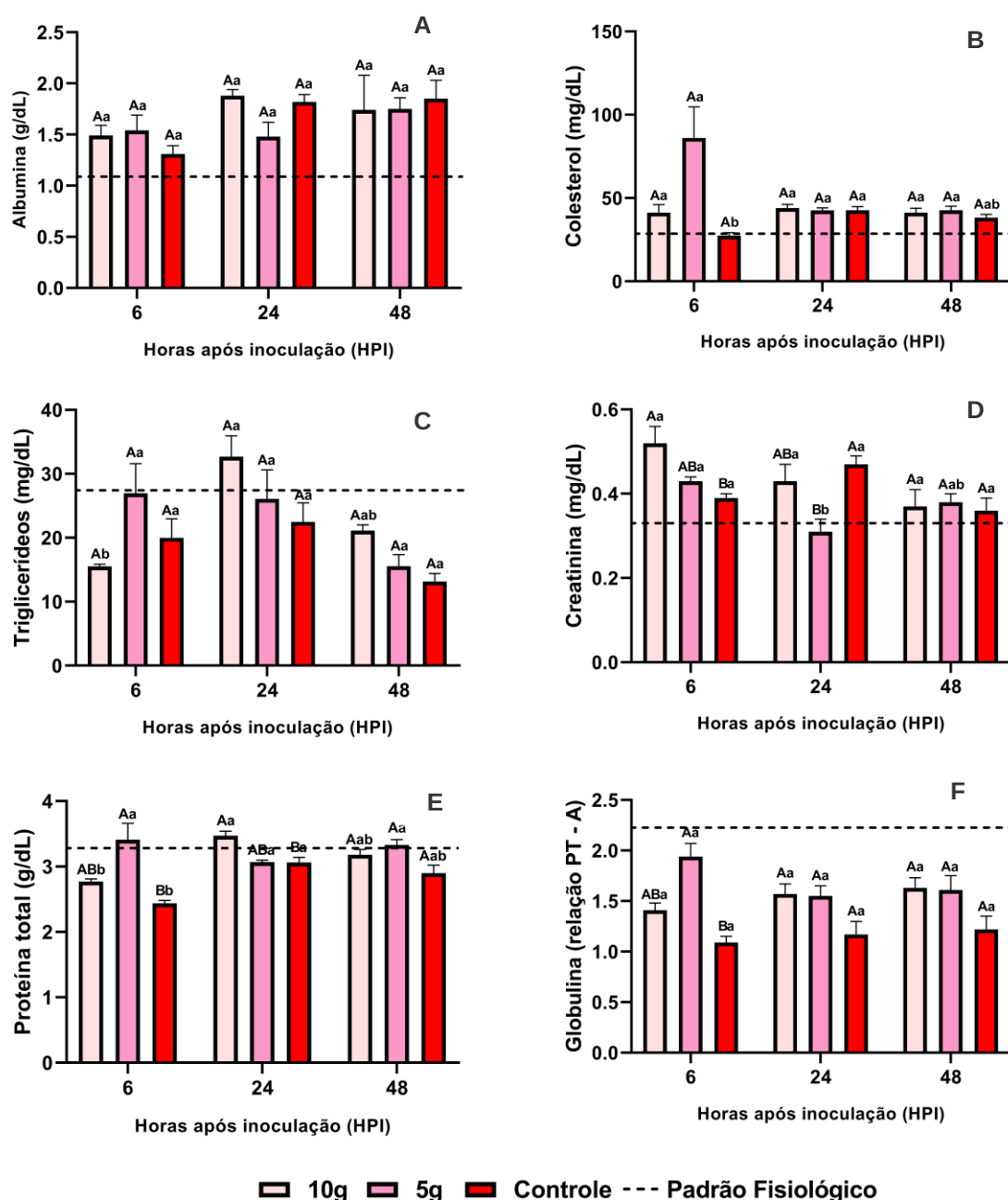


Figura 5. Avaliação bioquímica sérica. (5A). Albumina; (5B). Colesterol; (5C). Triglicerídeos; (5D). Creatinina; (5E). Proteína total; (5F) globulina. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPA); Tratamentos: Padrão Fisiológico: valores de referência peixes amostrados sem nenhum estímulo; 10g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – Animais

estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e não tratados com *Chlorella*.

3.1.5. Análise somática dos órgãos

A avaliação de peso dos animais assim como a análise somática de baço, fígado e rim, não apresentaram diferença significativa entre os diferentes tratamentos (Figura 6).

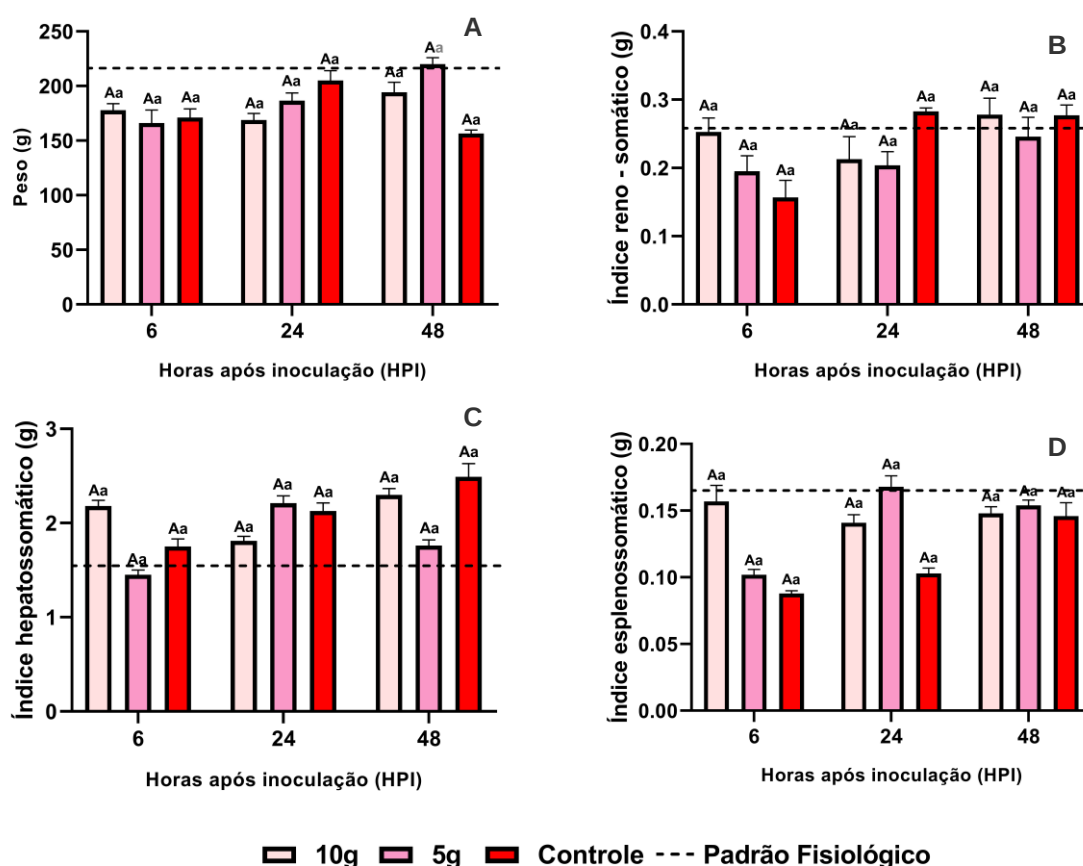


Figura 6. Análise somática dos órgãos. (6A). Peso; (6B). Índice reno-somático; (6C). Índice hepatossomático; (6D) Índice esplenossomático. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPA); Tratamentos: Padrão Fisiológico: valores de referência peixes amostrados sem nenhum estímulo; 10g – Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – Animais estimulados

estimulados com *Aeromonas hydrophila* e tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - Animais estimulados com *Aeromonas hydrophila* e não tratados com *Chlorella*.

4. DISCUSSÃO

A avaliação do acúmulo celular na aerocistite revelou elevadas contagens de células inflamatórias totais e linfócitos nos animais tratados com *Chlorella* (10 e 5g), quando comparadas aos animais controles, corroborando com os dados de Reque et al., (2010), na qual estimulou inflamação por aerocistite com *A. hydrophila* e submeteu ao tratamento suplementar com *Saccharomyces cerevisiae* e com isso obteve-se resultados semelhantes, indicando diminuição da intensidade da resposta com o passar do tempo nos animais controle, podendo estar relacionado a ação de mecanismos de controle endócrino da resposta inflamatória. Os elevados níveis de acúmulo celular nos animais submetidos ao tratamento com *Chlorella* no presente estudo, se justifica ao aumento da resistência ao desafio, na qual pode ser uma consequência do aumento da atividade fagocítica (Reque et al., 2010), levando ao maior recrutamento de células de defesa para a área lesada, contribuindo para uma maior resistência às infecções. Ademais, o lipopolissacarídeos presentes nas bactérias e as citocinas pró-inflamatórias ativam a célula do sistema imune para regular os estados inflamatórios (Sibi, G., & Rabina, S., 2016).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são considerados subprodutos de processos oxidativos celulares normais. Além disso, os níveis de ROS podem aumentar dramaticamente no estresse ambiental ou presença de patógenos (Kubatka et al., 2015). Isto justifica o ocorrido no presente estudo, pois a produção de ROS aumentou significativamente em animais controles 24 e 48H após estímulo com *Aeromonas hydrophila*, quando comparado aos animais tratados com *Chlorella*. Charlie-Silva et al., (2019) observou durante a reação inflamatória por *A. hydrophila* aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio em comparação ao grupo controle. Estudos realizados por Sibi (2015), mostrou que extratos de *Chlorella* apresentam atividade inibitória de ROS, reduzindo significativamente a produção do mesmo e consequentemente amenizando os danos celulares durante a inflamação. Uma vez que o estresse oxidativo e a inflamação são dois fatores

interligados na patogênese de várias doenças, algas como a *Chlorella* possuem efeitos antiinflamatórios que podem ser mediados pela supressão do stresse oxidativo (Abu-Serie et al., 2018)

Os exames hematológicos e bioquímicos são parâmetros fundamentais usados como parte da avaliação da saúde dos peixes (Oliveira et al., 2021 e Aracati, 2021) e alguns fatores podem influenciar esses parâmetros, tais como, condições ambientais, saúde, idade, espécie, maturidade sexual e estado nutricional (Khanl et al. 2017). Foi possível observar redução na contagem de eritrócito, associado ao aumento de hemoglobina, hematócrito, VCM e CHCM em todos os grupos quando comparados aos peixes do padrão fisiológico. Tais resultados são semelhantes ao de Abdulrahman (2014) que avaliou a *Spirulina* spp como suplemento alimentar em alevinos de carpa, observando aumento de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito. O mesmo autor relata que esses resultados podem ser devido ao aumento da produção de eritropoietina, à liberação de novos eritrócitos no sangue e à estabilidade eritrocítica (Abdulrahman, 2014).

De acordo com Khani et al. (2017), a hemoglobina e o hematócrito, fisiologicamente, são essenciais para a sobrevivência dos peixes, estando relacionadas à capacidade de ligação do oxigênio no sangue. Em contrapartida, resultados diferentes foram observados por Khani et al. (2017), onde os níveis de hemoglobina e hematócrito foram maiores em peixes alimentados com *C. vulgaris* dietético do que com a dieta controle.

A contagem de eritrócito é usada frequentemente para avaliar possíveis casos de efeitos colaterais indesejáveis, como é o caso da anemia, provocados por imunoestimulante administrado em ração suplementada (Khani et al., 2017).

De acordo com os resultados, possivelmente a suplementação com *Chlorella* desempenha papel fundamental na estimulação do estado imunológico dos peixes, tornando os peixes mais resistentes a condições ambientais inadequadas e a surtos de doenças infecciosas.

Na avaliação do leucograma do presente estudo, foi observado aumento significativo dos leucócitos totais, linfócitos e trombócitos dos animais submetidos a ambas as doses administradas (10 e 5g) em comparação ao grupo controle. A redução dos linfócitos no grupo controle pode estar relacionada ao cortisol em

resposta ao estresse, induzindo apoptose ou redistribuição dos linfócitos do sangue para o tecido (Abdelhamid et al, 2020). Ademais a diminuição dos leucócitos na corrente sanguínea observado no grupo controle pode ser um indicativo de imunossupressão do sistema imunológico (Simsek et al., 2007). Abdel-tawwab & Ahmad (2009) estudaram o efeito da *Spirulina* como promotor de crescimento e imunidade para tilápia do Nilo desafiada com *A. hydrophila* patogênica e observaram resultados semelhantes ao presente estudo, onde os peixes alimentados com a *Spirulina* obtiveram aumento do número de leucócitos em comparação ao grupo controle. Esses resultados indicam uma melhora na saúde dos peixes quando alimentados com dietas enriquecidas com *Chlorella*, além disso o incremento no número de leucócitos nos animais tratados com *Chlorella*, podem indicar elevação da imunidade e consequentemente aumento no desempenho zootécnico e resistência a patógenos (Abu-Elala et al., 2016).

O aumento de creatinina nos peixes tratados com *Chlorella* 6HPI é semelhantes aos resultados de Abdelhamid (2020), onde teve-se aumento em tilápias do Nilo tratadas com *Chlorella vulgaris* e β -glucana contra a toxicidade induzida por diazinon. Observou-se redução nos grupos tratados 24 HPI, sendo que a diminuição da creatinina plasmática em mamíferos possivelmente ocorre devido à diurese excessiva (Moraes et al., 2018). De acordo com Aracati (2021), em peixes de água doce, esse comportamento pode ser explicado pelo mecanismo de controle osmorregulador, pois quando os peixes estão em condições de estresse ocorre um desequilíbrio nas trocas iônicas resultando em maior absorção de água do meio ambiente. Nos peixes o organismo na tentativa de retirar o líquido aumenta a diurese, de modo que a creatinina seja eliminada (Oliveira, 2021).

A proteína desempenha um papel vital em várias funções biológicas e serve como blocos de construção para as células. De acordo com os resultados, a *Chlorella* provavelmente pode aumentar a proteína total, albumina e globulinas de tilápias do Nilo. As albuminas são sintetizadas pelo fígado e serviram como transportadores de proteínas (Anderson et al., 1979). As globulinas são sintetizadas pelo sistema de fagócitos mononuclear e desempenham papéis importantes no sistema imunológico (Kumar et al., 2012). Possivelmente a adição dietética de *Chlorella* pode aumentar a resposta imunológica de tilápias do Nilo. Khani et

al. (2017) afirmou que a *Chlorella* pode aumentar a proteína total sérica da carpa koi. Da mesma forma, Yildiz et al. (2004) e Yu et al. (2006) defendem que o aumento do nível de proteína sérica é um fator apropriado para exibir a condição imunológica dos peixes.

Aumentos significativos foram observados nos níveis séricos de triglicerídeos em peixes tratados com 10g de *Chlorella*. De acordo com Abdel-Tawwab (2020), esse aumento poderia ser um mecanismo compensatório para fornecer energia para melhorar o crescimento.

Os índices somáticos podem ajudar na avaliação do estado geral dos peixes e podem ser usados para detectar possíveis alterações nos órgãos. A *C. pyrenoidosa* utilizada no presente estudo não mostrou diferenças significativas nos índices somáticos dos peixes alimentados com ambas as doses administradas. Abdel-Tawwab et al., (2020) estudaram o uso de *C. pyrenoidosa* e *Daphnia magna* como suplementos alimentares para carpa e não observaram diferenças significativas nos fatores de condição ou índices somáticos de fígado, brânquias, vísceras, rins e baço, corroborando os achados do presente estudo. Esses resultados sugerem a uniformidade de crescimento de peixes alimentados com dietas enriquecidas com *C. Pyrenoidosa* sem aumento dos diferentes órgãos dos peixes.

Podemos concluir que dietas enriquecidas com *C. pyrenoidosa* podem ser consideradas promissoras devido a seu grande potencial na prevenção do desenvolvimento ou progressão da inflamação. A reação antiinflamatória causada pelo patógeno *A. hydrophila* pode ser reduzida pela inibição da produção de ROS e mediadores inflamatórios. A inibição significativa de mediadores inflamatórios e citocinas através de *Chlorella* sugere que essa microalga seria uma fonte potencial de desenvolvimento de agentes antiinflamatórios e uma boa alternativa para os antiinflamatórios convencionais.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelhamid FM, Elshopakey GE, Aziza AE (2020). Ameliorative effects of dietary *Chlorella vulgaris* and β -glucan against diazinon-induced toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & shellfish immunology**, v. 96, p. 213-222.
- Abdel-tawwab M, Abdulrahman NM, Baiz AI, Nader PJ, Al-refaiee IH (2020). The using of *Chlorella pyrenoidosa* and *Daphnia magna* as feed supplements for common carp, *Cyprinus carpio*: growth performance, somatic indices, and hemato-biochemical biomarkers. **Journal of Applied Aquaculture**, p. 1-15, 2020.
- Abdel-tawwab M, Ahmad MH (2009). Live *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 9, p. 1037-1046.
- Abdulrahman NM (2014). Evaluation of *Spirulina spp.* as food supplement and its effect on growth performance of common carp fingerlings. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 2, n. 2, p. 89-92.
- Abu-elala NM, Galal MK, Abd-elsalam RM, Mohey-Elsaeed O, Ragaa NM (2016). Effects of dietary supplementation of *Spirulina platensis* and garlic on the growth performance and expression levels of immune-related genes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Aquaculture Research and Development**, v. 7, n. 7, p. 433-442.
- Abu-serie MM, Habashy NH, Attia, WE (2018). In vitro evaluation of the synergistic antioxidant and anti-inflammatory activities of the combined extracts from Malaysian *Ganoderma lucidum* and Egyptian *Chlorella vulgaris*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-13.
- Anderson DP, Robertson BS, Dixon OW (1979). Plaque-forming cells and humoral antibody in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) induced by immersion in a *Yersinia rockery* O-antigen preparation. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 36, n. 6, p. 636-639.
- Anderson DP e Siwicki AK (1995). Basic hematology and serology for fish health programs, 185-202.
- Aracati M, Rodrigues L, Oliveira S, Moraes A, Prado E, Fernandes D, Belo M. Clinical safety of Zafirlukast treatment during acute inflammatory reaction in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Ars Veterinaria**, v. 37, n. 2, p. 67-73, 2021.
- Belo MADA, Schalch SHC, Moraes FR, Soares VE, Otoboni AMMB, Moraes JER (2005). Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, 133(2-3), 146-154.

- Belo MAA, Moraes JRED, Soares VE, Martins ML, Brum CD, Moraes, FRD (2012). Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47, 1015-1021.
- Belo MAA, Moraes FR, Yoshida L, Prado EJ, Moraes JRE, Soares VE, Silva MG (2014). Deleterious effects of low level of vitamin E and high stocking density on the hematology response of pacus, during chronic inflammatory reaction. **Aquaculture**, 422, 124-128.
- Belo MAA, Moraes FR, Yoshida L, Prado EJ, Moraes JRE, Soares VE, Silva MG (2014). Deleterious effects of low level of vitamin E and high stocking density on the hematology response of pacus, during chronic inflammatory reaction. **Aquaculture**, 422, 124-128.
- Brasil 1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura, Ministério da Pesca e Aquicultura, 1ed,136p, 2014.
- Carneiro PCF e Urbinati EC (2001). Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. **Aquac. Res.**, v.32, p. 297-304.
- Charlie-Silva I, Klein A, Gomes JM, Prado EJ, Moraes AC, Eto SF, Belo MA (2019). Acute-phase proteins during inflammatory reaction by bacterial infection: Fish-model. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.
- Castro MP, Claudiano GS, Petrillo TR, Shimada MT, Belo, MA, Marzocchi-Machado, CM, Moraes, FR (2014). Aerocistite aguda em tilápia do Nilo criada em gaiolas-rede e suplementada com carboquelato de cromo e *Saccharomyces cerevisiae*. *Fish & shellfish immunology*, 36 (1), 284-290.
- Cipriano RC (2001). *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemias of fish. **Fish Disease Leaflet**, v. 68, p. 1-25, 2001.
- Kim HJ, Yasuike M, Kondo H, Hirono I, Aoki T (2007). Molecular characterization and gene expression of a CXC chemokine gene from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Fish Shellfish Immunol.** London, v. 23, n. 6, p. 1275-1284.
- Khani M, Soltani M, Mehrjan MS, Foroudi F, Ghaeni M (2017). The effect of *Chlorella vulgaris* (*Chlorophyta*, *Volvocales*) microalga on some hematological and immune system parameters of Koi carp (*Cyprinus carpio*). **Iranian Journal of Ichthyology**, v. 4, n. 1, p. 62-68.
- Kruskal WH e Wallis WA (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. **Journal of the American statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 583-621.

- Kubatka P, Kapinová A, Kružliak P, Kello M, Výbohová D, Kajo K, Dobrota D (2015). Antineoplastic effects of *Chlorella pyrenoidosa* in the breast cancer model. **Nutrition**, v. 31, n. 4, p. 560-569.
- Kumar S, Raman RP, Kumar K, Pandey PK, Kumar N, Mallesh B, Mohanty S, Kumar A (2012). Effect of azadirachtin on haematological and biochemical parameters of Argulus-infected goldfish *Carassius auratus* (Linn. 1758). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 733-737.
- Moraes AC, Prado EJ, Foz EP, Barbuio R, Faria VP, Belo MA (2018). Hepatic steatosis alters cellular recruitment during induced aerocystitis in Nile tilapia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1570-1576.
- Moraes FR e Moraes JRE (2009). Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá. p. 625-723.
- MPA Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim de Estatística da Pesca e Aquicultura no Brasil no ano de 2011. MPA, Brasília, 60p, 2011.
- Natt MP e Herrick CA (1952). A new blood diluents for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Sci.*, v. 31, p. 735-738.
- Oliveira SL, Aracati MF, Rodrigues LF, Costa CC, Conde G, Moraes AC, Manrique WG, Charlie-Silva I, Belo MAA (2021). Clinical safety of Zafirlukast treatment during a foreign body inflammatory reaction in Nile tilapias, *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Development Research**, v. 11, n. 6, p. 47914-47919.
- Reque VR, Moraes JRE, Belo MAA, Moraes FR (2010). Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. **Aquaculture**, 300(1-4), 37-42.
- Sahoo PK (2005). Non- specific immune responses in juveniles of Indian *major carps*. **J Appl Ichthyol**, 21(2):151-155.
- Sibi G (2015). Inhibition of lipase and inflammatory mediators by *Chlorella* lipid extracts for antiacne treatment. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 6, n. 1, p. 7.
- Sibi G e Rabina S (2016). Inhibition of pro-inflammatory mediators and cytokines by *Chlorella vulgaris* extracts. **Pharmacognosy research**, v. 8, n. 2, p. 118.
- Simsek N, Karadeniz A, Karaca T (2007). Effects of the *Spirulina platensis* and *Panax ginseng* oral supplementation on peripheral. **Revue Méd. Vét**, v. 158, n. 10, p. 483-488.

- Yildiz FH, Liu XS, Heydorn A, Schoolnik GK (2004). Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. **Molecular microbiology**, v. 53, n. 2, p. 497-515.
- Yogananth N, Bhakayaraj R, Chanthuru A, Anbalagan T, Mullai Nila K (2009). Detection of Virulence Gene in *Aeromonas hydrophila* Isolated from Fish Samples Using PCR Technique, **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 4, p. 51-53.
- Yu J, Starr DA, Wu X, Parkhurst SM, Zhuang Y, Xu T, Han M (2006). The KASH domain protein MSP-300 plays an essential role in nuclear anchoring during *Drosophila* oogenesis. **Developmental biology**, v. 289, n. 2, p. 336-345.

CAPITULO 3 – Avaliação da suplementação com alga verde *Chlorella pyrenoidosa* no tempo de prateleira de filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Leticia Franchin Rodrigues¹, Mayumi Fernanda Aracati¹, Susana Luporini de Oliveira¹, Camila Carlino da Costa¹, Romário Alves Rodrigues², Hirasilva Borba³, Ives Charlie da Silva⁴, Beatriz Caroline Cabral Ibelli⁵, Beatriz Baldissarelli⁵, Marco Antonio de Andrade Belo^{1,5}

¹ Department of Preventive Veterinary Medicine of Unesp, School of Agrarian and Veterinary Sciences, Sao Paulo State University (UNESP), Jaboticabal/SP.

² Department of Microbiology of Unesp, School of Agrarian and Veterinary Sciences, Sao Paulo State University (UNESP), Jaboticabal/SP.

³ Department of Technology, School of Agrarian and Veterinary Sciences, Sao Paulo State University, Jaboticabal/SP.

⁴ Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (ICB-USP), São Paulo/SP.

⁵ Laboratory of Animal Pharmacology and Toxicology, University of Brazil, Descalvado/SP.

RESUMO - Os pescados são alimentos altamente perecíveis e facilmente alterados por agentes físicos, químicos e biológicos, tornando seu tempo de prateleira um fator importante. Partindo-se da participação benéfica dos antioxidantes na saúde animal e à necessidade de desenvolvimento de estratégias para segurança alimentar, o estudo teve por objetivo avaliar o tempo de prateleira de filés de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com *Chlorella pyrenoidosa*. Para o estudo foram utilizadas 84 tilápias do Nilo (± 100 g) sendo acondicionadas aleatoriamente em 12 aquários (n=7). Após aclimação, rações contendo *Chlorella pyrenoidosa* foram ministradas por 30 dias, constituindo os tratamentos: T0(sem tratamento com *C. pyrenoidosa*); T1(tratados com 5g de *C. pyrenoidosa*/kg de ração); T2(tratados com 10g de *C. pyrenoidosa*/kg de ração). Após o abate por hipotermia, foi realizada filetagem e mantidos em refrigeração a 4°C e avaliados nos períodos: 0, 7, 15 e 30 dias pós abate. Foi realizada a avaliação do tempo de prateleira dos filés de tilápia por meio de determinação da qualidade microbiológica (colimetria, contagem de microrganismos mesófilos e psicotróficos, *Staphylococcus* spp e *Enterobacteriaceae*), análise físico-química (colorimetria, pH, produção de ácido tiobarbitúrico) e análise sensorial. As tilápias suplementadas com *C. pyrenoidosa* apresentaram diminuição comparados aos animais controle nas análises de colimetria, microrganismos mesófilos, psicotróficos e enterobactérias, contagem de *Staphylococcus* não apresentou diferença significativa. Animais controles apresentaram maior oxidação lipídica com 30 dias e aumento progressivo do pH. Aumento na luminosidade (L*) e (ΔE) nos animais tratados com 10g, a análise colorimétrica de (a*) e (b*). Na análise sensorial de brilho, aparência, firmeza causou aumento nos animais tratados e diminuição do odor no grupo controle. Os dados sugerem que a suplementação com ambas as doses (5g e 10g) da microalga melhoram a qualidade microbiológica e sensorial, além de retardar o processo de oxidação lipídica de tilápia durante 30 dias de tempo de prateleira.

Palavra-chave: antioxidante, ciclideos, *Chlorella pyrenoidosa*, flavonoide, *Oreochromis niloticus*, saúde alimentar.

1. INTRODUÇÃO

O tempo de prateleira é uma função do tempo, fatores ambientais e suscetibilidade que o produto sofre mudando sua qualidade. A deterioração que ocorre nos produtos alimentícios é devido á alterações físicas, químicas e biológicas, podendo comprometer a qualidade nutricional, microbiológica ou sensorial do alimento (Giménez, 2012).

Ao longo do processo de deterioração, o pescado apresenta sinais de alterações, como aromas e sabores desagradáveis, formação de muco, produção de gás, coloração anormal, alterações na textura, isto se deve à devido à autólise, oxidação, atividade bacteriana ou ainda pela combinação desses processos, interferindo diretamente no prazo de validade. O principal método para avaliação da qualidade do peixe fresco é a sensorial, sendo a principal forma de avaliar o frescor do pescado (Amaral, 2013).

A utilização de antioxidantes é uma das principais manobras para retardar a deterioração oxidativa e microbiana do alimento pois são capazes de prolongar ou inibir a oxidação (Takyar et al., 2019). Para aumentar a vida útil dos alimentos é necessário o equilíbrio entre os níveis de oxidação e a ação dos antioxidantes (Oliveira et al., 2022).

A *Chlorella pyrenoidosa* é uma alga verde, usada como suplemente nutricional para humanos e animais (Hongyang et al., 2011) sua é coloração verde por possuírem clorofila-a e b, além disso, contem outros pigmentos como carotenoides α , β e γ e diversas xantofilas (Sousa, 2021). A adição de carotenóides na dieta está sendo uma prática comum na aquicultura, o seu uso na alimentação de peixes melhora a qualidade da carcaça e antioxidante (Rosas, 2019), capazes de melhorar as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais em pescados (Aracati, 2021).

Partindo-se da importância nutricional do pescado para a nutrição humana e da necessidade de estabelecer estratégias para aumentar a qualidade do pescado durante o armazenamento, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito antioxidativo da *Chlorella pyrenoidosa*, administrada via oral na ração, sobre o tempo de prateleira de filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio das análises

microbiológicas, físico-químicas e sensoriais utilizadas para avaliar o frescor e a qualidade do pescado durante 30 dias de armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP/FCAV – Campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil sob o protocolo número 3423/20.

2.1. Animais

Para o estudo foram utilizadas 84 tilápias do Nilo (*O. niloticus*) ($\pm 100\text{g}$) oriundas da mesma desova, acondicionadas em 12 aquários ($n=7$), com capacidade de 100L de água cada, abastecidos com água corrente desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano, com vazão de 1 L/min. Após o transporte para os aquários, os peixes foram aclimatados durante 15 dias para a concentração plasmática de cortisol e osmolaridade voltem aos níveis basais. Nos primeiros três dias de aclimação, os animais foram submetidos a banhos em solução de NaCl na concentração de 6,0g/L (Carneiro e Urbinati, 2001). Receberam ração comercial peletizada (32% de proteína bruta), constituindo a dieta basal. O arraçoamento dos animais foi feito três vezes ao dia, correspondendo a 2% da biomassa dos aquários. A qualidade da água foi monitorada nos momentos da alimentação durante todo período experimental, utilizando pHmetro YSI-63 e oxímetro YSI-55, e seus valores permaneceram dentro da faixa apropriada para o bem-estar dos peixes tropicais (Boyd, 1990) (dissolvido oxigênio = $4,07 \pm 0,89 \text{ mg L}^{-1}$; temperatura = $27,64 \pm 2,05^\circ\text{C}$; pH = $7,64 \pm 0,54$; e condutividade = $208,29 \pm 97,57 \mu\text{S/cm}$).

2.2. Dieta Experimental

A composição da dieta basal seguiu às exigências para tilápias, estabelecidas no NRC, através da utilização de ração comercial peletizada (LAGUNA® - Sociedade Social, contendo 32% de proteína bruta, 7%, extrato etéreo, 5% de fibra bruta e 12%

de matéria mineral). O arraçoamento dos animais foi feito três vezes ao dia, sendo 8:00 horas, 13:00h e 18:00h, correspondendo a 2% da biomassa dos aquários.

Para a padronização da dieta experimental contendo a *Chlorella pyrenoidosa*, foi adicionado a ração comercial 5 e 10 g/Kg de ração, seguindo o estudo de Abdulrahman et al. (2014).

Para o preparo das dietas, a ração era pesada na proporção do peso médio da tilápia de cada tanque e adicionado 2% de óleo vegetal mais as respectivas quantidades de *Chlorella* (5 e 10g/kg) e armazenadas em sacos plásticos escuro mantidos a 9°C para uso durante o período experimental de um mês previamente ao abate dos animais. A dieta dos animais controle sem *Chlorella* foi misturada com 2% de óleo vegetal para manter a padronização do equilíbrio nutricional.

2.3. Delineamento experimental

As tilápias foram distribuídas aleatoriamente em 12 aquários (100 L de água, n=7) para compor os seguintes tratamentos: T0 (sem tratamento com *Chlorella pyrenoidosa*); T1 (tratados com 5g de *Chlorella pyrenoidosa*/kg de ração); T2 (tratados com 10g de *Chlorella pyrenoidosa*/kg). Após um mês de suplementação com *C. pyrenoidosa*, os animais foram abatidos e amostras de filés foram avaliados para determinação das análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais, constituindo os seguintes períodos: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPA) (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das amostras dos filés nos diferentes tratamentos para determinação da análise microbiológica e físico-química

Grupos	Tratamentos ¹	DPA (Dias pós-abate ²)			
		0	7	15	30
T 0	Controle (sem tratamento com <i>C. pyrenoidosa</i>)	N = 7	N = 7	N = 7	N = 7
T 1	Tratado com 5g/kg de <i>C. pyrenoidosa</i>	N = 7	N = 7	N = 7	N = 7
T 2	Tratado com 10g/kg de <i>C. pyrenoidosa</i>	N = 7	N = 7	N = 7	N = 7

¹ T0 (controle) – inoculado e não tratado; T1 – inoculado e tratado com 5g; T2 – inoculado e tratado com 10g.

² Inoculação da bacterina de *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória das tilápias.

2.4. Abate e retirada dos files

O método de abate aplicado foi o de hipotermia, com uma mistura de água hiperclorada com 5ppm e gelo na proporção de 2:1. A mistura foi adicionada em uma caixa de isopor com capacidade de 15L revestidas com sacos plásticos esterilizados, onde foram colocados os peixes e mantidos por 3 minutos até ficarem anestesiados, os plásticos e facas eram trocados a cada grupo. Após a insensibilização dos animais, foi realizada a descerebração do tronco encefálico. O processo de filetagem foi realizado por uma única pessoa, o filé foi repartido ao meio, obtendo-se duas partes (direita e esquerda) mantendo a parte da musculatura dorsal nas duas laterais do peixe no sentido longitudinal, ao longo de toda a extensão da coluna vertebral e costelas. Uma parte foi destinada à análise microbiológica e a outra para análise físico-química. Foi realizado padronização, onde o lado esquerdo do peixe foi usado para análise microbiológica e o lado direito para análises físico-químicas durante o período experimental de 30 dias.

Após a filetagem os filés foram armazenados em sacos plásticos esterilizados, e levados ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, onde foi feito o armazenamento em estufa incubadora B.O.D. (Biologic Oxygen Demand) com temperatura controlada a 4°C.

2.5. Análises microbiológicas

2.5.1. Preparação das diluições

Em condições assépticas, retirou-se, aleatoriamente de cada amostra, fragmentos representando toda a superfície e profundidade do file avaliado até atingir a quantidade de 10g. Após a pesagem, adicionou-se 90 mL de água peptonada a 0,1% (diluyente já esterilizado) e homogeneizou por aproximadamente 60 segundos no equipamento tipo Stomacher, preparando-se, assim, a diluição inicial 10^{-1} . Posteriormente, foram feitas as diluições seriadas 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} retirando-se uma alíquota de 1 mL da diluição inicial e transferindo para tubos contendo 9 mL de água peptonada a 0,1%, assim sucessivamente até a diluição 10^{-4} (Silva et al 2017).

2.5.2. Número mais provável de coliformes totais e termotolerantes

A determinação do Número Mais Provável (NMP) foi utilizada para estimar a contagem de coliformes totais e termotolerantes. Inicialmente na prova presuntiva, inoculou-se uma alíquota de 1 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em uma série de três tubos estéreis, com tubos Durham invertidos, contendo caldo Lauril Sulfato Triptose (LST; os tubos foram incubados por 48 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Foram considerados tubos positivos àqueles que evidenciaram a formação de gás em pelo ao menos 1/10 do tubo de Durhan ou efervescência, quando agitado gentilmente; e foram selecionados para a realização da prova confirmativa. A confirmação dos coliformes totais e termotolerantes foi realizada por meio do repique (em alça de platina) dos tubos positivos em LST para o caldo Bile Lactose Verde Brilhante, incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}/48$ horas, e para o caldo EC, incubados a $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C} /48$ horas em banho-maria; respectivamente (Silva et al 2017).

2.5.3. Contagem Padrão de microrganismos Mesófilos e Psicrotróficos aeróbios estritos e facultativos viáveis

Para a contagem dos microrganismos mesófilos semeou, por profundidade, 1mL de cada diluição em placas de Petri estéreis e adicionou 15-20 mL de ágar padrão para contagem (Plate Count Agar - PCA), previamente fundido e mantido a $46-48^\circ\text{C}$. As placas foram homogeneizadas e incubadas a 36°C por 48 horas. Posteriormente, realizou-se a leitura das placas, o número de colônias foi multiplicado pelo fator de diluição correspondente, e o resultado expresso em unidades formadoras de colônia por g (UFC/g) (Apha, 2001). O mesmo procedimento foi utilizado para a contagem de microrganismos psicrotróficos, contudo as placas foram incubadas a 7°C por um período de 10 dias (Silva et al 2017).

2.5.5. Contagem de *Staphylococcus*

Para contagem de *Staphylococcus aureus* foram adicionados, por profundidade, 1 mL de cada diluição em placas de petri estéreis e, posteriormente, acrescentado cerca de 15 a 20 mL de ágar Baird-Parker suplementado com solução de gema de ovo com telurito de potássio. As placas foram invertidas e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 30 a 48 horas. Após o crescimento bacteriano, três a cinco colônias típicas (negras

brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio) e atípicas (acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo) foram selecionadas e semeadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI), para realização das provas bioquímicas.

2.5.5.1. Prova da coagulase

Transferiu-se 0,3 mL de cada tubo de cultivo em BHI para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho. Estes, foram incubados em banho maria a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas, a leitura realizada nos tempos 1h, 2h, 3h, 4h e 24h, baseou-se na comprovação da capacidade de coagular o plasma de coelho pela ação da enzima coagulase produzida pelo microrganismos (Silva et al 2017).

2.5.5.2. Coloração de Gram

Colônias da bacteria foram colocadas sob a lâmina, depois se seca, esta foi coberta com solução de cristal violeta por 1 minuto, depois de desprezado, cobriu-se com lugol por 1 minuto e por ultimo, com solução de fuscina por 30 segundos. Desprezou-se e lavou-se a lâmina com água corrente. A lâmina foi seca e observada ao microscópio óptico com objetiva de imersão (Silva et al 2017).

2.5.5.3. Prova da catalase

Com auxílio de alça de platina foi retirada uma alçada do cultivo em BHI e transferido para uma lâmina contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. A formação de borbulhas indica prova que o microrganismos é catalase positiva. O *Staphylococcus aureus* possui a enzima catalase que, por sua vez, é capaz de decompor o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio, que é evidenciado pela formação de borbulhas (Silva et al 2017).

2.5.6. Contagem de enterobacteriaceae

Inoculou-se 1 mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas e adicionou-se cerca de 15 mL Ágar MacConkey previamente fundido e mantido a 46°C - 48°C , em seguida, homogeneizou o inóculo com o meio. Após completa solidificação do meio,

as placas foram incubadas em posição invertida em temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Três a cinco colônias típicas foram selecionados e semeadas em tubos contendo BHI, para realização da coloração de gram (conforme supracitado) e a prova da oxidase (MAPA, 2003; Forsythe, 2020).

2.5.6.1. Prova de oxidase

Usando alça de platina foi feita a prova da oxidase espalhando a cultura sobre tiras de papel impregnadas com reativo para oxidase, comercialmente disponíveis. Foi feita a leitura em 10 a 20 segundos. As colônias confirmadas pela prova da oxidase e pela coloração de gram foram calculadas proporcionalmente às UFC obtidas, para obtenção da contagem final. (MAPA, 2003).

2.6. Análise físico – química

2.6.1. Determinação do pH

O pH foi determinado em duplicata no músculo epaxial, utilizando-se um pHmetro digital (Testo ®, modelo 205. West Chester, PA- EUA), equipado com um eletrodo de penetração, por inserção direta.

2.6.2. Colorimetria

Foi determinado através do colorímetro CR-400 Chrome Meter (Konica Minolta Sensing Americas, Inc, New Jersey, EUA) que utiliza o sistema CIELAB (L^* , a^* e b^*), proposto pela Commission Internationale l'Eclairage (1986). Foram avaliados parâmetros como luminosidade (L^*), intensidade do vermelho (a^*) e intensidade do amarelo (b^*) dos músculos epaxiais. A avaliação foi realizada em três pontos diferentes em cada parte do músculo, para obtenção de uma média dos valores. A intensidade da cor é expressa por um valor de croma (C^*_{ab}), enquanto a matriz (H^*_{ab}) corresponde ao nome da cor encontrada em seu estado puro no espectro. Esses valores foram calculados pelas fórmulas: $C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ e $H^*_{ab} = \arctan(b^* / a^*)$ de acordo com Hernández et al. (2009).

2.6.3. Oxidação lipídica (TBARS)

Para cada amostra pesou-se de 5g do filé e foi colocado em tubo falcon para análise de oxidação lipídica seguindo a metodologia descrita por Pikul (1989), ao qual foram adicionados 25 mL de ácido TCA (7,5%) -tricloroacético (1 tubo de cada vez, visto que o ácido resseca a amostra). A mistura foi moída em Turrax por 1 minuto e então filtrada através de outro tubo falcon. Todas as amostras foram retiradas em triplicata, e 5mL de TBA (0,01M) (ácido tiobarbitúrico) foram adicionados em 5mL do extrato, a seguir a mistura foi levada ao banho-maria a 100 ° C por 40 minutos, cobrindo o tubo de ensaio com mármore. A determinação dos TBARS (ácido 2-tiobarbitúrico, expresso em mg de malonaldeído / kg de amostra) foi realizada em espectrofotometria a 532nm.

2.6.4. Análise sensorial

A qualidade sensorial da tilápia do Nilo foi avaliada em cada período de amostragem por 5 provadores treinados. Amostras de peixes (50g) da região dorsal foram apresentadas individualmente aos painelistas em cabines individuais sob condições controladas de luz, temperatura e umidade. Os painelistas foram solicitados a classificar as características de brilho, firmeza, aparência e odor com uma escala de 1 a 10, sendo 10 o melhor estado e 1 o pior (Aracati, 2022).

2.7. Análise estatística

As diferenças entre os tratamentos (10g, 5g e controle) e o tempo (0, 7, 15 e 30 dias) foram determinadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal e Wallis (1952) com o software GraphPad Prism versão 9.0. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1. Análises Microbiológicas

Os resultados observados na análise microbiológica dos pescados estão expressos na Figura 1.

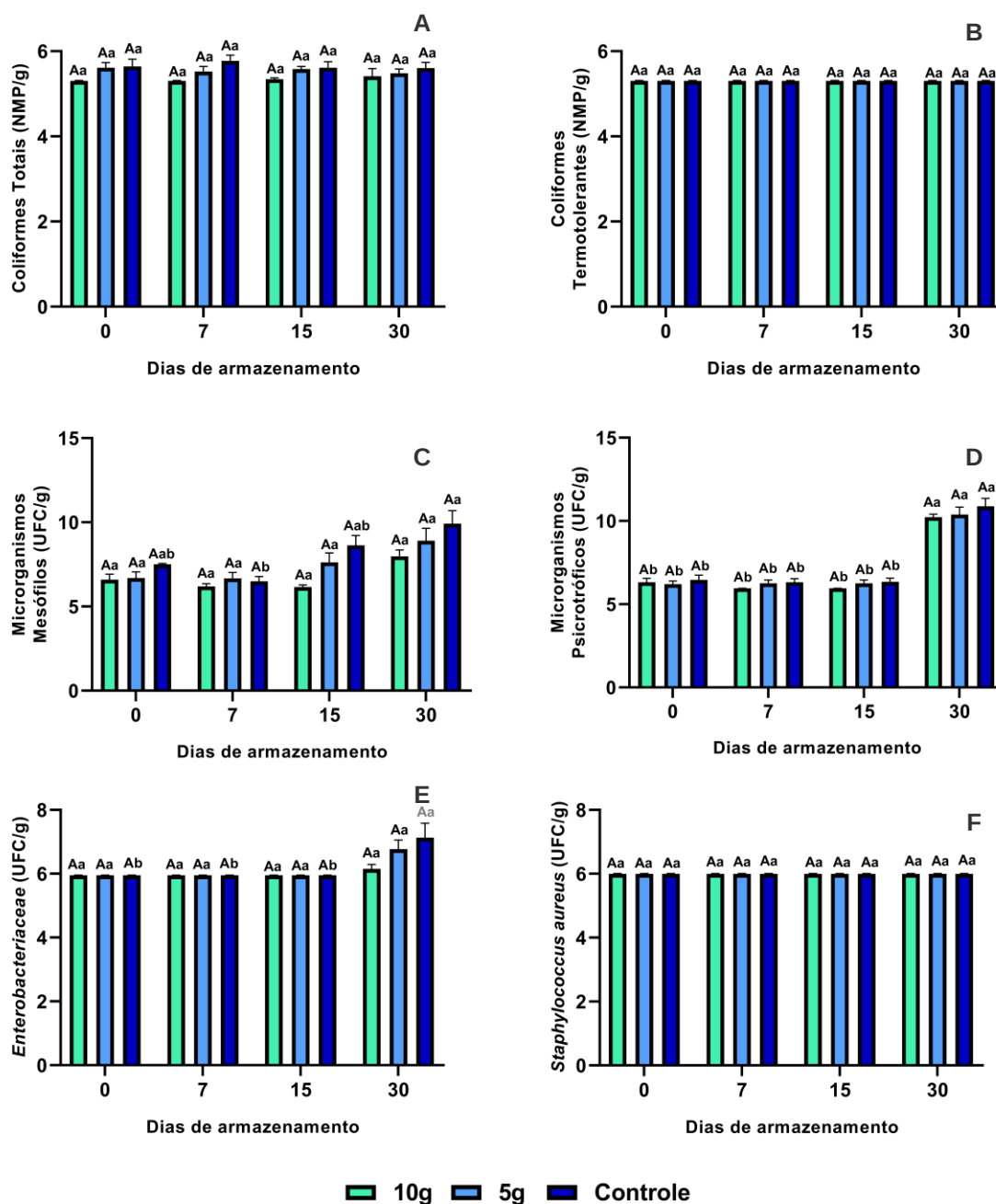


Figura 1. Análise Microbiológica. (1A). Coliformes totais; (1B). Coliformes termotolerantes; (1C). Microorganismos Mesófilos; (1D) Microorganismos psicrótrópicos; (1E) *Enterobacteriaceae*; (1F) *Staphylococcus aureus*. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPA); Tratamentos: 10g – tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - não tratados com *Chlorella*.

Os resultados do NMP de coliformes não apresentaram diferença significativa ($p>0.05$) nos coliformes totais e termoletrantes, porém foi observado que os animais do grupo controle foram superiores que os animais tratados com a *Chlorella pyrenoidosa*.

A contagem de microrganismos mesófilos não apresentou diferença significativa entre os grupos, porém quando observados ao longo do tempo, mostraram que o tempo de prateleira do pescado no grupo controle com 30 dias de armazenamento foi significativamente maior quando comparado ao de 7 dias.

Foram observados com 30 dias de refrigeração que as contagens dos microrganismos Psicotróficos foram superiores que os períodos anteriores (0, 7 e 15) em todos os grupos. Embora não tenha visto diferença estatística entre os grupos, foram observadas contagens elevadas de microrganismos Psicotróficos em animais do grupo controle em relação aos animais tratados.

Os resultados observados na contagem de colônias de enterobacterias apresentaram aumento significativo no grupo controle com 30 dias de tempo de prateleira comparado aos dias anteriores, tendo em vista os animais tratados com a alga se mantiveram estáveis.

Não foi detectado contagens de *Staphylococcus spp* nos filés de tilápia armazenados durante 30 dias a 4°C.

3.2. Análise físico-química

O nível de TBARs (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e pH, não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 2).

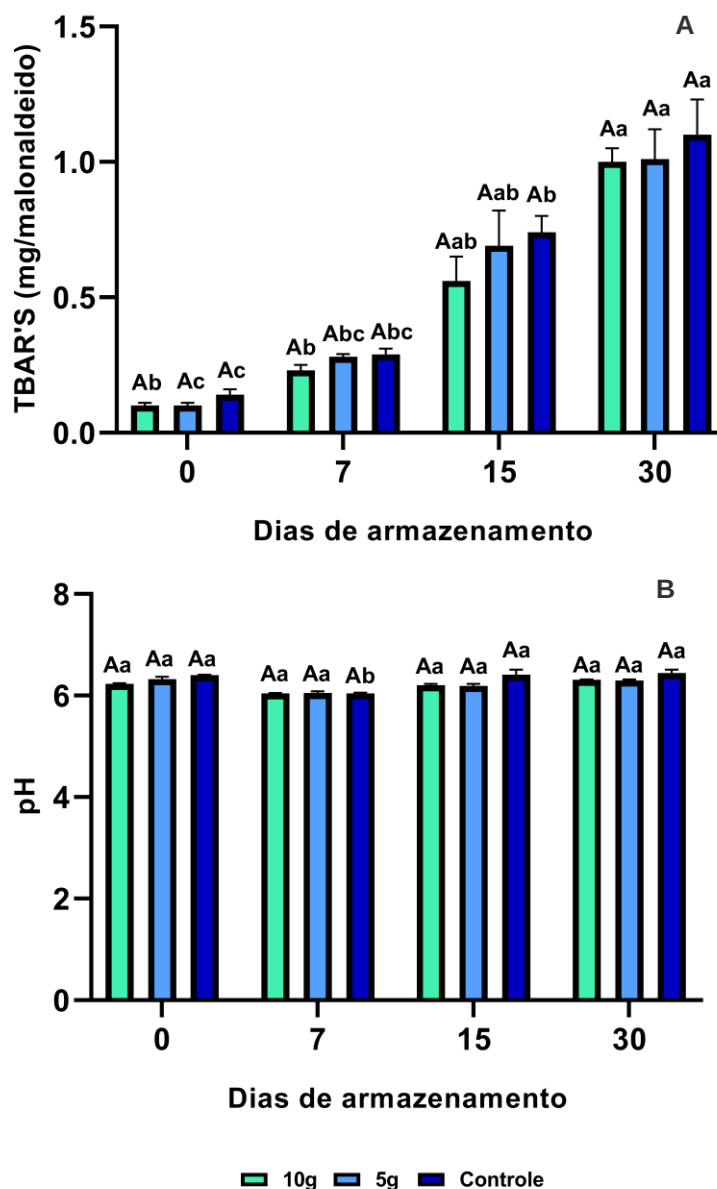


Figura 2. Análise de TBARs (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e pH. (2A). TBARs; (2B). pH; Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPA); Tratamentos: 10g – tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - não tratados com *Chlorella*.

Notou-se que ao longo do tempo todos os grupos apresentaram maior oxidação lipídica com 30 dias de vida de prateleira, entretanto quando observados ao longo do

tempo, os animais do grupo controle apresentaram níveis mais expressivos, enquanto os animais tratados com *Chlorella* (5g e 10g) começaram apresentar maior oxidação lipídica a partir do 15º dia de refrigeração a 4°C.

Na análise de pH foi observado uma redução significativa ($p > 0.05$) com 7 dias no grupo controle, seguido de aumento progressivo com 15 e 30 dias pós abate, entretanto, os animais tratados com o antioxidante não apresentaram diferença significativa ao longo do tempo.

Os resultados observados das análises de colorimetria dos filés estão expressos na Figura 3.

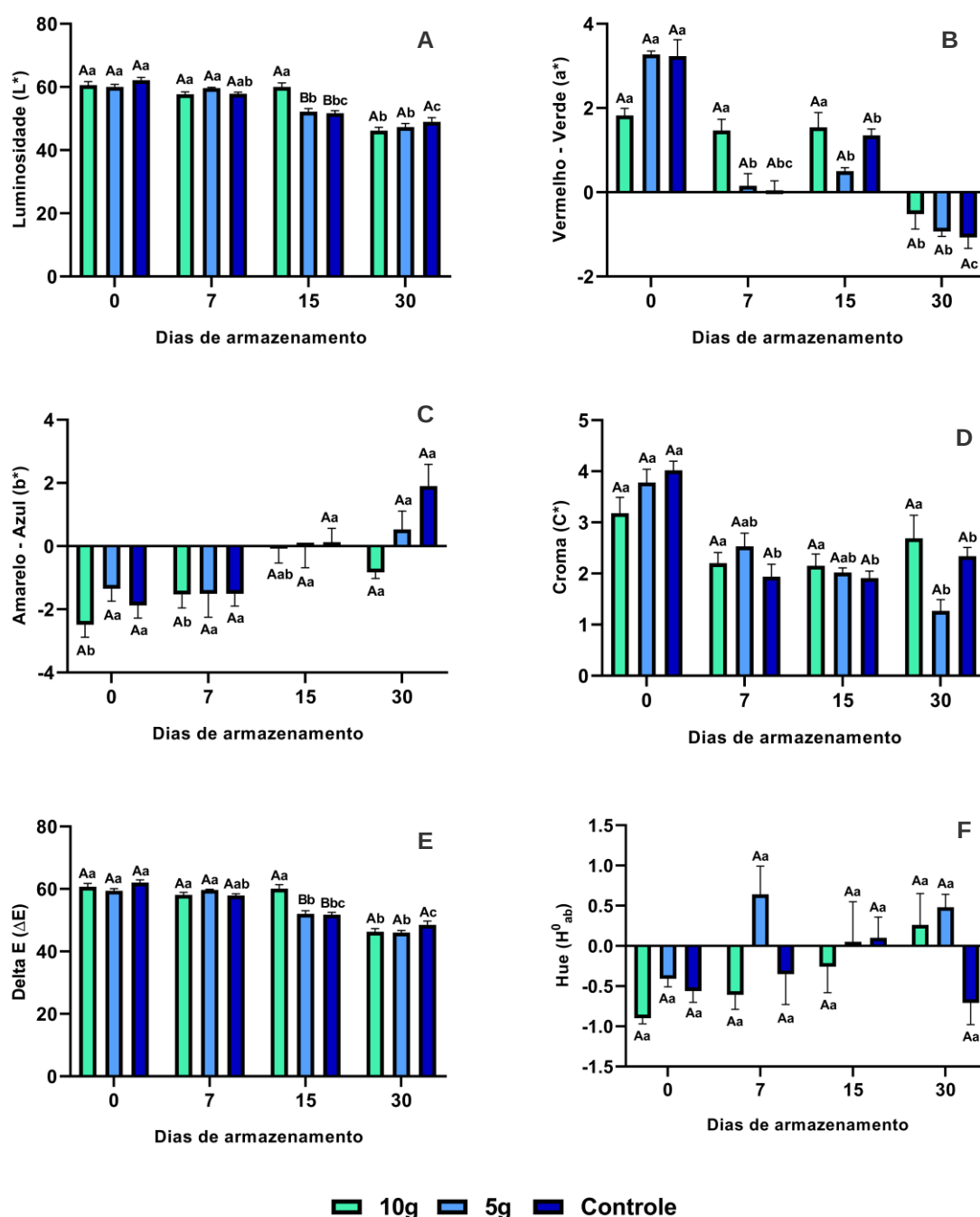


Figura 3. Análise colorimétrica. (3A). Luminosidade (L*); (3B). Vermelho-verde (a*); (3C). Amarelo-azul (b*); (3D) Croma (C*); (3E) Delta E (ΔE); (3F) Hue (H°_{ab}). Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis (P < 0,05). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPA); Tratamentos: 10g – tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - não tratados com *Chlorella*.

Nas avaliações colorimétrica de luminosidade (L^*) e Delta (ΔE) apresentaram aumento nos animais tratados com 10g de *Chlorella* em 15 dias pós abate em comparação aos tratados com 5g e ao grupo controle. Ao longo do tempo foi observada diminuição em ambas as avaliações nos animais tratados com 10g da alga após 30 dias de armazenamento, entretanto, os animais tratados com 5g do antioxidante começaram apresentar diminuição após 15 dias de refrigeração. Logo, animais do grupo controle foram inferiores no 7º dia de refrigeração.

A análise colorimétrica da cor Vermelho a verde (a^*) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Porém, ao longo do tempo foi notado diminuição em ambos os grupos, sendo mais significativo no grupo controle quando comparado aos animais tratados com *Chlorella*.

O componente Amarelo a azul (b^*) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Contudo, foi observado aumento no grupo tratado com 10g de alga ao longo do tempo.

Na análise de índice de saturação de Chroma não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Porém, apresentou diminuição gradativa ao longo do tempo nos grupos tratado com 5g de alga e controle. Enquanto os animais tratados com 10g não apresentaram diferença significativa.

Em relação ao Delta (ΔE) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Embora, quando observados ao longo do tempo ambos os grupos apresentaram aumento, sendo mais expressivo nos animais controle.

O componente ângulo de inclinação de matriz (H^0_{ab}) não apresentou diferença significativa.

Os resultados observados na análise sensorial dos pescados foram pontuados as seguintes características, brilho, firmeza, aparência e odors sendo expressos na Figura 4.

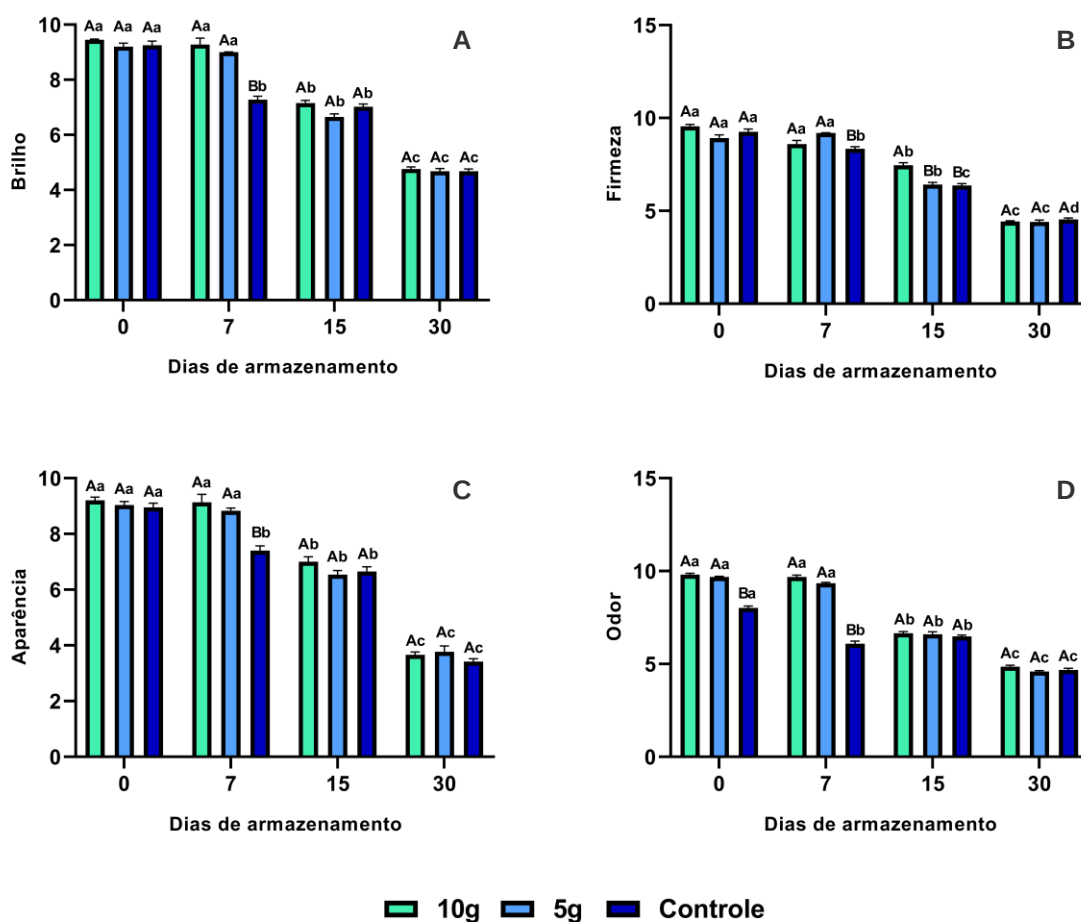


Figura 4. Análise sensorial. (4A). brilho; (4B). firmeza; (4C). aparência; (4D) odor;. Médias (9 = peixes) seguidas da mesma letra do não diferem pelo teste de Kruskal e Wallis ($P < 0,05$). As letras maiúsculas comparam os tratamentos em cada período experimental, enquanto as letras minúsculas avaliam a evolução de cada tratamento entre os períodos experimentais. Período de amostragem: 0, 7, 15 e 30 dias pós-abate (DPA); Tratamentos: 10g – tratados com 10g de *Chlorella*; 5g – tratados com 5g de *Chlorella*; Controle - não tratados com *Chlorella*.

A análise de brilho e cor foram superiores nos animais tratados com a alga em 7 dias em relação ao grupo controle. Quando observados ao longo do tempo os animais do grupo controle tiveram diminuição progressiva a partir do 7º dia de

refrigeração, já os animais tratados com a *Chlorella* apresentaram diminuição a partir do 15º dia pós abate.

Os animais tratados com a alga apresentaram maior firmeza 7 dias pós abate em relação ao grupo controle, entretanto, após 15 dias de refrigeração os animais tratados com 10g de *Chlorella* se mantiveram superiores em comparação aos tratados com 5g e ao grupo controle. Ao decorrer da tempo de prateleira observou-se diminuição do grupo controle a partir do 7º dia, todavia, os animais tratados apresentaram perda da firmeza a partir de 15 dias de refrigeração.

Quanto a análise de odor os animais tratados com antioxidante apresentaram melhores classificações em comparação ao grupo controle em 0 e 7 dias de armazenamento. Ao decorrer do tempo de refrigeração dos filés notou-se diminuição a partir do 7º dia nos animais controle, porém, os animais tratados com a *Chlorella* tiveram essa redução apenas a partir do 15º dia de refrigeração.

3. DISCUSSÃO

Coliformes totais e coliformes termotolerantes são indicadores para avaliar condições higiênicas e sanitárias do alimento, e prever a presença de microrganismos patogênicos (Oliveira, 2022). De acordo com Liu et al., (2020) as algas podem potencialmente promover a remoção de coliformes totais e termotolerantes, reforçando os resultados da colimetria do presente estudo, visto que, a presença de coliformes totais foi superior nos animais controle. Gatti-junior et al., (2014) estudaram a qualidade microbiológica de tilápias inteiras e filetadas e verificaram que a pele é o tecido com maior contaminação em relação a intestino e musculo, essa contaminação esta associada ao manuseio e qualidade do gelo usada no armazenamento.

O pescado é um alimento de alta qualidade nutricional, porém é altamente suscetível à deterioração microbiana. Contagens de microrganismos mesófilos e psicrotófilos estão associados a contaminação durante a manipulação, além disso são usados como indicadores relacionados ao frescor (Soares et al, 2011). De acordo com Stejskal et al., (2020) que estudou a qualidade do músculo de pescada refrigerada por embalagem ativa com um concentrado de proteína de *Spirulina platensis*, apresentaram contagens menores para microrganismos mesófilos,

psicotróficos e *Enterobacteriaceae* nos músculos incorporados com a *Spirulina* no meio da embalagem em comparação ao grupo controle. Aracati, (2021) estudou o tempo de prateleira de filé de tilápia tratadas com astaxantina e observou que a o antioxidante reduziu as contagens de microrganismos mesófilos e psicotróficos. Esses mesmos resultados foram observados por Santos et al., (2017) que estudou vida de prateleira de filé de tilápia defumada revestida com quitosana. Ademais, *Chlorella pyrenoidosa* apresenta propriedades antimicrobianas e antifúngicas (Ali e Doumandji, 2017), corroborando os achados do presente estudo, na qual apresentaram redução nas contagens de microrganismos mesófilos e *Enterobacteriaceae* nos grupos tratados com *Chlorella* (5 e 10g) quando comparados com o grupo controle, ressaltando que os melhores resultados foram observados na dose de 10g de *Chlorella*.

Staphylococcus coagulase-positivos como *Staphylococcus aureus*, são responsáveis por produzir uma toxina termoestável, sendo uma das causas mais prevalentes de gastroenterite (Gatti-Junior et al., 2014). De acordo com Acco et al. (2003) os humanos são portadores comuns desse microrganismo e esses autores isolaram múltiplas cepas de *S. aureus* colonizando a mucosa nasal de manipuladores de alimentos, fortalecendo o estudo de Gatti-Junior et al., (2014) pois demonstrou que a presença de *S. aureus* em tilápias do Nilo pode ser resultado de manuseio impróprio e não higiênico, armazenamento e contaminação cruzada. Não foi detectado contagens de *Staphylococcus aureus* nos filés de tilápia armazenados durante 30 dias a 4°C no presente estudo, a ausência desse patógeno sugere que os filés estavam limpos e seguros, e que o abate foi realizada com boas praticas higiênicas e sanitárias, corroborando o estudo de Atitallah et al., (2019).

A oxidação de gordura é um dos principais fatores para a deterioração da qualidade dos alimentos, principalmente em carne de pescado, influenciando diretamente na mudança da cor, sabor indesejável, valor nutricional, vida útil dos alimentos. As algas contêm compostos antioxidantes que são eliminadores de radicais livres de oxigênio eficientes e podem inibir a oxidação de ácidos graxos (Takyar et al., 2019). De acordo com Shafiei e Mostaghim (2021) que estudou a vida útil de filé de bezerra em armazenamento refrigerado com revestimento contendo *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris*, apresentaram redução significativa de

TBARs nas amostras revestidas com antioxidante quando comparadas com as não revestidas durante o tempo de armazenamento. Esses achados também foram observados por Takyar et al., (2019) pois comprovaram que essas algas podem atrasar significativamente a oxidação dos lipídios, fortalecendo os resultados do presente estudo na qual apresentou redução significativa ao longo do tempo, sendo que foram mais expressivos nos animais do grupo controle.

Durante o armazenamento o aumento do pH tem um efeito pronunciado na qualidade dos alimentos, ocasionando o crescimento de microrganismos, assim sendo, as bactérias são responsáveis por utilizar compostos de baixo peso molecular presentes no músculo dos peixes, induzindo aumento nos valores de pH, (Aracati, 2021). Esses achados justificam os resultados do presente estudo, pois apresentou aumento dos valores de pH ao decorrer do tempo de prateleira em todos os grupos, sendo estatisticamente maior nos animais do grupo controle.

Segundo Khalafalla et al., (2015) o pH natural de peixes vivos é um pouco acima de 7,0, porém esse valor cai acentuadamente à medida que o peixe passa pelo rigor mortis e o glicogênio é convertido em ácido lático. Comprovando o ocorrido deste trabalho, pois ocorreu diminuição dos valores de pH no 7º dia de refrigeração de todos os grupos quando comparados ao dia 0 (dia do abate).

A cor desempenha um papel importante na aceitabilidade de um produto alimentar, sendo um grande indicador de qualidade, frescor, estado de conservação, sabor e valor comercial. Neste estudo o valor de luminosidade (L^*) e diferença total de cor (ΔE) dos filés apresentaram uma redução ao decorrer do tempo de armazenamento em todos os grupos, sendo que nos animais do grupo controle ocorreu a partir do 7º dia, já os animais tratados (5g e 10g) ocorreram mais tarde (15 e 30 dias) respectivamente. Possivelmente isto se deve ao fato do escurecimento do filé com o avanço da refrigeração, pois inicialmente a carne era fresca e com a luminosidade elevada, e conforme a carne foi se deteriorando houve o escurecimento progressivo (Aracati, 2021).

No presente estudo a cor inicial dos animais tratados com 5g e animais do grupo controle apresentaram verde mais intenso (- a^*) com 7 dias de armazenamento, já os animais tratados com 10g de *Chlorella* foi observado verde menos intenso (+ a^*) apenas com 30 dias de refrigeração. O predomínio na cor verde (- a^*) no final do

período de armazenamento ocorreu devido à deterioração do filé, e esses achados foram semelhantes ao de Aracati, (2021) e Majdinasab et al., (2018).

Foi observado ao decorrer do tempo de prateleira aumento no componente Amarelo (+ b*) no grupo suplementado com 10g de *Chlorella*. De acordo com o estudo de Alfaia et al, (2021) o efeito de *Chlorella vulgaris* em rações para frango de corte promoveu uma coloração amarelada em carnes de peito e coxa, devido aos elevados teores de carotenoides presentes em *C. vulgares*. Já An et al. (2016) descobriram que baixos níveis (0,05, 0,15 e 0,5%) de incorporação de *Chlorella* em dietas para frangos de corte não tiveram efeito significativo na cor da carne do peito. Esses achados justificam o amarelecimento nos animais suplementados com 10g de *Chlorella pyrenoidosa*, porém esses resultados não foram vistos nos animais suplementados com 5g ao longo do armazenamento de 30 dias.

O croma (C*) apresentou diminuição durante armazenamento refrigerado, indicando redução na intensidade da cor sendo compatível com o estudo de Aracati (2021) e Hernández et al., (2009) que estudaram o tempo de prateleira em filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e filés magros (*Argyrosomus regius*) respectivamente.

No presente estudo, o ângulo de matiz tendeu a ser mais avermelhado, a sugestão se deve ao fato da *Chlorella pyrenoidosa* pertencer ao grupo dos carotenos, segundo Fradique et al., (2010), *Chlorella vulgaris* acumula grandes quantidades de carotenoides.

Em relação ao Delta (ΔE) quando observados ao longo do tempo ambos os grupos apresentaram aumento, sendo mais expressivo nos animais controle.

A carne de pescado é mais perecível comparados com carne vermelha e aves, devido às altas quantidades de aminoácidos livres, nitrogênio básico volátil e PUFA's (ácidos graxos poli-insaturados) (Takyar et al., 2019). A oxidação dos PUFA's ocasiona a deterioração da qualidade dos alimentos e consequentemente a vida útil dos alimentos, responsável por causar sabor desagradável e rançoso devido à formação de aldeídos e cetonas, reduzindo o valor nutricional através da destruição de ácidos graxos essenciais, vitaminas lipossolúveis, e além de acarretar efeitos adversos na saúde humana devido à formação de radicais livres (Oliveira et al., 2022). A adição de extratos de algas nos pescados possuem atividade antioxidante capaz de prolongar a vida de prateleira, preservando sua qualidade, assim sendo, a

Chlorella é capaz de atuar no atraso do processo de oxidação de lipídios e manter as propriedades sensoriais de peixes refrigerados (Takyar et al., 2019). Os resultados da análise sensorial (brilho, firmeza, cor e odor) demonstraram que as avaliações de aceitabilidade geral foram significativamente maiores nos animais tratados com a alga quando comparados aos animais controle, além disso foi notado ao decorrer do tempo de prateleira uma redução gradativa dos parâmetros sensoriais em todos os grupo, sendo mais evidentes em pescados do grupo controle, indicando um reflexo da perda da qualidade dos filés. Vale ressaltar que os melhores resultados foram observados em animais suplementados com *Chlorella* (10g), corroborando os achados observados nas análises microbiológicas, oxidação lipídica e pH.

Os resultados das análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais demonstram a participação da *Chlorella pyrenoidosa* na vida de prateleira de filés de tilápia armazenados sob refrigeração. Todos esses dados sugerem que a suplementação com ambas as doses (5g e 10g) da microalga realmente melhoram a qualidade microbiológica e sensorial, além de retardar o processo de oxidação lipídica dos filés de tilápia durante 30 dias de vida de prateleira, ressaltando que a suplementação com a dose de 10g de *Chlorella* foi extremamente satisfatória.

4. Conclusão

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

5. Referencias bibliográficas

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

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

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

the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during refrigerated storage. **Lwt**, 100, 244-249.

CAPITULO 4 – Considerações finais

A suplementação com *Chlorella pyrenoidosa* pode ser considerada promissora na reação inflamatória de tilápias do Nilo, devido ao seu grande potencial na prevenção do desenvolvimento ou progressão da inflamação, pois foi capaz de auxiliar as células de defesa e reduzir a produção de ROS.

A reação antiinflamatória causada pelo patógeno *A. hydrophila* pode ser reduzida pela inibição da produção de ROS e mediadores inflamatórios. A inibição significativa de mediadores inflamatórios e citocinas através de *Chlorella* sugere que essa microalga seria uma fonte potencial de desenvolvimento de agentes antiinflamatórios e uma boa alternativa para os antiinflamatórios convencionais.

Além disso, os resultados das análises microbiológicas, físico-químicas e sensoriais demonstraram a participação da *Chlorella pyrenoidosa* na vida de prateleira de filés de tilápia armazenados sob refrigeração, aumentando sua vida útil.

Todos esses dados indicam que a suplementação com ambas as doses (5g e 10g) da microalga realmente melhoram a qualidade microbiológica e sensorial, além de retardar o processo de oxidação lipídica dos filés de tilápia durante 30 dias de vida de prateleira, ressaltando que a dose de 10g foi extremamente satisfatória.