



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



ANDRELINE JORDANA COELHO DE MENDONÇA

***Gracilaria domingensis* COMO IMUNOESTIMULANTE PARA JUVENIS DE
TAINHA *Mugil liza* (Valenciennes, 1836)**

Rio Grande/RS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

***Gracilaria domingensis* COMO IMUNOESTIMULANTE PARA JUVENIS DE
TAINHA *Mugil liza* (Valenciennes, 1836)**

Andreline Jordana Coelho de Mendonça

Orientador: Dr. Marcelo Borges Tesser

Co-orientador: Dr. Luis Alberto Romano

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Rio Grande/RS

Agosto, 2017

Ata de Aprovação

Ficha Catalográfica

M539g Mendonça, Andreline Jordana Coelho de.
Gracilaria domingensis como imunoeestimulante para juvenis de
tainha *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) / Andreline Jordana Coelho de
Mendonça. – 2017.
49 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande,
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande / RS, 2017.
Orientador: Dr. Marcelo Borges Tesser.
Co-orientador: Dr. Luis Alberto Romano.

1. Macroalga 2. Tainha 3. Imunoeestimulante I. Tesser, Marcelo
Borges II. Romano, Luis Alberto. III. Título.

CDU 639.3

Catálogo na fonte: Bibliotecária Claudia Maria Gomes da Cunha CRB10/1942

Índice

| | |
|---|----|
| 1.Introdução Geral | 10 |
| 1.1. Biologia da tainha (<i>Mugil liza</i>) | 10 |
| 1.2. Aplicação das algas na nutrição de organismos aquáticos | 13 |
| 1.3. Sistema Imunológico | 16 |
| 1.4. <i>Gracilaria domingensis</i> | 18 |
| 2. Referências Bibliográficas | 20 |
| 3. Objetivo Geral | 28 |
| 3.1. Objetivos específicos | 28 |
| CAPÍTULO I..... | 29 |
| Inclusão da macroalga <i>Gracilaria domingensis</i> na ração de juvenis de tainha <i>Mugil liza</i> (Valenciennes, 1836) e seu efeito no crescimento e resposta imune específica..... | 29 |
| 1. Introdução..... | 31 |
| 2. Material e Métodos..... | 32 |
| 2.1. Material biológico e modelo experimental | 32 |
| 2.2. Dietas experimentais e composição proximal | 33 |
| 2.3. Coleta de amostras e fixação..... | 35 |
| 2.4. Parâmetros Zootécnicos | 35 |
| 2.5. Composição química corporal | 36 |
| 2.6. Extensão sanguínea..... | 36 |
| 2.7. Imunohistoquímica | 36 |
| 2.8. Análise Estatística..... | 37 |
| 3. Resultados | 37 |
| 3.1. Desempenho zootécnico | 37 |
| 3.2. Composição química corporal | 38 |
| 3.3. Contagem diferencial de leucócitos | 38 |
| 3.4. Imunohistoquímica (IHC)..... | 39 |
| 4. Discussão..... | 39 |
| 5. Conclusão..... | 42 |
| 6. Referências Bibliográficas | 43 |
| ANEXO I..... | 50 |

Dedicatória

Aos meus pais Varalúcia e Adalgiso Mendonça e todas as pessoas que sempre me incentivarem a ir em busca dos meus sonhos e por sempre estarem ao meu lado e ao meu querido avô (Severino) que partiu antes de ver esse sonho ser realizado, vocês serão eternizados em meu coração.

Amo vocês!

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a DEUS, pois sem ele nada seria (Tudo posso naquele que me fortalece, Filipenses 4:13).

Minha família pelo apoio, aos meus pais Adalgiso e Veralucia por sempre me incentivarem a buscar novos horizontes e apoiarem cada decisão tomada. Aos meus irmãos (Alexandre, Aline, Andrenia, Adne e Agnes) que mesmo de longe foram sempre amorosos.

Ao meu querido noivo (Marco Aurélio) por ser uns dos maiores incentivadores dessa conquista, por todos os esforços desmedidos e por estar sempre ao meu lado, sendo sempre um bom amigo e companheiro. Aos meus sogros e cunhados pelas mensagens de carinho e incentivo e a mais nova integrante da família que enche completamente os meus dias de alegria Clara Rebeca. Muito obrigada!

Ao programa de Pós-graduação em Aquicultura, em nome de todos os professores e pesquisadores da Estação Marinha de Aquicultura, pela oportunidade dada e pela enorme aprendizagem adquirida nesse tempo de trabalho.

A meu orientador Dr. Marcelo Tesser, pela paciência, ensinamento, dedicação e tempo a mim doado durante este tempo de estudo.

Ao professor Dr. Romano, obrigada pela confiança e oportunidade de trabalhar ao seu lado, auxiliando em minha pesquisa e seus ensinamentos.

A professora Dra. Sandra Helena e a equipe do laboratório de Tecnologia do Pescado (LATEP), por disponibilizarem a matéria-prima (macroalga) e por serem sempre carinhosos.

As equipes dos Laboratórios LAPEM, LANOA e LIPOA, por esta sempre dispostos a me auxiliar.

Aos colegas e amigos da EMA, em especial a Francianny que compartilhou cada momento desde o ingresso nessa fantástica jornada, aos piauienses (Anastácia, Inácio, Alan e Gabriel), Victor Torres, Rafael, Lucas Maltez, Reinaldo, Hellyjúnyor, Thamyres Vanessa, Marta, Mario Davi, Victor Lira e Ivanildo que em tantos momentos estiveram comigo, me ajudando e compartilhando dos meus dias.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, sendo de extrema importância para o alcance dos resultados.

1 **Resumo Geral**

2

3 As algas marinhas são amplamente utilizadas na nutrição humana e animal, já que são
4 fonte de diversos compostos que trazem benefícios à saúde como imunoestimulantes,
5 pois estas apresentam diversos compostos bioativos, entre eles macro e micronutrientes.
6 O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da inclusão da macroalga *Gracilaria*
7 *domingensis* nos parâmetros zootécnicos, perfil leucocitário e marcações CD3 e CD4 no
8 baço de juvenis da tainha *Mugil liza*. Foram testadas cinco dietas com níveis de inclusão
9 crescente da *G. domingensis* (0, 5, 10, 15 e 20%). Foram estocados juvenis de tainha
10 ($0,42 \pm 0,03\text{g}$) em 15 tanques. A alimentação foi ofertada quatro vezes ao dia, até
11 saciedade aparente, durante um período experimental de 60 dias. Os resultados do
12 experimento mostraram que os peixes dos tratamentos com 0, 5 e 10% de *G.*
13 *domingensis* obtiveram melhores índices de desempenho zootécnicos tais como ganho
14 de peso, conversão alimentar aparente (CAA) e taxa de crescimento específico (TCE).
15 Não foi observada, diferença significativa na composição química corporal e contagem
16 diferencial de células brancas nos peixes em todos os tratamentos. Diferenças
17 significativas foram encontradas na marcação de linfócitos T pelas técnicas de anti-CD3
18 e anti-CD4 no baço, entre os animais alimentados com a dieta controle e as dietas
19 contendo inclusões da macroalga. Podemos concluir que a inclusão da macroalga *G.*
20 *dominigenis* nas dietas de juvenis de tainha *M. liza* com nível de inclusão de até de 5%
21 não causa prejuízo ao desempenho zootécnico do animal. Apresentando
22 imunoestimulação com apenas 5% da inclusão de *G. domingensis* na dieta.

23

24

25

26

27 Palavras chave: Rhodophyta, sistema imunológico, nutrição de tainha

28

29

30

31

32

33 **General Abstract**

34

35 Marine algae are widely used in human and animal nutrition, since they are source of
36 several compounds that bring health benefits and present several bioactive compounds,
37 as immunostimulants, including macro and micronutrients. The aim of the present study
38 was to evaluate the effect of the inclusion of the macroalga *Gracilaria domingensis* in
39 zootechnical performance, leukocyte profile and CD3 and CD4 markers on spleen of
40 juvenile mullet, *Mugil liza*. Five diets formulated with increasing inclusion levels of *G.*
41 *domingensis* (0, 5, 10, 15 and 20%) were tested. Mullet juveniles (0.42 ± 0.03 g) were
42 stored in 15 tanks. Feeding was carried four times a day, until apparent satiety, during
43 an experimental period of 60 days. The results of the experiment showed that fish from
44 the 0, 5 and 10% treatments of *G. domingensis* showed better zootechnical performance
45 indexes such as weight gain, apparent feed conversion (AFC) and specific growth rate
46 (SGR). No significant differences were observed in body chemical composition and
47 differential white blood cells count in all treatments. Significant differences were found
48 in labeled T lymphocytes by anti-CD3 and anti-CD4 techniques in the spleen, between
49 animals fed with control diet and diets containing macroalga inclusions. It was
50 concluded that the inclusion of *G. dominigensis* macroalgae in the diet of *M. liza*
51 juveniles with an inclusion level of up to 5% does not affect the animal's zootechnical
52 performance. Also, an immune stimulation of the fish can happen with only 5% of the
53 inclusion of *G. domingensis* in the diet.

54

55

56

57

58 Key words: Rhodophyta, imune system, mullet nutrition

59

60

61

62

63

64 1. Introdução Geral

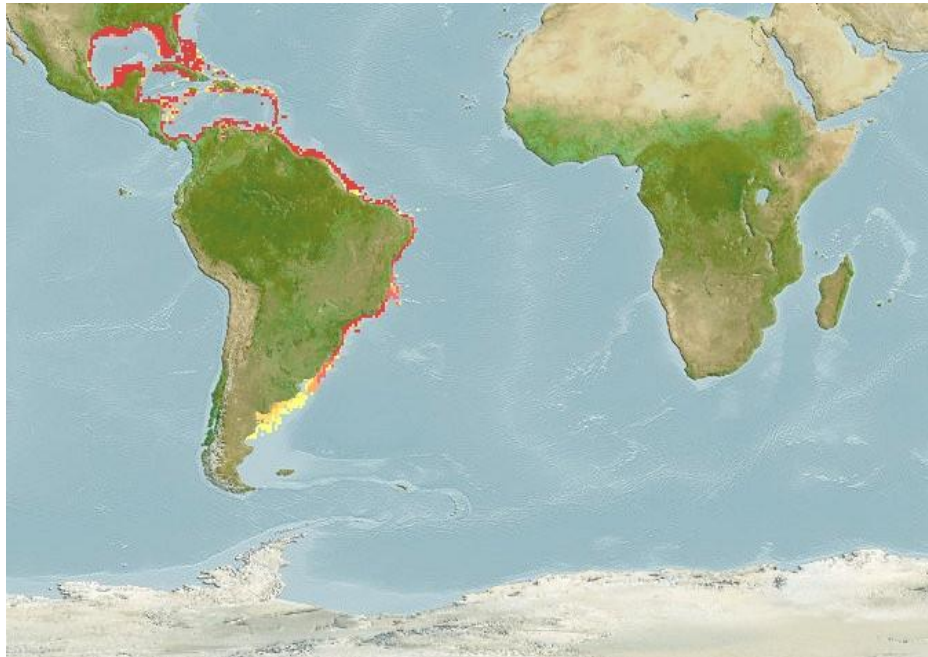
65 1.1. Biologia da tainha (*Mugil liza*)

66

67 Os peixes da família Mugilidae conhecidos como tainhas, paratis e curimãs
68 possuem ampla distribuição no mundo, ocorrendo em águas tropicais e subtropicais,
69 principalmente nas regiões costeiras estuarinas (Menezes, 1983; Menezes e Figueiredo,
70 1985). Porém, alguns gêneros dessa família podem ser encontrados nos oceanos
71 Pacífico e Atlântico (Carvalho Filho, 1999).

72 Na costa brasileira seis espécies do gênero *Mugil* já foram identificadas: *M.*
73 *incilis*, *M. curema*, *M. curvidens*, *M. brevirostris*, *M. liza* e *M. rubrioculus* (Menezes et
74 al., 2010, 2015). Cabe mencionar que a tainha *M. platanus* (antes considerada uma das
75 espécies encontradas no litoral brasileiro) passou a ser considerada *M. liza* em função da
76 inexistência de diferenças genéticas e morfológicas entre ambas (Fraga et al., 2007,
77 Menezes et al., 2010). Este fato é corroborado por Heras et al., (2009) que apresentam
78 uma revisão da taxonomia atual destas espécies por meio de análises moleculares a
79 inexistência de distinções taxonômicas e filogenéticas de alguns membros da família
80 Mugilidae, incluindo *M. liza* e *M. platanus*. A Figura 1 mostra a área de distribuição da
81 *M. liza* nas Américas.

82



83

84 Figura 1. Área de distribuição de *Mugil liza*.

85 Fonte: FishBase (2017)

86
87 A tainha *M. liza* é uma espécie de corpo alongado, fusiforme, sem linha lateral.
88 A região dorsal do corpo é escura enquanto a região abdominal é branca. Já as laterais
89 são prateadas, e as nadadeiras, com exceção, das pélvicas apresentam cromatóforos
90 escuros. Os olhos são parcialmente cobertos por uma membrana adiposa, a boca é
91 relativamente pequena e de forma angular quando fechada, dentes distribuídos em séries
92 irregulares, pequenos e flexíveis (Menezes et al., 2010). Quanto ao hábito alimentar, a
93 tainha *M. liza* é classificada como zooplânctófaga na fase larval, tornando-se iliófaga
94 quando juvenil (Vieira, 1991).

95 Comumente comercializada na região sul do Brasil, a tainha *M. liza* é de grande
96 importância para a pesca artesanal das comunidades locais, como por exemplo, na
97 Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, onde é bastante conhecida por ser o berçário desta
98 espécie o ano inteiro (Reis e D’Incao, 2000; Vieira et al., 2010). A tainha é uma espécie
99 eurialina e euriérmica, sendo capaz de habitar ambientes marinhos e de água doce
100 (Sampaio, et al., 2002). São catádrovas, ou seja, na fase adulta (aproximadamente 40
101 cm) migram para o alto mar, onde se reproduzem. Logo após a desova, os juvenis
102 deslocam-se para as regiões costeiras, adentrando nas águas estuarinas e lagunares ricas
103 em alimentos (Menezes, 1983; Menezes e Figueiredo, 1985;).

104 A espécie apresenta características biológicas e econômicas desejáveis para
105 produção em cativeiro, que devem ser estudadas, já que seus estoques naturais são
106 fortemente explorados pela atividade pesqueira (Gordinho et al., 1988; Baldisserotto e
107 Gomes, 2013). Em alguns países como o Egito, Taiwan, Filipinas, Colômbia, China e
108 Itália a criação de tainhas é realizada em sistemas de mono e policultivo, a partir de
109 juvenis coletados do ambiente natural, uma vez que a reprodução artificial ainda não é
110 capaz de suprir as demandas do mercado (El-Sayed e El-Gobashi, 2011). No Brasil,
111 estudos vêm sendo realizados para determinar o pacote tecnológico da espécie .

112 Gordinho et al. (1993) realizando indução através do uso de hormônios apontam
113 a possibilidade de reprodução da *M. liza* em cativeiro. A espécie possui desova total e
114 fecundidade entorno de 500×10^3 a 2.300×10^3 oócitos (Romagosa et al., 2000). Estudo
115 recente apresenta um levantamento das técnicas de indução utilizada para espécie
116 (Cerqueira et al. 2017). A reprodução induzida possibilita a criação de diversas
117 espécies, que em condições de cativeiro não são capazes de se reproduzir naturalmente,

118 apresenta a possibilidade de um maior controle do manejo reprodutivo, viabilizando a
119 criação de espécies em escala comercial.

120 Alguns parâmetros fundamentais à produção de tainha (*M. liza*) em cativeiro já
121 foram determinados. Miranda-Filho et al. (1995) comprovaram que níveis até 4,0 mg/L⁻¹
122 de amônia total não são prejudiciais aos índices de crescimento desta espécie. Sampaio
123 et al. (2001) recomendam a estocagem de 3 a 5 juvenis/L de tainha (0,25g) para a
124 obtenção de melhores índices de crescimento, porém só por 28 dias e sob alta taxa de
125 renovação. Sampaio et al. (2002), determinou a CL₅₀ de nitrito (NO₂⁻) e amônia total em
126 função de diferentes salinidades, sendo a concentração letal mediana de 3,59 mg/L⁻¹ e
127 2,13 mg/L⁻¹, respectivamente, quando em salinidade 30‰. Okamoto et al. (2006)
128 observaram que a temperatura da água a 30 °C proporciona melhor desempenho
129 zootécnico em juvenis de *M. liza*. De acordo com Poersch et al. (2007), a concentração
130 máxima de nitrato (NO₃⁻-N) que não causa prejuízos ao desenvolvimento de juvenis de
131 tainha é de 152,2 mg/L⁻¹.

132 Em relação a alimentação e a nutrição de tainhas, Carvalho et al. (2010)
133 determinaram a exigência proteica de juvenis de *M. liza* submetendo-as a cinco dietas
134 com distintos teores de proteína bruta (30%, 35%, 40%, 45% e 50%) e, embora não
135 tenham sido detectadas diferenças significativas entre os tratamentos para taxa de
136 sobrevivência, eficiência alimentar e composição corporal, a melhor performance de
137 crescimento foi obtida para os peixes alimentados com ração contendo 35% de PB.

138 Os carboidratos dietéticos são uma excelente fonte de energia para os peixes,
139 mas por outro lado, a capacidade de utilização do carboidrato é espécie-específica e
140 dependente da dieta natural (Hixson, 2014). A tainha pode ser alimentada com altos
141 níveis de dextrina sem que ocorra comprometimento do crescimento e da bioquímica
142 plasmática (proteína, glicose, colesterol) e hepáticas (glicogênio e triglicerídeos)
143 (Zamora et al., 2013). Estudos sobre a utilização de aglutinantes de rações também
144 foram realizados. Assim, níveis acima de 4% de goma guar (polissacarídeo não-
145 amiláceo) não são recomendados, pois prejudicam o desempenho zootécnico e
146 aumentam o glicogênio hepático (Ramos et al., 2015a). Já em relação à inclusão de
147 pectina, Ramos et al. (2015b) observaram a presença de enterite nos peixes alimentados
148 com as dietas que continham pectina e desta forma recomendam cautela ao utilizar este
149 aglutinante. Por fim, juvenis de *M. liza* alimentados com dietas com fração proteica de
150 origem vegetal e incorporadas com complexo enzimático (carboidrases e fitase), não

151 apresentaram diferenças significativas para desempenho produtivo, mas exibiram maior
152 retenção óssea de cálcio. Por outro lado, os peixes do grupo controle (dieta isenta do
153 complexo enzimático) apresentaram inflamações moderadas no intestino, além de
154 alterações na morfologia das vilosidades e necroses (Ramos et al., 2017).

155

156 1.2. Aplicação das algas na nutrição de organismos aquáticos

157

158 As algas estão distribuídas em diversos habitats do globo, desde ambientes
159 aquáticos a terrestres, apresentando diferentes formas, funções e estratégias de
160 sobrevivência (Bicudo e Menezes, 2010). São classificadas em dois grandes grupos:
161 microalgas e macroalgas. O primeiro é constituído por organismos unicelulares e
162 fotossintéticos que não podem ser observados a olho nú, sendo facilmente encontrados
163 em ambientes de água doce, marinho ou solos úmidos (Derner et al., 2006). As
164 macroalgas, por sua vez, são notáveis a olho nú e constituídas por três grandes filos,
165 conforme a predominância de pigmento fotossintético ou acessório: Chlorophyta (algas
166 verdes), Rhodophyta (algas vermelhas) e Ochrophyta-Phaeophyceae (algas castanhas)
167 (O'Sullivan et al., 2010; Yende et al., 2014). Estes organismos são multicelulares e
168 fotoautotróficos, exercendo papéis importantes na produção primária da cadeia
169 alimentar, na estrutura e sustentação dos habitats (Barsanti e Gualtieri, 2006; Hu et al.,
170 2008).

171 Algas são fontes de compostos essenciais à nutrição humana e animal, sendo
172 consideradas um superalimento em função dos diversos benefícios que são capazes de
173 proporcionar à saúde (Anon, 1937; Marinho-Soreano et al., 2011), agindo em diferentes
174 mecanismos biológicos, com eficientes respostas antivirais, antibióticas,
175 anticancerígena, antitumoral, antitrombóticas, anti-inflamatórias, hipocolesterolêmicas e
176 hipoglicêmicas (Smit, 2004). Estes efeitos benéficos são justificados por seus diversos
177 aspectos funcionais, tais como: fonte potencial de compostos fenólicos (florotaninos -
178 taninos das algas castanhas e vermelhas), ficobilinas, polissacarídeos, esteróis de
179 tocoferol, ficocianinas e dentre outros (Plaza et al., 2008); elevado teor de macro
180 minerais como cloro, enxofre, fósforo, magnésio, potássio e sódio; além de micro
181 minerais como boro, cobre, cobalto, ferro, flúor, manganésio, molibdenio, níquel,

182 selênio e zinco (Madhusudan, 2011); concentração de minerais (até 36% do peso seco
183 de iodo e cálcio) superior a qualquer outra espécie vegetal (Pereira, 2011).

184 Quanto aos aspectos nutricionais, são ricas em fibras dietéticas insolúveis,
185 fundamentais ao trato gastrointestinal, regulando o trânsito intestinal e a regeneração
186 das paredes intestinais, ajuda na diminuição da absorção de gorduras e colesterol.
187 Possuem elevado teor de vitaminas (C, D, E, K e do complexo B), especialmente
188 cobalamina (vitamina B12) imprescindível no processo de produção de eritrócitos e na
189 preservação do sistema nervoso. Também contêm grandes quantidades de carotenóides,
190 como a fucoxantina, a qual é essencial à síntese de vitamina A (participa da regulação
191 da respiração celular e produção de pigmentos da retina). São ricas em aminoácidos
192 essenciais como por exemplos as macroalgas *Ulva lactuca* e *Enteromorpha compressa*
193 (chlorophytas) apresenta abundancia particularmente metionina, fenilalanina e histidina,
194 a *Padina pavonica* (phaeophyta) é rica em metionina, fenilalanina, treonina e histidina e
195 a rhodophyta *Luurencia obtusa* em prolina, treonina, lisina e histidina e ácidos graxos
196 polinsaturados (Wahber, 1997). Por fim, apresentam baixo teor de açúcares em sua
197 composição, mas dispõem de enzimas chaves no processo de remoção de inúmeros
198 resíduos tóxicos capazes de bioacumlar no organismo, como lípases, proteases e
199 transaminases (Plaza et al., 2008; Dhargalkar e Verlecar, 2009; Madhusudan, 2011).

200 Por apresentar tais características, as macroalgas vêm sendo cogitadas para a
201 nutrição de organismos aquáticos (Sakthivel e Davi, 2015; Chan e Matanjun, 2017),
202 sendo alvo de estudos focados em suas propriedades bioativas (Seedevi et al., 2017),
203 capacidade antioxidante e anticoagulante (Souza et al., 2012; Sudharsan et al., 2015;
204 Ospina et al., 2017). Pérez-Estrada et al., (2011), comprovaram a eficiência de
205 diferentes macroalgas (reidratadas) no crescimento de juvenis de abalone (*Haliotis*
206 *fulgens*).

207 Yu et al. (2016), averiguaram os efeitos positivos da farinha de *Gracilaria*
208 *lemaniformis* sobre o crescimento, resposta imune não específica e resistência ao
209 estresse salino em juvenis do camarão branco do pacífico (*Litopnaeus vannamei*),
210 recomendando-a como suplemento dietético em concentração em torno de 2% a 3%. As
211 paredes celulares das algas são estruturas extremamente complexas, composta de
212 diferentes polissacarídeos como galactanas nas algas vermelhas (carragenanas e ágaros),
213 que podem potencializar a atividade imunológica nos animais. Os polissacarídios
214 solúveis das macroalgas *Porphyra yezoensis* e *Gracilaria verrucosa*, estimulam a

215 fagocitose e explosão respiratória em macrófagos de ratos *in vitro* e *in vivo* (Yoshizawa
216 et al., 1993, 1995, 1996), os polissacarídeos sulfatados da *Ulva rígida*, apresenta 47%
217 da sua fração de ácido urânico (principalmente ácido glicurônico) que, juntamente com
218 a ramnose e sulfato, formam unidades repetitiva que é conhecida como ulvana (Castro
219 et al., 2006). Ao comparar os efeitos dietéticos da *Ulva clathrata*, *Macrocystis porfira* e
220 *Ascophyllum nodosum*, Cruz-Suárez et al. (2009) não detectaram diferenças
221 significativas no consumo ou na sobrevivência de juvenis de *L. vannamei*. Porém, os
222 camarões alimentados com a dieta contendo *U. clathrata*, apresentaram melhor
223 desempenho zootécnico e coloração vermelha marcante após cozimento do que aqueles
224 tratados com *M. porfira* e *A. nodosum*. As macroalgas *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva*
225 *rígida* e *G. cornea* são ingredientes alternativos potenciais na alimentação de juvenis de
226 robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), podendo ser incluído na dieta até 10% de *G.*
227 *bursa-pastoris* e *U. rígida* e 5% *G. cornea*, sem efeitos adversos (Valente et al., 2006).
228 Juvenis de *Acanthopagrus schlegelii* alimentados com dietas contendo 15% de *G.*
229 *lemaniformis*, apresentaram melhor crescimento e condições fisiológico, sendo
230 importante citar, que a inclusão desta macroalga na formulação de dietas diminui em ate
231 15% o uso da farinha de peixe na ração (Xuan et al., 2013).

232 A inclusão de 20% de farinha de *Ulva* sp. na dieta de *Mugil cephalus*
233 proporciona melhor ganho em peso, crescimento e eficiência alimentar, bem como,
234 melhora da qualidade e firmeza da musculatura (Wassef et al., 2001). Com o intuito de
235 enriquecer o filé com iodo, Valente et al. (2015) suplementaram dieta da truta arco-íris
236 (*Oncorhynchus mykiss*), com a macroalga *Gracilaria vermiculophylla*, evidenciando
237 que a dieta com 5% de inclusão de *G. vermiculophylla* (214,5 µg / kg de iodo) duplicou
238 o teor de iodo no filé dos peixes em relação a dieta controle (111,7 µg / kg de iodo).
239 Dietas suplementadas com algas para juvenis tilápia *Oreochromis niloticus* também
240 desencadearam respostas positivas quanto ao desempenho zootécnico, manutenção da
241 integridade das vilosidades intestinais e aumento de sua superfície, permitindo uma
242 melhor absorção de nutrientes e consequente otimização do crescimento destes animais
243 (Garcia et al., 2009). Peixoto et al.(2016) constaram que a suplementação de *Gracilaria*
244 spp., *Fucus* spp. e *Ulva* spp. na dieta do robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) melhora
245 as respostas imunológicas e antioxidantes sem comprometer o desempenho zootécnico
246 do animal.

247 Com base na revisão acima, torna-se possível notar e comprovar o grau de
248 benefícios e a importância do emprego das algas na formulação de dietas para
249 organismos aquáticos, em especial as macroalgas, que podem vir a ser uma excelente
250 alternativa na nutrição de peixes marinhos por estimular o crescimento, fortalecer o
251 sistema imunológico e até mesmo diminuir os custos de produção.
252

253 1.3.Sistema Imunológico

254

255 O sistema imune é classificado em sistema imune inato ou inespecífico e sistema
256 imune adaptativo ou específico, sendo responsável pela defesa do organismo (Abbas,
257 2007). O sistema inato é considerado como a primeira linha de defesa e atua antes que o
258 sistema específico, em todo corpo (escama, muco, brânquias e epiderme) antes da
259 aparição do agente patológico (Biller-Takahashi e Urbinati, 2014). O sistema adquirido
260 apresenta resposta imune humoral e celular, abrangendo os órgãos e tecidos linfóides,
261 células apresentadoras de antígeno (APCs), linfócitos T e B, imunoglobulinas e
262 moléculas do sistema complemento (Watts e Mundat, 2001) (Figura 2), conferindo a
263 este sistema de defesa a produção de anticorpos ou células citotóxicas específicas para
264 cada antígeno, gerando memória imunológica (Trichet 2010).
265



266

267 Figura 2. Resposta do sistema imunológico de peixe frente à invasão por patógeno (adaptado de
268 Shoemaker et al., 2001).

269 Os linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos são leucócitos,
270 usualmente observados na circulação dos peixes. São células responsáveis pela defesa
271 do organismo, utilizando vias sanguíneas para o monitoramento de possíveis infecções e
272 ou injúria tecidual (Satake et al, 2009).

273 Os linfócitos são células altamente diferenciadas, que apresentam resposta frente
274 à estímulos imunológicos (Ellis, 1977). Circulam por todo o corpo através do sangue ou
275 linfa, concentrando-se nos órgãos linfóides, podendo estar presentes em outros tecidos
276 afetados ou não por processos inflamatórios (Peleteiro e Richards, 1985; Hibiya, 1994).
277 São responsáveis pela resposta imune específica humoral e celular, ocasionando a
278 produção de anticorpos, aumentando a capacidade citotóxica e no processo de memória
279 imunológica, promovendo a liberação de fatores reguladores da função imune, como as
280 linfocinas (Yoshinaga et al., 1994).

281 Os linfócitos se dividem em dois grupos de populações, linfócitos B e T, os
282 linfócitos B produtores de anticorpos e células de memória, são participantes da
283 resposta imune humoral, enquanto os linfócitos T possuem diferentes tipos e
284 desempenham funções específicas. Todos os linfócitos adquirem o receptor CD3 ao
285 chegar ao timo, logo são divididos de acordo com sua funcionalidade em duas
286 subpopulações linfocitárias principais, os linfócitos T CD4+ ou auxiliares e os linfócitos
287 T CD8+ ou citotóxicos, o linfócito T4 tem um papel fundamental em colocar em
288 funcionamento todo o sistema imune e atua como uma ponte entre a imunidade
289 inespecífica e específica (Romano, 2010).

290 Os monócitos são células circulantes na corrente sanguínea periférica,
291 transformando-se em macrófagos quando migram para o tecido conjuntivo durante
292 processo inflamatório (Cuesta et al., 1999). Os macrófagos, fagocitam substâncias
293 estranhas abióticas e bióticas como diferentes patógenos. Possuem importante papel na
294 resposta imune, por ser uma célula fagocítica, produz e libera citocinas e esta envolvida
295 na apresentação de antígenos aos linfócitos, células do sistema imune adaptativo
296 (Secombes e Fletcher, 1992; Cuesta et al., 1999).

297 Os granulócitos possuem ampla variação no conteúdo de seus grânulos. São
298 divididos em neutrófilos e eosinófilos (acidófilos) e basófilos, de acordo com suas
299 propriedades de coloração com Romanovsky (Campbell e Murru, 1990; Hine, 1992).
300 Leucócitos com função de agir durante reações alérgicas ou imunológicas do organismo
301 com o objetivo de destruir agentes invasores por fagocitose.

302 Para tentar manter a homeostase do organismo no início de um estresse, a
303 maioria das espécies de peixes aumenta a produção de leucócitos, contudo o decréscimo
304 na contagem destas células pode ser atribuído pelo enfraquecimento do sistema
305 imunológico (Vosyliené, 1999).

306 Segundo Shoemaker et al. (2001), a nutrição é fator importante na resposta
307 imune nos animais. A deficiência em aminoácidos específicos no alimento, durante
308 processo de infecção pode prejudicar a liberação de proteínas essenciais produzidas
309 pelos linfócitos, macrófagos e sistema complemento. A carência de energia, macro e
310 micronutrientes específicos na ingestão traz prejuízos ao sistema imunológico,
311 diminuindo funções de importância para a proteção do hospedeiro. Algumas das
312 alterações imunológicas relacionadas à desnutrição aumentam o risco de
313 desenvolvimento de infecções, ocasionando mudanças fisiológicas que pioram o estado
314 nutricional (Chandra e Newberne, 1977; Chandra, 2002). Falcon (2007) afirma que
315 áreas como a hematologia e a imunologia têm auxiliado o entendimento da nutrição
316 com intuito de promover novas estratégias para mitigar os efeitos do estresse e aumentar
317 a resistência imunológica dos peixes, permitindo que o mesmo mantenha o equilíbrio
318 orgânico, necessário nas diferentes e inevitáveis situações adversas a que estão
319 expostos, nos atuais sistemas intensivos de produção.

320

321 1.4. *Gracilaria domingensis*

322

323 O gênero *Gracilaria* pertence ao filo Rhodophyta, com ampla distribuição
324 geográfica e grande importância econômica, sendo este último um quesito fundamental
325 na seleção das espécies a serem empregadas em sistemas de cultivos (Gurgel e
326 Fredericq 2004). O alto valor econômico desta espécie se deve ao teor de ágar e ao
327 rápido crescimento (Armisen, 1995). Atualmente a produção mundial de macroalgas
328 está representada pelas Rhodophytas *Kappaphycus alvarezii* e *Eucheuma* spp., que
329 lideram com mais de 10 milhões de toneladas. Já a *Gracilaria* sp. ocupa a terceira
330 posição com aproximadamente 4 milhões de toneladas produzidas (FAO, 2016).

331 A *Gracilaria domingensis* apresenta morfos vermelho, verde e marrom e está
332 amplamente distribuída no litoral brasileiro, sendo uma das poucas espécies do gênero
333 que ocorre na região sul do país mais precisamente no litoral de Santa Catarina
334 (Oliveira, 1997). Além de apresentar composição nutricional potencial para dieta

335 humana e animal (Urbano e Goñe, 2002), a *G. domingensis* é também rica em ágar,
336 ficocolóide extraído de sua parede celular, vastamente utilizada na indústria alimentícia.
337 Estudos mostram que o extrato da *G. domingensis* apresenta atividade antioxidante e
338 contêm ácidos graxos essenciais e carotenóides, podendo ser utilizadas como fonte de
339 antioxidantes em aplicações que necessitem destas propriedades (Guaratini, et al, 2012).

340 No nordeste do país, existem cultivos consolidados de macroalgas do gênero
341 *Gracilaria*, nos estados do Rio Grande do Norte (RN), Ceará (CE) e Paraíba (PB),
342 sendo realizados de forma a complementar a renda das famílias das comunidades
343 pesqueiras, as algas são vendidas diretamente aos agentes de compras (atravessadores),
344 que revende para a fábrica de processamento. Durante o processo de venda, ocorre a
345 mistura das diferentes espécies de macroalgas, juntamente com impurezas, contribuindo
346 para a perda de qualidade e baixo preço pago (R\$ 2,00) pelo quilograma de algas secas
347 (Marinho-Soriano, 2016). No país existem apenas duas empresas processadoras de
348 ficocoloide a Griffith do Brasil (Mogi das Cruzes – São Paulo) e a Agar Gel (João
349 Pessoa – Paraíba), ambas processam macroalgas da costa nordestina e importada das
350 Filipinas e Chile respectivamente, sendo que a última cultiva as espécies *Hypnea*
351 *musciformis*, *Gracilaria grevillea* e *G. chilensis* (Furtado, 1999, Carvalho Filho, 2004).

352 Na região sul do Brasil, no Estado de Santa Catarina, o cultivo da *G.*
353 *domingensis* e *Kappaphycus alvarezii* está consolidado em escala comercial (Hayashi et
354 al., 2010; Salles et al., 2010). No Rio Grande do Sul e Paraná apenas cultivam algas em
355 âmbito laboratorial. Na região sudeste do país, os estados de São Paulo e Rio de Janeiro
356 cultivam apenas a macroalga *Kappaphycus alvarezii* em escala comercial como
357 matéria-prima para uma pequena indústria de carragena (Pellizzari e Reis, 2011).

358

359 Diante do exposto foi formulada a seguinte hipótese: “A inclusão da macroalga
360 *G. domingensis* na dieta de juvenis de Tainha *M. Liza*, tem a capacidade atuar no
361 desempenho zootécnico, modificar o perfil leucocitário e modular seu sistema imune
362 dos animais”.

363

364

365

366 2. Referências Bibliográficas

367

368 Abbas, A. K., Pober, J. S., Lichtman A. H., 2007. Cellular and Molecular Immunology.
369 Elsevier- Saunderd Edit; 243-268/545.

370 Anon, 1937. Marine Algae - Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and
371 Biotechnology. In Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki. Available at:
372 <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0>.

373 Armisen, R., 1995. World-wide use and importance of Gracilaria. J. App. Phycol. 7:
374 231-243.

375 Baldisserotto, B. e Gomes, L. C., 2013. Espécies nativas para a piscicultura no Brasil.
376 2ªed. Santa Maria: Editora da UFSM. 543p.

377 Barsanti, L., Gualtieri P., 2006. Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnolog,
378 Florida: Tailor and Francis Group.

379 Bicudo, E. M., Menezes, M., 2010. Introdução: As algas do Brasil. [em linha].
380 Disponível em: <http://books.scielo.org/id/z3529/pdf/forzza-9788560035083-06.pdf>.
381 [consultado em 04 de fevereiro de 2017].

382 Biller-Takahashi, J. D., Urbinati, E. C., 2014. Fish immunology. The modification and
383 manipulation of the innate immune system: brazilian studies. An. Acad. Bras.
384 Ciênc. V. 86 n°.3. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201420130159>.

385 Carvalho Filho, 1999. Peixes: Costa Brasileira. São Paulo. Melro. p. 320. Carvalho
386 Filho, J., 2004. Algas uma alternativa para as comunidades costeiras. Panorama da
387 Aquicultura, v. 84, p. 53-56.

388 Carvalho, C.V.A., Bianchini, A., Tesser, M.B., Sampaio, L.A., 2010. The effect of
389 protein levels on growth, post prandia excretion and tryptic activity of juvenile
390 mullet *Mugil platanus* (Günther). Aquaculture Research. 41, 511 – 518.

391 Castro, R., Piazzon, M.C., Zarra, I., Leiro, J., Noya, M., Lamas, J., 2006. Stimulation of
392 turbot phagocytes by *Ulva rígida* C. Agardh polysaccharides. Aquaculture v.254.
393 9–20.

394 Campbell, T. y Murru, F., 1990. An introduction to fish hematology. The compendium-
395 Small Animal, 12: 525-533.

396 Cerqueira, V. R., Carvalho, C. V. A., Sanches, E. G., Passini, G., Baloi, M., Rodrigues,
397 R.V., 2017. Manejo de reprodutores e controle da reprodução de peixes marinhos
398 da costa brasileira. Revista Brasileira de Produção Animal, 41(1): 94- 348 102

399 Chan, P. T., Matanjun, P. 2017. Chemical composition and physicochemical properties
400 of tropical red seaweed, *Gracilaria changii*. *Food Chemistry*. 221, 302–310

401 Chandra, R. K. Nutrition and the immune system from birth to old age. *European*
402 *Journal of Clinical Nutrition*, London, v. 56, Suppl. 3, p. 73S-76S, 2002.

403 Chandra, R. K.; Newborne, P. M., 1977. *Nutrition, immunity, and infection*. New York:
404 Plenum Press, 264p.

405 Cruz-Suárez, L. E., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M. G., Guajardo-Barbosa, C.,
406 Ricque-Marie, D., 2009. Comparision of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis*
407 *pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredientes in shrimp feeds. *Aquaculture*
408 *Nutrition* 15; 421–430. <http://doi:10.1111/j.1365-2095.2008.00607.x>.

409 Cuesta, A., Esteban, M. A., Meseguer, J., 1999. Natural cytotoxic activity of gilthead
410 seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes - Assessment by flow cytometry and
411 microscopy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.71, p.161-171.

412 Derner, R. B., I, 1; Ohse, S., Villela, M., Carvalho, S. M., Fett, R., 2006. Microalgae,
413 products and applications. *Ciência Rural*, 36, pp. 1959-1967.

414 Dhargalkar, V. K., Verlecar, X. C., 2009. Southern Ocean seaweeds: a resource for
415 exploration in food and drugs. *Aquaculture*, v. 287, n.1, p. 229 – 242.

416 Ellis, A.E., 1977. The leucocytes of fish: A review. *J. Fish Biol.*, 11: 453-491.

417 El-Sayed, A. F. M., El-Gobashi, A. E., 2011. Effects of tank colour and feed colour on
418 *Liza aurata* growth and production in marine nursery ponds. *Aquaculture Research*.
419 2:1163-1169.

420 Fao, 2016. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Food and Agriculture
421 Organization of the United Nations, Rome.

422 FishBase, 2017. *Mugil liza*. Acessado em 14 de agosto de 2016. Disponível em:
423 <http://www.fishbase.org/summary/1090>.

424 Fonseca Neto, J. C., Spach, H. L., 1999. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus*
425 Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. *Bol. Inst. Pesca*, 25
426 (único): 13 – 17.

427 Fraga, E., Schneider, H., Nirchio, M., Santa-Brigida, E., Rodrigues-Filho, L.F.,
428 Sampaio, I., 2007. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae,
429 Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. *Journal of Applied Ichthyology*
430 23: 598-604.

431 Furtado, M. R., 1999. Alta lucratividade atrai investimentos em hidrocolóides. Química
432 e Derivados. 21-29.

433 Garcia, F., Abimorad, E. G., Schalch, S. H. C., Onaka, E. M., Fonseca, F. S. da., 2009.
434 Growth performance of Nile tilapia fed on a diet supplemented with algae products.
435 Bioikos, 23(2):83-89.

436 Godinho, H. M., Serralheiro, P.C., Scorvo Filho, J. D., 1988. Revisão e discussão sobre
437 as espécies do gênero *Mugil* (Teleostei, Perciformes, Mugilidae) da costa brasileira
438 (Lat 3°S – 33°S). Bol. Inst. Pesca 15, 67–80.

439 Godinho, H. M., Kavamoto, E.T., Andrade-Talmelli, E. F., Serralheiro, P. C. S., Paiva,
440 P., Ferraz, E. M., 1993. Induced spawning of the mullet *Mugil platanus* Günther,
441 1880 in Cananéia, São Paulo, Brazil. Boletim do Instituto de Pesca, 20(único): 59-
442 66.

443 Guaratini, I. T., Lopes, N. P., Marinho-Soriano, E., Colepicolo, P., Pinto, E., 2012.
444 Antioxidant activity and chemical composition of the non polar fraction of
445 *Gracilaria domingensis* (Kützting) Sonder ex Dickie and *Gracilaria birdiae*
446 (Plastino & Oliveira). Rev. bras. farmacogn. v.22 no.4.
447 <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000063>.

448 Günther, M., Sampaio, L. A., Ferreira, A. H., Tesser, M. B., 2001. Effect of stocking
449 density on laboratory rearing of mullet, (1982), 471–475.

450 Gurgel, C.F.D.; Fredericq, S., 2004. Systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales,
451 Rhodophyta): a critical assessment based on rbcL sequence analysis. Journal of
452 Phycology 40: 138-159.

453 Hayashi, L., Santos A. A., Farias, G. S. M., Nunes, B.G., Souza, M. S., Fonseca, A. L.
454 D., Barreto, P. L. M., Oliveira, E.C., Bouzon, Z.L., 2010. *Kappaphycus alvarezii*
455 (Rhodophyta, Areschougiaceae) cultivadas em águas subtropicais do sul do Brasil.
456 J Appl Phycol.

457 Heras, S., Roldán, M.I. and Castro, M.G., 2009. Molecular phylogeny of Mugilidae
458 fishes revised. Rev. Fish. Biol. Fisheries 19: 217-231.

459 Hine, P.M., 1992. The granulocytes of fish. Fish Shellfish Immunol., 2: 79-88.

460 Hixson, S. M., 2014. Fish nutrition and current issues in aquaculture: the balance in
461 providing safe and nutritious seafood, in an environmentally sustainable manner.
462 Journal of Aquaculture Research & Development, 5(3), 1.

463 Hu, Q. Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins,
464 Al.,2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production:
465 perspectives and advances. *Plant. J.*, 54, pp. 621-39.

466 Hibiya, T., 1994. An atlas of fish histology: normal and pathological features. Stuttgart:
467 Gustav Fish Verlag., p.5-125.

468 Madhusudan, C., 2011. Seaweeds a diet with nutrition.pdf. , pp.153–157.

469 Marinho-Soriano, E., Pinto, E., Yokoya, N. S., Colepicolo, P., Texeira, V. L.,
470 Yoneshigue-Valentin, Y., 2011. Frontiers on algae bioactive compounds. *Brazilian*
471 *Journal of Pharmacognosy*, v. 21, n. 2. doi [http://dx.doi.org/10.1590/S0102-](http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011000200001)
472 [695X2011000200001](http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011000200001).

473 Marinho-Soriano, E., 2016. Historical context of commercial exploitation of seaweeds
474 in Brazil. *J Appl Phycol* <http://doi10.1007/s10811-016-0866-8>.

475 Menezes, N. A.,1983. Guia prático para o reconhecimento e identificação de tainhas e
476 paratis Pisces-Mugilidae do litoral brasileiro. *Rev. Bras. Zool.*, 21: 1-12.

477 Menezes, N. A., Figueiredo, J. L., 1985. Manual de peixes marinhos do sudeste do
478 Brasil. V.Teleostei (4). Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo,
479 Brazil.Menezes, N. A., Oliveira, C. De., Nirchio, M., 2010. An old taxonomic
480 dilemma: the identity of the western south Atlantic lebranche mullet Teleostei:
481 Perciformes: Mugilidae. *Zootaxa* 2519: 59-68.

482 Menezes, N. A., Nirchio, M., Oliveira C. De., Siccharamirez, R., 2015. Taxonomic
483 review of the species of *Mugil* (Teleostei: Perciformes: Mugilidae) from the
484 Atlantic South Caribbean and South America, with integration of morphological,
485 cytogenetic and molecular data. *Zootaxa*, 3918(1): 1-38.

486 Miranda Filho, K. C., W. Wasielesky, J. R., Maçada, A. P., 1995. Efeito da amônia e do
487 nitrito no crescimento da tainha *Mugil platanus* Pisces: Mugilidae. *Brazilian*
488 *Journal of Biology*, 5: 45-50.

489 O'sullivan, L, et al. 2010. Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal
490 Health Applications. *Mar. Drugs*, 8, 2038-2064; <http://doi:10.3390/md8072038>.

491 Okamoto, M. H., Sampaio, L. A., Maçada, A. D. E. P., 2006. Efeito da temperatura
492 sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis da tainha *Mugil platanus* Günther,
493 1880, *Atlântica*, 28(1): 61-66.

494 Ospina, M., Castro-Vargas, H. I., Parada-Alfonso, F., 2017. Antioxidant capacity of
495 Colombian seaweeds: Extracts obtained from *Gracilaria mammillaris* by means of

496 supercritical fluid extraction. J. of Supercritical Fluids.
497 <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.supflu.2017.02.023>.

498 Peixoto, M. J., Salas-Leitón, E., Pereira, L. F., Queiroz, A., Magalhães, F., Pereira, R.,
499 de Almeida Ozório, R. O., 2016. Role of dietary seaweed supplementation on
500 growth performance, digestive capacity and immune and stress responsiveness in
501 European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture Reports, 3, 189-
502 197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.03.005>.

503 Peleteiro, M. C., Richards, R. H., 1985. Identification of lymphocytes in the epidermis
504 of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Diseases, 8(2),
505 161-172.

506 Pellizzari, F. e Reis, R. P., 2011. Seaweed cultivation on the Southern and Southeastern
507 Brazilian Coast. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 21 (2): 305-312.

508 Pereira, L., Van de Velde, F., 2011. Portuguese carrageenophytes: Carrageenan
509 composition and geographic distribution of eight species (Gigartinales,
510 Rhodophyta). Carbohydrate Polymers, 84, pp. 614-623.

511 Pérez-Estrada, C. j., Civera-Cerecedo, R., Hernández-Llamas, A., Serviere-Zaragoza,
512 E., 2011. Growth and biochemical composition of juvenile green abalone *Haliotis*
513 *fulgens* fed rehydrated macroalgae. Aquaculture nutrition. 17, 62- 69.
514 <http://doi:10.1111/j.1365-2095.2009.00733.x>.

515 Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez E., 2008. In the search of new functional food
516 ingredients from algae. Trends in Food Science & Technology, v. 19, n. 1, p. 31-
517 392.

518 Poersch, L. H., Santos, M. H. S., Filho, K. M., e Jr, W. W., 2007. Efeito agudo do
519 nitrato sobre alevinos da tainha *Mugil platanus* (Pisces : Mugilidae), B. Inst.
520 Pesca, 33(2): 247 - 252.

521 Ramos, L. R. V, Romano, L. A., Monserrat, J. M., Abreu, P. C., Verde, P. E., 2015a.
522 Biological responses in mullet *Mugil liza* juveniles fed with guar gum
523 supplemented diets. Animal Feed Science and Technology, 205, 98–106.
524 <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.04.004>.

525 Ramos, B. L. R. V, Monserrat, J. M., Romano, L. A., Sampaio, L. A., e Abreu, P. C.,
526 2015b. Effects of supplementing the diets of *Mugil liza* Valenciennes , 1836
527 juveniles with citrus pectin, J. Appl. Ichthyol. 31, 362–369.
528 <http://doi.org/10.1111/jai.12695>.

529 Ramos, L. R. V, Pedrosa, V. F., Mori, A., De., C. F. F., 2017. Exogenous enzyme
530 complex prevents intestinal soybean meal- induced enteritis in *Mugil liza*
531 (Valencienne, 1836) juvenile. An Acad Bras Cienc, 1–13.
532 <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160446>.

533 Reis, E.G., D’Incao, F., 2000. The present status of artisanal fisheries of extreme
534 Southern Brazil: an effort to wards community-based management. Ocean Coast.
535 Manage. 43, 585-595.

536 Romagosa, E., Talmelli, E. F. A., Narahara, M.Y., Godinho, H.M., 2000. Tipo de
537 desova e fecundidade da *Mugil platanus* da região estuarino-lagunar de Cananéia,
538 SP. Atlântica, 22(único): 5-12.

539 Satake, F., Pádua, S. B., Ishikawa, M. M., 2009. Distúrbios morfológicos em células
540 sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. Cap. 13. In: Manejo
541 e Sanidade de Peixes em Cultivo. Tavares-Dias, M., 2009. Embrapa Amapá.

542 Sakthivel, R.e Devi, K. P., 2015. Evaluation of physicochemical properties, proximate
543 and nutritional composition of *Gracilaria edulis* collected from Palk Bay. Food
544 Chemistry. 174, 68–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.142>.

545 Salles J.P., Scherner. F., Fanganiello, M., Bouzon, Z. L, Horta, P.A., 2010. Cultivo de
546 algas nativas *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta) no Sul do Brasil. Braz Arc Biol
547 Tecno 53: 633-640.

548 Sampaio, L. A., Ferreira, A. H., Tesser, M. B., 2001. Effect of stocking density on
549 laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günther, 1880). Acta
550 Scientiarum, v. 23, n. 2, p. 471-475.

551 Sampaio, L. A., Wasielesky, W., Miranda-Filho. K. C., 2002. Effect of Salinity on
552 Acute Toxicity of Ammonia and Nitrite to Juvenile *Mugil platanus*. Bull. Environ.
553 Contam. Toxicol., 68:668–674. <http://doi:10.1007/s00128-001-0306-5>.

554 Secombes, C.J., Fletcher, T.C., 1992. The role of phagocytes in the protective
555 mechanisms of fish. Annual Review of Fish Diseases Journal, v.2, p.53-71.

556 Seedeви, P., Moovendhan, M., Viramani, S., Shanmugam, A., 2017. Bioactive potential
557 and structural chracterization of sulfated polysaccharide from seaweed (*Gracilaria*
558 *corticata*). Carbohydrate Polymers. 155, 516–524.

559 Shoemaker, C.A.; Klesius, P.H.; Lim, C., 2001. Immunity and Disease Resistance in
560 Fish. In: Lim, C., Webster, C.D. Nutrition and Fish Health. New York: Food
561 Products Press, p.149-162.

562 Smit, A. J., 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a
563 review. *Journal of Applied Phycology* 16: 245-262.

564 Souza, B. W.S., et al., 2012. Chemical characterization and antioxidant activity of
565 sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food*
566 *Hydrocolloids*. 27, 287 – 292.

567 Trichet, V.V., 2010. Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research*. 41: 829
568 321-449.

569 Valente, L. M. P., et al. 2006. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*,
570 *Ulva rígida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass
571 (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*. 252, 85–91.

572 Valente, L. M. P. et al. 2015. Iodine enrichment of rainbow trout flesh by dietary
573 supplementation with the red seaweed *Gracilaria vermiculophylla*. *Aquaculture*.
574 446, 132–139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.004>.

575 Vieira, J.P., 1991. Juvenile mullets (Pisces: Mugilidae) in estuary of Lagoa dos Patos,
576 487 RS, Brasil. *Copeia*, 2: 409-418.

577 Vosylienė, M. Z., 1999. The effects of heavy metals on haematological indices of fish
578 (Survey). *Acta Zoologica Lituanica*. v. 9, p.76-82.

579 Wahbeh, M. I., 1997. Amino acid and fatty acid profiles of four species of macroalgae
580 from Aqaba and their suitability for use in fish diets. *Aquaculture*. V. 159, p. 101-
581 109, [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00183-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00183-X).

582 Watts, M; Munday, B.L; Burke, C.M.2001. cDNA sequences and organization of IgM
583 heavy chain genes in two holostean fish. *Developmental and Comparative*
584 *Immunology*, v. 19, p. 153-164.

585 Xuan, X., Wen, X., Li, S., Zhu, D., Li, Y., 2013. Potential use of macro-algae
586 *Gracilaria lemaneiformis* in diets for the black sea bream, *Acanthopagrus*
587 *schlegelii*, juvenile. *Aquaculture*. 412–413, 167–172.
588 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.07.022>.

589 Yende, S. R., Harle, U. N., Chaugule, B. B., 2014. Therapeutic potential and health
590 benefits of *Sargassum* species. *Pharmacognosy Reviews*, v. 8, n. 15, p. 1 -7.

591 Yoshinaga, K., Okamoto, N., Kurata, O. e Ikeda, Y., 1994. Individual variations of
592 Natural Killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and
593 uninfected RTG-2 cells. *Fish Pathol.*, 29: 1-4.

594 Yoshizawa, Y., Ametani, A., Tsunehiro, J., Nomura, K., Itoh, M., Fukui, F.,
595 Kaminogawa, S., 1995. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide
596 fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structure-function relationships
597 and improved solubility. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (10), 1933–1937.

598 Yoshizawa, Y., Enomoto, A., Todoh, H., Ametani, A., Kaminogawa, S., 1993.
599 Activation of murine macrophages by polysaccharide fractions from marine algae
600 (*Porphyra yezoensis*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57 (11), 1862–1866.

601 Yoshizawa, Y., Tsunehiro, J., Nomura, K., Itoh, M., Fukui, F., Ametani, A.,
602 Kaminogawa, S., 1996. In vivo macrophage stimulation activity of the enzyme-
603 degraded water-soluble polysaccharide fraction from a marine alga (*Gracilaria*
604 *verrucosa*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 (10), 1667–1671.

605 Yu, Y.-Y., Chen W.- D., Liu Y.-J., Niu, J., Chen, M., Tian, L.-X., 2016. Effect of
606 different dietary levels of *Gracilaria lemaneiformis* dry power on growth
607 performance, hematological parameters and intestinal structure of juvenile Pacific
608 white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture.* 450, 356–362.
609 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.037>.

610 Zamora-sillero, B. J., Ramos, L. R. V, Romano, L. A., Monserrat, J. M., e Tesser, M.
611 B., 2013. Effect of dietary dextrin levels on the growth performance, blood
612 chemistry , body composition , hepatic triglicerides and glycogen of Lebranche
613 mullet juveniles (*Mugil liza* Valenciennes 1836 , Mugilidae), *J. Appl. Ichthyol.* 29,
614 1342–1347. <http://doi.org/10.1111/jai.12255>.

615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626

627 3. Objetivo Geral

628

629 Avaliar o efeito da inclusão da macroalga *Gracilaria domingensis* na ração de
630 juvenis da tainha *Mugil liza*.

631

632 3.1. Objetivos específicos

633

634 • Avaliar o desempenho zootécnico analisando as variáveis: ganho de peso,
635 conversão alimentar aparente, taxa de crescimento específico, eficiência
636 alimentar, eficiência proteica e sobrevivência dos juvenis de tainha
637 alimentados com dietas contendo diferentes percentuais de inclusão da farinha
638 da macroalga *G. domingensis*;

639

640 • Avaliar o teor corporal de Proteína (PB%), Lipídeos (EE%), Matéria seca
641 (MS%) e Cinzas (MM%) dos peixes alimentados com diferentes níveis de
642 inclusões da farinha da macroalga *G. domingensis*;

643

644 • Investigar por meio do leucograma e marcadores CD3 e CD4 no baço se a
645 inclusão de *Gracilaria domingensis* na ração de *Mugil liza* modula o sistema
646 imunológico .

647

648

649

CAPÍTULO I

650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676

Inclusão da macroalga *Gracilaria domingensis* na ração de juvenis de tainha *Mugil liza* (Valenciennes, 1836) e seu efeito no crescimento e resposta imune específica

Abstract

677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707

Macroalgae present benefits and importance in formulation of diets for aquatic organisms, being an excellent alternative in marine fish nutrition by stimulating growth, immune system and reducing production costs. The aim of this study was to evaluate the effect of the inclusion of the macroalgae *G. domingensis* in the diet of mullet juvenile, *Mugil liza*. In order to support this objective, studies on zootechnical performance, body chemical composition, differential blood cell counts and labeling of T lymphocytes anti-CD3 and anti-CD4 co-receptors were carried out, with the premise that the macroalgae could be used to improve the immune system without compromising the animal growth. Five diets with increasing levels of *G. domingensis* (0, 5, 10, 15 and 20%) were tested. The results of the experiment showed that fish of treatments with 0, 5 and 10% of *G. domingensis* obtained better zootechnical performance indexes. No significant differences were observed in body chemical composition and differential white blood cell count in fish in all treatments. Significant differences were found in labeled T lymphocytes by anti-CD3 and anti-CD4 techniques in the spleen, between the animals fed with control diet and animals fed diets containing macroalga inclusions. The inclusion of up to 10% of the *G. dominigensis* macroalgae in diets of mullet juveniles does not affect the animal's zootechnical performance. All levels of *G. domingensis* dietary inclusion led to an increase in the production of T lymphocytes indicating that there was a stimulation of animal's immune system.

Key words: Rhodophyta, imune system, mullet nutrition

708 1. Introdução

709

710 Algas vermelhas são consideradas promissoras fonte de nutrientes à alimentação
711 animal, por sua composição química ser adequada e seus compostos bioativos
712 estruturalmente diversos com ótimo potencial biomédico e farmacêutico (Fleurence,
713 2004).

714 A *Gracilaria domingensis* é uma espécie de macroalga pertencente às
715 Rhodophytas comumente encontrada na costa nordestina. Seu cultivo é viável no
716 nordeste e sul do Brasil. O interesse em pesquisas de seus metabólitos secundários com
717 moléculas potenciais e biologicamente ativas é crescente (Ramolov, et al., 2011).
718 Estudos mostram que o extrato da *G. domingensis* apresenta atividade antioxidante e
719 contêm ácidos graxos essenciais e carotenóides, podendo ser utilizadas como fonte de
720 antioxidantes em aplicações que necessitem destas propriedades (Guaratini, et al, 2012),
721 além de ser uma fonte potencial de proteínas, aminoácidos, lipídios e ácidos graxos
722 essenciais para dieta humana e animal (Gressler et al., 2010).

723 O efeito benéfico das algas como fonte de nutrientes foi demonstrado em várias
724 espécies de peixes (Valente, et al., 2006, 2015; Xuan et al., 2013; Tsuyoshi et al., 2010).
725 Thanigaivel et al., (2015) observaram que a administração de extratos e produtos das
726 algas *Gracilaria folifera*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cinereum* em tilápia
727 (*Oreochromis mossambicus*) pode ser eficaz nos tratamentos terapêuticos e profiláticos
728 contra infecção por *Pseudomonas* spp. Peixoto et al. (2016) constataram que a
729 suplementação de *Gracilaria* spp., *Fucus* spp. e *Ulva* spp. na dieta do robalo europeu
730 (*Dicentrarchus labrax*) melhorou as respostas imunológicas e antioxidantes sem
731 comprometer o desempenho zootécnico do animal.

732 A parede celular das algas é composta por polissacarídeos (ágar, carragenana e
733 alginato), alguns destes compostos podem potencializar a atividade imunológica de
734 animais. Segundo Yoshizawa et al. 1995, os polissacarídeos presentes na macroalga
735 *Porphyra yezoensis* tem a capacidade de ativar macrófagos *in vitro* e *in vivo* de ratos. A
736 macroalga *Gracilaria verrucosa* foi relatada para aumentar a atividade fagocítica
737 também em camundongos (Yoshizawa et al. 1995). Os polissacáridos sulfatados de
738 macroalgas têm mostrado efeito imunoestimulante, tanto em peixes como em camarões
739 (Rivera et al., 2002; Castro et al., 2003; Huang et al., 2006).

740 O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inclusão da macroalga *G.*
741 *domingensis* na dieta de juvenis da tainha *Mugil liza*. Com finalidade de respaldar esse
742 objetivo, foram realizados estudos sobre o desempenho zootécnico, composição
743 química corporal, perfil leucocitário e marcações de anticorpos anti-CD3 e anti-CD4 no
744 baço do animal, com o intuito de que a macroalga pudesse ser utilizada para melhorar o
745 sistema imunológico sem causar prejuízo do crescimento animal.

746

747 2. Material e Métodos

748

749 2.1. Material biológico e modelo experimental

750

751 O presente estudo foi realizado no Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha
752 (LAPEM), Estação Marinha de Aquicultura da Fundação Universidade do Rio Grande-
753 FURG, atendendo aos requisitos exigidos pelo Conselho Nacional de Controle de
754 Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética em Uso
755 Animal – CEUA/FURG, sob certificado de N° P074/2016. No LAPEM, os peixes foram
756 distribuídos em dois tanques (300L) para aclimação e manutenção, contendo água do
757 mar com salinidade de 30 ‰, temperatura 28°C e fotoperíodo 12h claro e 12h escuro. A
758 aclimação se estendeu por uma semana e, durante este período a os animais foram
759 alimentados 2 vezes ao dia com a ração controle (0% de inclusão de *G. domingensis*) do
760 experimento até a saciedade aparente.

761 Após este período, os juvenis de tainha ($0,42 \pm 0,03$ g) foram anestesiados com
762 benzocaína (50 ppm) para a tomada inicial das medidas biométricas e distribuição nos
763 15 tanques circulares (volume útil de 50 L) sob densidade de 15 juvenis/tanque,
764 totalizando uma biomassa média inicial de $6,32 \pm 0,05$ g por unidade experimental. Para
765 a realização do experimento, utilizou-se um sistema de recirculação de água, contendo
766 quinze tanques circulares, com filtro biológico, sistema de aeração constante e skimmer.
767 As condições de pH ($7,76 \pm 0,09$), salinidade ($30,7 \pm 0,60$ ‰), temperatura ($26 \pm$
768 $1,43$ °C) e fotoperíodo (12 h claro/12 horas escuro) atenderam níveis adequados para a
769 espécie. Para determinar o pH utilizou-se um pHmetro digital ($\pm 0,01$, YSI®-pH100,
770 Yellow Springs, OH, USA), a salinidade aferida com refratômetro ATAGO® (modelo
771 PAL-06S, Japan), oxigênio dissolvido ($6,56 \pm 0,35$ mg/L⁻¹) e temperatura foram

772 mensurados com um oxímetro (YSI 50A, Yellow Springs, OH, USA) diariamente. A
773 análise de alcalinidade ($92,17 \pm 14,87$ mg/L CaCO₃) foi realizada de acordo com Eaton
774 et al (2005), enquanto os níveis de nitrito ($0,53 \pm 0,32$ mg L⁻¹) foi mensurado pelo
775 método de Bendschneider e Robinson (1952) e amônia total ($0,27 \pm 0,14$ mg/L⁻¹)
776 segundo metodologias descritas pela UNESCO (1983).

777 Diariamente, dez por cento do volume total de água de cada tanque foi renovado,
778 sendo a água previamente tratada (clorada 30 ppm e declorada com aproximadamente
779 0,5g de vitamina C). A sifonagem das unidades experimentais para remoção fezes e
780 sobras de ração, foram realizadas diariamente, sendo o volume de água perdido repostado
781 igualmente mantendo a qualidade inicial do experimento.

782 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, compreendendo cinco
783 tratamentos, conforme os níveis de inclusão da macroalga *G. domingensis*: controle 0%
784 de inclusão de *G. domingensis* (0,0 g kg⁻¹ de ração); 5% (50,0 g kg⁻¹ de ração), 10%
785 (100,0 g kg⁻¹ de ração); 15% (150,0 g kg⁻¹ de ração) e 20% (200,0 g kg⁻¹ de ração).
786 Todos os tratamentos foram efetuados em triplicata. As dietas experimentais foram
787 oferecidas quatro vezes ao dia (8:00, 11:00, 14:00 e 17:00), a uma taxa de 10% do peso
788 corporal (g d⁻¹), cessando quando os peixes alcançavam saciedade aparente.

789

790 **2.2. Dietas experimentais e composição proximal**

791

792 A macroalga *G. domingensis* seca foi adquirida do Laboratório de Tecnologia do
793 Pescado da Universidade Federal do Piauí - UFPI.

794 As dietas foram isoproteicas (35% de proteína bruta), segundo Carvalho et. al.
795 (2010). Previamente, determinou-se a composição proximal dos ingredientes no
796 Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA/FURG), conforme os
797 métodos padrões descritos pela AOAC (1999). Para aferir a matéria seca (MS), as
798 amostras foram mantidas em estufa (102°C) por 5 h; para obtenção e quantificação das
799 cinzas (MM), as amostras sofreram uma pré-calcinação e posteriormente foram levadas
800 à mufla (600°C) por 5 h; a determinação do teor de proteína bruta (PB) foi efetuada de
801 acordo com a metodologia de Kjeldahl e, após digestão e destilação do nitrogênio da
802 amostra, multiplicou-se o resultado por 6,25; para determinação do extrato etéreo (EE),
803 as amostras foram submetidas ao extrator de Soxhlet, utilizando-se éter de petróleo

804 como solvente por 5 h. Por fim, para fibra bruta (FB), as amostras sofreram digestão
 805 ácida e básica durante 30 minutos em cada digestão, seguida pela queima do resíduo em
 806 mufla a 500°C, sendo o valor de FB obtida por diferença entre os valores conforme a
 807 metodologia descrita por Silva e Queiroz, 2009. Após se obter os resultados para os
 808 parâmetros descritos anteriormente, calculou-se o extrativo não nitrogenado (ENN) das
 809 rações através da diferença entre os valores somados de proteína bruta, extrato etéreo,
 810 cinzas e fibra bruta. Para obtenção do ágar foi utilizado os padrões conforme Villanueva
 811 et al. (2010), com algumas modificações. Foi pesado 1,5g da macroalga seca, colocadas
 812 em um becker de 100 mL, onde foram adicionados 15 mL de água destilada. Ajustou-se
 813 o pH para 4,0 utilizando ácido sulfúrico (H₂SO₄). A amostra assim tratada foi mantida
 814 sobre chapa aquecedora (80°C), por até 3 horas. Após esse tempo, acrescentou-se 50
 815 mL de água destilada e seguidamente, ajustou-se o pH para 6,0 utilizando solução de
 816 hidróxido de sódio (NaOH). O produto resultante formado (sólidos, água e gel) foi
 817 filtrado e o gel resultante recolhido e deixado em repouso sob refrigeração (4,0°C ± 0,5)
 818 por um período de 24 horas. Seguiu-se a metodologia da AOAC (1999) para
 819 determinação da matéria seca, para posterior cálculo de rendimento.

820 Para o preparo das rações, os ingredientes foram misturados seguindo a menor
 821 proporção para a maior, com a adição de óleo de peixe ao final do preparo e, adição de
 822 água para a peletização. Após obtenção dos péletes, as rações foram postas em estufa
 823 com circulação de ar a 65°C por 12h e depois de secas armazenadas em freezers a -
 824 20°C. A formulação e composição centesimal das rações são apresentadas na Tabela 1.

825

826 Tabela 1. Formulação das dietas com inclusão de *Gracilaria domingensis* e sua
 827 respectiva composição química.

| Ingredientes (g kg ⁻¹) | Tratamentos | | | | |
|------------------------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|
| | G0 | G5 | G10 | G15 | G20 |
| Farinha de Peixe | 320 | 320 | 320 | 320 | 320 |
| * <i>G. domingensis</i> | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 |
| Farelo de soja | 170 | 170 | 170 | 170 | 170 |
| Milho | 250 | 200 | 150 | 100 | 50 |
| Óleo peixe | 45 | 45 | 45 | 45 | 45 |
| Amido milho | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 |
| Celulose | 55 | 55 | 55 | 55 | 55 |
| Vit. e Min. Mix | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Composição química | | | | | |

| | | | | | |
|-----|---------|---------|---------|----------|----------|
| MS | 97,78 | 98,49 | 98,37 | 98,35 | 98,31 |
| PB | 35,44 | 35,18 | 35,38 | 35,68 | 36,29 |
| FB | 7,50 | 7,08 | 8,00 | 8,08 | 8,47 |
| EE | 8,08 | 7,58 | 7,29 | 7,06 | 7,00 |
| MM | 7,83 | 8,76 | 9,75 | 10,69 | 12,08 |
| ENN | 41,14 | 41,40 | 39,68 | 38,50 | 36,30 |
| EB | 4760,45 | 4691,77 | 4633,40 | 4592,581 | 4535,166 |

828 G0 (0% de inclusão de *G. domingensis*), G5(5% de inclusão de *G. domingensis*), G10 (10% de
829 inclusão de *G. domingensis*), G15 (15% de inclusão de *G. domingensis*) e G20 (20% de inclusão de
830 *G. domingensis*). * *G. domingensis*, matéria seca (%) 93,55, proteína bruta (%) 8,61, fibra bruta (%)
831 4,73, extrato etéreo (%) 1,45 e matéria mineral (%) 22,32, ágar (%) 54,27.
832

833 2.3. Coleta de amostras e fixação

834

835 Ao final do período experimental os indivíduos foram eutanasiados com benzocaína
836 (500 ppm) e pesados em balança digital com precisão de 0,01g (MARTE, modelo -
837 BL3200H) para aferição dos parâmetros de desempenho zootécnicos. Na sequência,
838 amostras de sangue foram tomadas via corte no pedúnculo caudal para a preparação das
839 lâminas de extensão sanguínea (n= 45). Os baços (n= 45 juvenis de *M. liza*) também
840 foram coletados, fixados em formol tamponado a 20% e reservados para análises
841 histológicas.

842

843 2.4. Parâmetros Zootécnicos

844

845 Foram determinados os seguintes parâmetros:

846

- 847 1- Ganho de peso (g) = peso final – peso inicial;
- 848 2- Conversão alimentar aparente (g) = ração fornecida / ganho de peso;
- 849 3- Taxa de crescimento específico (g) = [(ln peso final – ln peso inicial) / dias de
850 criação] * 100;
- 851 4- Taxa de eficiência proteica (g): ganho de peso (g) / proteína ingerida (g);
- 852 5- Sobrevivência (%) = (quantidade final de animais / quantidade inicial dos
853 animais) * 100.

854

855 **2.5. Composição química corporal**

856

857 A composição química corporal matéria seca (MS%), matéria mineral (MM%),
858 extrato etéreo (EE%) e proteína bruta (PB%) dos peixes foi determinada no
859 LANOVA/FURG, a partir da maceração de quatro peixes inteiros e eviscerados (pool)
860 por tanque (AOAC, 1999).

861

862 **2.6. Extensão sanguínea**

863

864 Nove lâminas por tratamento foram confeccionadas. Após realizada a extensão
865 sanguínea, as lâminas foram fixadas em metanol por 30 minutos, coradas com Giemsa
866 (Rosenfeld, 1947) e reservadas para posterior contagem diferencial de células de
867 leucócitos (monócitos, linfócitos e granulócitos). Para a contagem diferencial utilizou-se
868 os padrões descritos por Ranzani-Paiva et al. (2013) com adaptações, em que a lâmina
869 foi percorrida em forma de Z, sendo em sua extensão capturadas dez imagens com
870 auxílio de uma câmara axiocam ERc-5s acoplada em um microscópio (Primo Star
871 Zeiss) na objetiva (40×). Todas as imagens capturadas foram consideradas na contagem
872 os linfócitos, monócitos e granulócitos (sem haver diferenciação). Os resultados são
873 apresentados em porcentagem por tratamento.

874

875 **2.7. Imunohistoquímica**

876

877 Foi avaliado o desenvolvimento das células hematopoiéticas no baço. O número
878 amostral utilizado foi de nove indivíduos de cada tratamento realizado. Os baços
879 coletados foram fixados em formol tamponado 20% e posteriormente incluídos em
880 paraplast, sendo marcados de acordo com a metodologia ABC peroxidase (Vectastain
881 Elite ABC Kit, Canada), descrita por Hsu et al. (1981). A imunohistoquímica foi
882 realizada com anticorpos monoclonais anti-Cd3 (Sigma®, USA) e anti-Cd4 (Dako,
883 Argentina). Os cortes histológicos foram lavados (0.1% diaminobenzidina),
884 desidratadas e coradas com hematoxilina para sua posterior avaliação.

885 Avaliação dos receptores CD3 e CD4 se fez por análise quantitativa da
886 porcentagem da expressão fenotípica por 100 milímetros quadrado de tecido (Romano
887 et al., 1996). A expressão dos receptores CD3 e CD4, mediante as análises

888 morfométricas, foi quantificada utilizando o software Bioscan OPTIMAS® 6.1
889 (Romano et al., 1996, Weibel, 1982).

890

891 **2.8. Análise Estatística**

892

893 Todos os dados obtidos tiveram os pressupostos de normalidade (Shapiro-Wilk)
894 e homogeneidade (Levene) avaliados. Se pelo menos um destes requisitos não foi
895 atendido, aplicou-se transformações matemáticas. Uma vez atendido estes pressupostos,
896 os dados foram submetidos à ANOVA de uma via e, quando houve diferenças
897 estatísticas significativas detectadas entre os tratamentos, as médias foram comparadas
898 pelo Teste de Tukey. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi empregado quando
899 os dados apresentavam distribuição não normal ou não homogênea. Todas as análises
900 foram realizadas com um nível mínimo de significância de 5% ($p < 0,05$).

901 **3. Resultados**

902

903 **3.1. Desempenho zootécnico**

904

905 Os juvenis de tainha apresentaram maior peso final e ganho de peso quando
906 alimentadas com as dietas G0 (0% de inclusão de *G. domingensis*), G5, G10 e G15%,
907 onde a G20 apresentou diferença significativa quando comparada a G0. O menor peso
908 final e ganho de peso foi registrado para os peixes alimentados com dieta contendo 15 e
909 20% de *G. domingensis*. A conversão alimentar aparente (CAA) foi significativamente
910 menor ($P < 0,05$) nos tratamentos G0, G5 e G10, sendo G15 e G20 estatisticamente
911 diferente de G0. A menor taxa de crescimento específico (TCE) foi encontrada nos
912 peixes alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de *G. domingensis*. Contudo, a
913 TCE não apresentou diferenças significativas em até 10% de inclusão desta macroalga
914 em relação ao tratamento controle ($P > 0,05$). A maior taxa de retenção proteica (TEP)
915 foi verificada nos peixes alimentados com a dieta controle, sendo estatisticamente igual
916 ($P > 0,05$) ao tratamento com G5 e significativamente melhor ($P < 0,05$) quando
917 comparada aos animais que receberam dietas contendo 10, 15 e 20% de *G. domingensis*.
918 Não foram detectadas diferenças significativas na sobrevivência entre os tratamentos (P
919 $> 0,05$) (Tabela 2).

920

921 Tabela 2. Parâmetros de desempenho zootécnico de juvenis de tainha (*M. liza*)
 922 alimentadas com diferentes níveis de inclusão da macroalga *G. domingensis* na ração.

| Parâmetros | Tratamentos com níveis de inclusão de <i>G. domingensis</i> | | | | |
|-------------------|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | G0 | G5 | G10 | G15 | G20 |
| Peso inicial (g) | 0,42 ± 0,03 | 0,42 ± 0,03 | 0,42 ± 0,03 | 0,42 ± 0,03 | 0,43 ± 0,03 |
| Peso final (g) | 3,95 ± 0,05 ^a | 3,41 ± 0,29 ^{ab} | 3,40 ± 0,23 ^{ab} | 3,16 ± 0,18 ^{bc} | 2,82 ± 0,18 ^c |
| Ganho de Peso (g) | 3,53 ± 0,05 ^a | 2,99 ± 0,29 ^{ab} | 2,98 ± 0,23 ^{ab} | 2,74 ± 0,18 ^{bc} | 2,39 ± 0,18 ^c |
| CAA (g) | 1,82 ± 0,05 ^a | 2,14 ± 0,14 ^{ab} | 2,29 ± 0,26 ^{ab} | 2,33 ± 0,05 ^{bc} | 2,58 ± 0,09 ^c |
| TCE | 3,74 ± 0,02 ^a | 3,50 ± 0,13 ^{ab} | 3,47 ± 0,09 ^{ab} | 3,36 ± 0,10 ^{bc} | 3,14 ± 0,12 ^c |
| TEP | 1,55 ± 0,04 ^a | 1,33 ± 0,09 ^{ab} | 1,25 ± 0,15 ^{bc} | 1,20 ± 0,15 ^{bc} | 1,07 ± 0,04 ^c |
| Sobrevivência (%) | 86,67 ± 5,44 | 88,89 ± 3,14 | 84,44 ± 11,33 | 80,00 ± 0,00 | 93,33 ± 5,44 |

923 Valores médios das réplicas (± desvio padrão). Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças
 924 significativas segundo o teste Tukey (P<0,05). Para os dados de sobrevivência foi aplicado o teste de
 925 Kruskal-Wallis. CAA: Conversão Alimentar Aparente; TCE: Taxa de Crescimento Específico; e TEP:
 926 Taxa de Eficiência Proteica. G0: 0% de farinha de *G. domingensis*; G5: 5% de farinha de *G. domingensis*;
 927 G10: 10% de farinha de *G. domingensis*; G15: 15% de farinha de *G. domingensis* e G20: 20% de farinha
 928 de *G. domingensis*.

929

930 3.2. Composição química corporal

931

932 Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para
 933 matéria seca (MS%), matéria mineral (MM%), extrato etéreo (EE%) e proteína bruta
 934 (PB%) (P>0,05) (Tabela 3).

935

936 Tabela 3 - Composição química corporal de juvenis de tainha (*M. liza*) alimentados com ração
 937 contendo diferentes níveis de inclusão de *G. domingensis*.

| | Tratamentos com níveis de inclusão de <i>G. domingensis</i> | | | | |
|-----|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | G0 | G5 | G10 | G15 | G20 |
| MS% | 33,29 ± 1,27 | 33,08 ± 1,16 | 32,09 ± 0,17 | 30,71 ± 0,14 | 31,60 ± 1,39 |
| MM% | 4,79 ± 0,29 | 4,76 ± 0,31 | 4,68 ± 0,13 | 4,92 ± 0,05 | 4,74 ± 0,10 |
| EE% | 8,92 ± 1,12 | 8,80 ± 1,09 | 8,64 ± 0,13 | 7,37 ± 0,26 | 7,31 ± 0,91 |
| PB% | 18,26 ± 0,65 | 18,26 ± 0,40 | 18,09 ± 0,31 | 17,72 ± 0,05 | 18,33 ± 0,47 |

938 Os valores não apresentaram diferenças significativas (P < 0,05) entre linhas de acordo com o teste
 939 ANOVA. MS: matéria seca; MM: matéria mineral; EE: extrato etéreo; PB: proteína bruta. G0: 0% de
 940 farinha de *G. domingensis*; G5: 5% de farinha de *G. domingensis*; G10: 10% de farinha de *G.*
 941 *domingensis*; G15: 15% de farinha de *G. domingensis* e G20: 20% de farinha de *G. domingensis*.

942

943 3.3. Contagem diferencial de leucócitos

944

945

946 Os percentuais médios de granulócitos, linfócitos e monócitos não apresentaram
947 diferenças ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 4).

948

949 Tabela 4 – Contagem diferencial de leucócitos em juvenis de tainha (*Mugil liza*), alimentados
950 com dieta contendo diferentes níveis de inclusão de *G. domingensis*

| | Tratamentos com níveis de inclusão de <i>G. domingensis</i> | | | | |
|------------------|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | G0 | G5 | G10 | G15 | G20 |
| Granulócitos (%) | 19,85 ± 1,27 | 14,29 ± 2,93 | 18,11 ± 2,17 | 16,84 ± 3,45 | 16,12 ± 3,80 |
| Linfócitos (%) | 78,17 ± 1,47 | 84,51 ± 3,09 | 80,66 ± 2,25 | 81,65 ± 2,66 | 82,45 ± 3,54 |
| Monócitos (%) | 1,97 ± 0,36 | 1,20 ± 0,16 | 1,23 ± 0,40 | 1,51 ± 0,80 | 1,43 ± 0,26 |

951 Os valores não apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre linhas de acordo com o teste
952 ANOVA. Para os dados de linfócitos e monócitos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. G0: 0% de
953 farinha de *G. domingensis*; G5: 5% de farinha de *G. domingensis*; G10: 10% de farinha de *G.*
954 *domingensis*; G15: 15% de farinha de *G. domingensis* e G20: 20% de farinha de *G. domingensis*
955

956 3.4. Imunohistoquímica (IHC)

957

958 A percentagem dos anticorpos primários anti-CD3 e anti-CD4 nas células do
959 baço de juvenis de *M. liza* foi menor no tratamento controle e significativamente maior
960 ($P < 0,05$) nos demais tratamentos com inclusão da macroalga *G. domingensis* sem
961 diferirem entre si (Tabela 5).

962

963

964 Tabela 5 – Marcação de anticorpos primários anti-CD3 e anti-CD4 no baço de juvenis de tainha
965 (*Mugil liza*), alimentadas com dieta contendo diferentes níveis de inclusão de *G. domingensis*.

| | G0 | G5 | G10 | G15 | G20 |
|-------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| CD3 (cel/mm ²) | 52,0 ± 5,79 ^b | 82,27 ± 7,04 ^a | 75,93 ± 15,46 ^a | 86,40 ± 6,79 ^a | 79,53 ± 5,22 ^a |
| CD4 (cel/mm ²) | 75,13 ± 11,15 ^b | 103,33 ± 13,06 ^a | 105,27 ± 9,67 ^a | 116,80 ± 4,81 ^a | 103,53 ± 4,41 ^a |

966 Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos segundo teste
967 Tukey ($P > 0,05$). G0: 0% de farinha de *G. domingensis*; G5: 5% de farinha de *G. domingensis*; G20: 10%
968 de farinha de *G. domingensis*; G15: 15% de farinha de *G. domingensis*; G20: 20% de farinha de *G.*
969 *domingensis*.

970

971

972

973

974 4. Discussão

975

976 O efeito da inclusão de algas marinhas em dietas peixes depende da espécie de
977 alga, do nível de inclusão na dieta e da espécie de peixe utilizada. Neste estudo a
978 inclusão de 5 a 10% da macroalga *Gracilaria domingensis* não causou prejuízos ao
979 desempenho zootécnico da *M. liza* após 60 dias. De modo semelhante, Al-Asgah et al.
980 (2016) determinaram que o uso de até 10% de *Gracilaria arcuata* na dieta do catfish
981 africano (*Clarias gariepinus*) não afetou o crescimento dos animais em relação ao
982 controle. Por outro lado, quando alimentados com ração contendo 15 a 20% de *G.*
983 *domingensis* os juvenis de tainha apresentaram menores índices de desempenho
984 zootécnico. Wen et al. (2013) observaram menor ganho de peso do pargo preto
985 (*Acanthopagrus schlegelii*) alimentados com inclusão acima 5% de *Gracilaria*
986 *lemaniformis*, atribuindo este resultado a presença de polissacarídeos solúveis não
987 amilacéos (NSPs) e ao alto teor de minerais (19,7%) na macroalga. A *G. domingensis* é
988 rica em ágar (54,27%), ficocólide encontrado principalmente nas espécies pertencentes
989 aos gêneros *Gracilaria* e *Gelidium* (Cregut e Rondags, 2013). O ágar em seu estado
990 natural, ocorre como carboidrato estrutural da parede celular das algas agarófitas,
991 podendo apresentar-se na forma de sais de cálcio (Ca) ou mistura de sais de Ca e
992 magnésio (Mg), é uma mistura de dois tipos de polissacarídeos: a agarose (polímero
993 neutro) e a agarpectina (polímero com carga sulfatado) (Arvizu-Higuera, et al., 2007).
994 O ágar é considerado um fator antinutricional já que limitam a digestibilidade das
995 frações proteicas (Horie, et al., 1995). Entretanto, alguns estudos comprovam que os
996 polissacarídeos sulfatados das algas têm efeitos antioxidantes, antitumorais e melhoram
997 a imunidade do organismo (Deng e Ji 1995; Matsui et al., 2003; Wen et al., 2006).

998 Por outro lado, sabe-se que NSPs geram redes funcionais que se ligam a água e
999 minerais, além de que, trocam cátions e absorvem compostos orgânicos (Brinker, 2009).
1000 Este polissacarídeo solúvel em água é viscoso, e por isso, eleva a viscosidade da dieta e
1001 durante a digestão intestinal, prejudicando a digestibilidade das proteínas e lipídios
1002 (Francis et al., 2001). Estimando-se que a concentração de ágar na dieta é crescente
1003 (G0:0g, G5: 27,14g, G10:54,27g, G15: 81,41g; G20: 108,54g/kg da dieta), isto poderia
1004 explicar a diminuição da TEP com níveis de inclusão acima de 5% de *G. domingensis*
1005 na dieta para juvenis de *M. liza*. Importante acrescentar que a *M. liza* possui dificuldade
1006 em assimilar carboidratos complexos, em função do efeito em retardar o trânsito
1007 gastrointestinal, prejudicando a absorção de nutrientes (Ramos et al., 2015a).

1008 A composição química corporal, não foi afetada com a inclusão da macroalga na
1009 dieta. Stadlander et al. (2013) não foi encontrada diferenças significativa na
1010 composição corporal da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) com a incorporação de
1011 15 e 30% da alga vermelha (*Porphyra yezoensis*), que possui quantidade considerável
1012 de polissacarídeos não amilacéos (NSPs) na composição. Al-Asgah et al. (2015)
1013 afirmam que inclusões acima de 20% *G. arcuata* na dieta de *Clarias gariepinus*
1014 aumenta a deposição de proteína e lipídeos na carcaça dos animais. Porém, Xaun et al.
1015 (2013) afirmam que a inclusão de 20% de *G. lemaneiformis* na dieta *Acanthopagrus*
1016 *schlegelii*, diminuiu o nível de lipídio corporal do animal, podendo ser reflexo parcial da
1017 diminuição da digestibilidade lipídica. Como mencionado anteriormente, os NSPs
1018 reduzem a digestão e absorção de nutrientes diminuindo a ação das enzimas digestivas
1019 (Francis et al., 2001). Peixoto et al. (2016) notaram que inclusões entre 2,5 e 7,5 das
1020 macroalgas *Gracilaria* spp., *Ulva* spp., e *Fucus* spp. em dietas de *Dicentrarchus labrax*
1021 não afetam o crescimento dos animais, no entanto concluiu que estas possuem efeito
1022 imunoestimulante.

1023 As macroalgas podem apresentar efeito imunoestimulante em peixes (Castro et
1024 al., 2006, Peixoto et al., 2016). Os principais componentes do sistema imunológico a
1025 nível celular são leucócitos, principalmente os linfócitos, monócitos e granulócitos. Eles
1026 são responsáveis pela destruição não seletiva de patógenos, utilizando diversos
1027 mecanismos de ação (Tort et al., 2003). No presente estudo a contagem diferencial de
1028 leucócitos não foi alterada em função dos diferentes níveis de inclusão da *G.*
1029 *domingensis* na dieta para juvenis de tainha. Mas, a suplementação alimentar com
1030 ergosan (complemento alimentar a base de macroalgas marinhas) para *Huso huso* com
1031 valores de 2,0, 4,0 e 6,0 g kg⁻¹ na dieta, incrementou a quantidade de linfócitos e
1032 diminuiu os granulócitos (Jalali et al., 2009). Tendência similar foi verificada em *M.*
1033 *liza* neste estudo, apesar de não ser detectada diferenças significativas entre os
1034 tratamentos. Adel et al. (2016), investigaram o efeito da suplementação de *Spirulina*
1035 *platensis* na dieta para esturjão e concluíram que as concentrações 2,5%, 5% e 10% têm
1036 diferentes efeitos sobre o número de leucócitos sanguíneos (dependendo da célula
1037 leucocitária). Contudo, a suplementação de 10% de *S. platensis* na dieta, melhora a
1038 resposta imune e resistência a doenças em *H. huso*. A *G. domingensis* é fonte de
1039 carotenoides como zeaxantina e β-caroteno (Ramlov et al., 2011). Amar et al. (2000)
1040 comprovou que a suplementação de carotenoides na dieta de truta incrementa a proteção

1041 de macrófagos ao estresse, aumentando eficiência de resposta deles. Entretanto, a
1042 presença de alguns ácidos graxos n-3 e n-6 podem inibir a produção de leucócitos em
1043 humanos (Calder, 2001) o que poderia ser um fator que explique a não variação entre as
1044 células brancas.

1045 O baço é um órgão importante para o sistema imune, onde ocorre a maturação
1046 dos linfócitos T (Manning, 1994). Os co-receptores CD3 e CD4 têm sido identificados e
1047 utilizados como marcadores de linfócitos T, mediante a utilização de anticorpos de
1048 células humanas (Germain, 2002). Apesar da contagem diferencial das células brancas
1049 se mostrem iguais, quando realizada a imuno-histoquímica, foram encontradas
1050 diferenças na marcação de anticorpos primários anti-CD3 e anti-CD4 no baço dos
1051 peixes alimentados com dieta controle e com as dietas contendo diferentes inclusões da
1052 macroalga. Isto sugere que em todos os níveis de inclusão (5%, 10%, 15% e 20%)
1053 houve maior produção de linfócitos T3 e T4. Linfócito T3 é um marcador universal de
1054 linfócitos tímico que expressa o receptor CD3, enquanto o linfócito T4 é considerado
1055 regulador tanto da resposta imune humoral e celular expressando receptor CD4
1056 (Marrack e Kappler, 1987; Romano, 2010). Fuhr et al. (2016) mencionaram que uma
1057 maior produção de linfócitos T indica uma maior estimulação imune do organismo.
1058 Algumas pesquisas têm identificado incremento na resposta imune não específica. Xu et
1059 al. (2011) avaliaram a resposta imune do peixe *Siganus Canaliculatus* alimentado com a
1060 macroalga *G. lemaneiformis* e, afirmam que inclusão de 33% da dieta diminui o
1061 crescimento do animal, no entanto melhora a resposta imune não-específica, neste caso,
1062 aumentando a atividade da lisozima. Yin et al. (2014) reportaram que concentrações
1063 médias de 1,0 e 1,5% *laminarina* na suplementação da dieta de *Epinephelus*
1064 *coioides* também estimula a atividade da lisozima. Rejandran et al. (2016), avaliando o
1065 efeito imunoestimulador da suplementação do polissacarídeo da *Padina gymnospora* na
1066 dieta de *Cyprinus carpio* em diferentes concentrações (0,01%, 0,1% e 1,0%), notaram
1067 que os peixes alimentados com dietas contendo 0,1% e 1,0% daquele polissacarídeo
1068 responderam com um aumento no número de anticorpos produzidos pelos organismos e,
1069 como consequência, incrementou-se também a resistência a organismos patógenos.

1070

1071 **5. Conclusão**

1072

1073 A inclusão de até 5% da macroalga *G. dominigensis* na dieta de juvenis de tainha
1074 *M. liza* não prejudicou o desempenho zootécnico. A composição química corporal e
1075 contagem diferencial de células brancas não foi afetada com a inclusão desta macroalga
1076 na dieta. Todos os níveis de inclusão dietética da *G. domingensis* levaram a um aumento
1077 na produção de linfócitos T, indicando que houve uma estimulação do sistema imune do
1078 animal. Em geral, os resultados indicam que a inclusão da macroalga na dieta de
1079 organismos aquáticos pode ser uma estratégia para aumentar a imunocompetência sem
1080 comprometer o desempenho de crescimento dos animais.

1081

1082 **6. Referências Bibliográficas**

1083

1084 Adel, M., Yeganeh, S., Dadar, M., Sakai, M., Dawood, M. A., 2016. Effects of dietary
1085 *Spirulina platensis* on growth performance, humoral and mucosal immune
1086 responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus,
1087 1754). *Fish & shellfish immunology*, 56, 436-444.

1088 Al-Asghah, N. A., Younis, E. S. M., Abdel-Warith, A. W. A., Shamlol, F. S., 2016.
1089 Evaluation of red seaweed *Gracilaria arcuata* as dietary ingredient in African
1090 catfish, *Clarias gariepinus*. *Saudi journal of biological sciences*, 23(2), 205-210.

1091 Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N., Watanabe, T., 2000. Effects of dietary
1092 β -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.
1093 *Fisheries Science* 66:1068–1075.

1094 Aoac, 1999. Official methods of analysis of the Association of Official
1095 Analytical Chemists, 16th ed. Washington, DC, USA.

1096 Arvizu-Higuera, D.L; Rodríguez-Montesinos, Y.E.; Murillo-Álvarez, J.I.; Munoz-
1097 Ochoa, M.; Hernández-Carmona, G. 2007. Effect of alkali treatment time and
1098 extration time on agar from *Gracilaria Vermiculophylla*. México: *Journal of*
1099 *Applied Phycology*.

1100

1101 Bendschneider, K., Robinson, R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the
1102 determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.* 11, 87-96.

- 1103 Brinker, A., 2009. Improving the mechanical characteristics of faecal waste in rainbow
1104 trout: the influence of fish size and treatment with a non-starch polysaccharide
1105 (guar gum). *Aquaculture nutrition*, 15(3), 229-240.
- 1106 Calder, P. C., 2001. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids*,
1107 36(9), 1007-1024.
- 1108 Carvalho, C.V. A., Bianchini, A., Tesser, M. B., Sampaio, L. A., 2010. The effect of
1109 protein levels on growth, post prandia excretion and tryptic activity of juvenile
1110 mullet *Mugil platanus* (Günther). *Aquaculture Research*. 41, 511 – 518.
- 1111 Castro, R., Zarra, I., Lamas, J., 2003. Water-soluble seaweed extracts modulate the
1112 respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture*. Amsterdam.
- 1113 Castro, R., Piazzon, M. C., Zarra, I., Leiro, J., Noya, M., Lamas, J., 2006. Stimulation of
1114 turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. *Aquaculture*, 254(1),
1115 9-20. .2005.10.012.
- 1116 Cregut, M., Rondags, E., 2013. New insights in agar biorefinery with arylsulphatase
1117 activities. *Process Biochemistry*, 48(12), 1861-1871.
- 1118 Deng, Z. F., Ji, M. H., 1995. Composition of polysacharrides of *Gracilaria sjoestedtii*
1119 *kylin* and *G. textorii* (sur.) De-Toni (Rhodophyta) and their antitumor effect.
1120 *Oceanol Imnol Sin* 26:575–581
- 1121 Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Rice, E. W., Greenberg, A. E., 2005. Standard methods for
1122 the examination of water and wastewater, 21st ed. American Public Health
1123 Association, Washington.
- 1124 Fleurence, J., 2004. Seaweed proteins. *Proteins in food processing*. Woodhead
1125 publishing, Cambridge, 197-213.
- 1126 Francis, G., Makkar, H. P., Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant-
1127 derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199(3),
1128 197-227.

- 1129 Führt, F., Tesser, M. B., Rodrigues, R. V., Pedron, J., Romano, L. A., 2016. *Artemia*
1130 enriched with hydrolyzed yeast improves growth and stress resistance of marine
1131 pejerrey *Odontesthes argentinensis* larvae. *Aquaculture*, 450, 173-181.
- 1132 Germain, R. N., 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature*
1133 *reviews. Immunology*, 2(5), 309.
- 1134 Gressler, V., Yokoya, N. S., Fujii, M. T., Colepicolo, P., Mancini Filho, J., Torres, R.
1135 P., Pinto, E., 2010. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four
1136 Brazilian red algae species. *Food Chem* 120: 585-90.
- 1137 Guaratini, I. T., Lopes, N. P., Marinho-Soriano, E., Colepicolo, P.; Pinto, E., 2012.
1138 Antioxidant activity and chemical composition of the non polar fraction of
1139 *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie and *Gracilaria birdiae*
1140 (Plastino & Oliveira). *Rev. bras. farmacogn.* v.22 no.4.
1141 <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000063>.
- 1142 Horie, Y., Sugase, K., Horie, K., 1995. Physiological difference of soluble and insoluble
1143 dietary fibre fractions of brown algae and mushrooms in pepsin activity in vitro and
1144 protein digestibility. *Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 4, 251-255.
- 1145 Hsu, S., Raine, L., Fanger, H., 1981. Use of Avidin- Biotin-Peroxidase Complex (ABC)
1146 in Immunoperoxidase Techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody
1147 (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580.
- 1148 Huang, X., Zhou, H., Zhang, H., 2006. The effect of *Sargassum fusiforme*
1149 polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp,
1150 *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish e Shellfish Immunology*. v. 20, p. 750-757.
- 1151 Jalali, M. A., Ahmadifar, E., Sudagar, M., Takami, G. A., 2009. Growth efficiency,
1152 body composition, survival and haematological changes in great sturgeon (*Huso*
1153 *huso* Linnaeus, 1758) juveniles fed diets supplemented with different levels of
1154 Ergosan. *Aquaculture Research*, 40(7), 804-809.
- 1155 Manning, M. J., Turner, R.J., 1994. *Immunology: a comparative approach*. John Wiley,
1156 New York, pp 69–100.

- 1157 Marrack, P., Kappler, J., 1987. The T cell receptor. *Science*, 238(4830), 1073-1080.
- 1158 Manning, M. J., Turner, R.J., 1994. *Immunology: a comparative approach*. John
1159 Wiley, New York, pp 69–100.
- 1160 Matsui, M. S., Muizzuddin, N., Arad, S., Marenus, K., 2003. Sulfated polysaccharides
1161 from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. *Applied*
1162 *biochemistry and biotechnology*, 104(1), 13-22.
- 1163 Mavromichalis, I., (06 de fev. 2016). 5 functional properties of marine algae for animal
1164 health. Wattagnet.com. [http://www.wattagnet.com/articles/23916-functional-](http://www.wattagnet.com/articles/23916-functional-properties-of-marine-algae-for-animal-health)
1165 [properties-of-marine-algae-for-animal-health](http://www.wattagnet.com/articles/23916-functional-properties-of-marine-algae-for-animal-health).
- 1166 Peixoto, M. J., Salas-Leitón, E., Pereira, L. F., Queiroz, A., Magalhães, F., Pereira, R.,
1167 de Almeida Ozório, R. O., 2016. Role of dietary seaweed supplementation on
1168 growth performance, digestive capacity and immune and stress responsiveness in
1169 European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Reports*, 3, 189-
1170 197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.03.005>.
- 1171 Rajendran, P., Subramani, P. A., Michael, D., 2016. Polysaccharides from marine
1172 macroalga, *Padina gymnospora* improve the nonspecific and specific immune
1173 responses of *Cyprinus carpio* and protect it from different pathogens. *Fish &*
1174 *shellfish immunology*, 58, 220-228.
- 1175 Ramlov, F., Souza, J., Faria, A. V., Maraschin, M., Horta, P. A., Yokoya, N. S., 2011.
1176 Growth and accumulation of carotenoids and nitrogen compounds in *Gracilaria*
1177 *domingensis* (Kütz.) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta) cultured under
1178 different irradiance and nutrient levels. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(2),
1179 255-261.
- 1180 Ramos, L. R. V, Romano, L. A., Monserrat, J. M., Abreu, P. C., e Verde, P. E., 2015a.
1181 Biological responses in mullet *Mugil liza* juveniles fed with guar gum
1182 supplemented diets. *Animal Feed Science and Technology*, 205, 98–106.
1183 <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.04.004>.
- 1184 Ranzani-Paiva, M. J. T., Pádua, S. B. De., Tavares-Dias, M., Egami, M., 2013. Métodos
1185 para análise hematológica em peixes. 1ª Ed., Maringá: Edum.

- 1186 Rivera, G., Yoong, F., Riofrío, G., Reinoso, B., Hurtado, F., Massuh, P., 2002.
1187 Inclusion de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos balanceados para
1188 camarón. CIVA. p. 244-252.
- 1189 Romano, L. A., Ferder, M. D., Stella, I. Y., Inserra, F., Ferder, L., 1996. High
1190 Correlation in Renal Tissue Between Computed Image Analysis and Clasical
1191 Morphometric Analysis. J. of Histotechnology, 19: 121- 123.
- 1192 Romano, L. A., 2010. El sistema Imune Inespecífico de los Peces. Em: Patologia 802
1193 Sanidade de organismos Aquáticos. ABRAPOA. Silva –Souza A.T., Perez 803
1194 Lizama M. A., Takemoto R. M., (Editores) pg.550.
- 1195 Rosenfeld, G.,1947. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova
1196 combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de
1197 emprego rápido. Mem. Inst. Butantan, 20, 329-334.
- 1198 Silva, D. J, Queiroz, A. C., 2009. Análise de Alimentos: Métodos Químicos e
1199 Biológicos, 3 ed., Viçosa, MG: UFV.
- 1200 Stadlander, T., Khalil, W. K. B., Focken, U., Becker, K., 2013. Effects of low and
1201 medium levels of red alga Nori (*Porphyra yezoensis* Ueda) in the diets on growth,
1202 feed utilization and metabolism in intensively fed Nile tilapia, *Oreochromis*
1203 *niloticus* (L.). Aquaculture Nutrition, 19(1), 64-73.
- 1204 Thanigaivel, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., Thomas, J., 2015. Investigation of
1205 seaweed extracts as a source of treatment against bacterial fish pathogen.
1206 Aquaculture, 448, 82-86.
- 1207 Tort, L., Balasch, J. C., Mackenzie, S., 2003. Fish immune system. A crossroads
1208 between innate and adaptive responses. Inmunología, 22(3), 277-286.
- 1209 Tsuyoshi, S., Takeshi, Y., Takao, Y., 2010. Utilization of waste Porphyra products as
1210 ecofriendly feed ingredients. Bulletin of Fisheries Research Agency 29, 19–27.
- 1211 Unesco., 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Manual
1212 and Guides 12. Intergovernmental Oceanographic Commissiony. Paris.
- 1213 Valente, L. M. P., Gouveia, A., Rema, P., Matos, J., Gomes, E. F., Pinto, I. S., 2006.
1214 Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and

- 1215 *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus*
1216 *labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 252(1), 85-91.
1217 <http://doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.052>.
- 1218 Valente, L. M., Rema, P., Ferraro, V., Pintado, M., Sousa-Pinto, I., Cunha, L. M.,
1219 Araújo, M., 2015. Iodine enrichment of *rainbow trout* flesh by dietary
1220 supplementation with the red seaweed *Gracilaria vermiculophylla*. *Aquaculture*,
1221 446, 132-139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.004>.
- 1222 Villanueva, R. D., Sousa, A. M. M., Gonçalves, M. P., Nilsson, M., Hilliou, L., 2010.
1223 Production and properties of agar from the invasive marine alga, *Gracilaria*
1224 *vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 22(2),
1225 211-220.
- 1226 Weibel, E. R. 1982. *Stereological Methods*, Vol 1. Academic Press, London.
- 1227 Wen, X., Peng, C., Zhou, H., Lin, Z., Lin, G., Chen, S., Li, P., 2006. Nutritional
1228 composition and assessment of *Gracilaria lemaneiformis* Bory. *Journal of*
1229 *Integrative Plant Biology*, 48(9), 1047-1053.
- 1230 Wen, B., Gao, Q. F., Dong, S. L., Hou, Y. R., Yu, H. B., Li, W. D., 2016. Effects of
1231 dietary inclusion of benthic matter on feed utilization, digestive and immune
1232 enzyme activities of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture*,
1233 458, 1-7.
- 1234 Xuan, X., Wen, X., Li, S., Zhu, D., Li, Y., 2013. Potential use of macro-algae
1235 *Gracilaria lemaneiformis* in diets for the black sea bream, *Acanthopagrus*
1236 *schlegelii*, juvenile. *Aquaculture*. 412-413, 167-172.
1237 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.07.022>.
- 1238 Yin, G., Li, W., Lin, Q., Lin, X., Lin, J., Zhu, Q., Huang, Z., 2014. Dietary
1239 administration of laminarin improves the growth performance and immune
1240 responses in *Epinephelus coioides*. *Fish & shellfish immunology*, 41(2), 402-406.
- 1241 Yoshizawa, Y., Ametani, A., Tsunehiro, J., Nomura, K., Itoh, M., Fukui, F.,
1242 Kaminogawa, S., 1995. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide
1243 fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structure-function relationships
1244 and improved solubility. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(10),
1245 1933-1937.

1246 Yoshizawa, Y., Tsunehiro, J., Nomura, K., Itoh, M., Fukui, F., Ametani, A., &
1247 Kaminogawa, S. (1996). In vivo macrophage-stimulation activity of the enzyme-
1248 degraded water-soluble polysaccharide fraction from a marine alga (*Gracilaria*
1249 *verrucosa*). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 60(10), 1667-1671.
1250

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL

Universidade Federal do Rio Grande
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP
 ceua@furg.br http://www.propesp.furg.br

CE



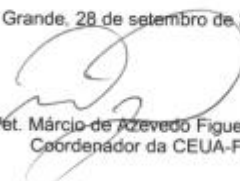
CERTIFICADO Nº P074/2016

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da suplementação da dieta de juvenis da tainha *Mugil liza* com a macroalga *Gracilaria domingensis*", protocolo nº 23116.005921/2016-32, sob a responsabilidade de Marcelo Borges Tesser - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 27 de setembro de 2016 (Ata 010/2016).

A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

| | |
|--------------------------|--|
| CEUA Nº | Pq022/2016 |
| COLABORADORES | Andreline Jordana Coelho de Mendonça; Luis Alberto Romano |
| VIGÊNCIA DO PROJETO | 30/11/2017 |
| ESPÉCIE/ LINHAGEM / RAÇA | <i>Mugil liza</i> (Tainha) |
| NÚMERO DE ANIMAIS | 300 |
| PESO/ IDADE | 2 g / Juvenis |
| SEXO | Indiferente |
| ORIGEM | Laboratório de Piscicultura Marinha da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC |
| ENVIO DO RELATÓRIO FINAL | Dezembro/2017 |

Rio Grande, 28 de setembro de 2016.


 Med. Vet. Márcio de Azevedo Figueiredo
 Coordenador da CEUA-FURG