



WILLIAM FRANCO CARNEIRO

**THE USE OF MICROALGAE AS A SUPPLEMENT ON
GROWTH, REPRODUCTIVE PERFORMANCE,
ANTIOXIDANT DEFENSES AND NUTRIGENOMICS
PROFILING IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*) AND PACU
(*Piaractus mesopotamicus*)**

**LAVRAS-MG
2020**

WILLIAM FRANCO CARNEIRO

**THE USE OF MICROALGAE AS A SUPPLEMENT ON GROWTH,
REPRODUCTIVE PERFORMANCE, ANTIOXIDANT DEFENSES AND
NUTRIGENOMICS PROFILING IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*) AND PACU
(*Piaractus mesopotamicus*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Monogástricos, para a obtenção do título de Doutor.

Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas
Coorientador

**LAVRAS-MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Carneiro, William Franco.

The use of microalgae as a supplement on growth, reproductive performance, antioxidant defenses and nutrigenomics profiling in zebrafish (*Danio rerio*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) / William Franco Carneiro. - 2020.

109 p.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Coorientador(a): Rilke Tadeu Fonseca de Freitas.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. *Danio rerio*. 2. *Piaractus mesopotamicus*. 3. Microalgas. I. Murgas, Luis David Solis. II. Freitas, Rilke Tadeu Fonseca de. III. Título.

WILLIAM FRANCO CARNEIRO

**THE USE OF MICROALGAE AS A SUPPLEMENT ON GROWTH,
REPRODUCTIVE PERFORMANCE, ANTIOXIDANT DEFENSES AND
NUTRIGENOMICS PROFILING IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*) AND PACU (*Piaractus
mesopotamicus*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Monogástricos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 23 de outubro de 2020

Dra. Luciana de Paula Naves, UFLA

Dr. Marcos Ferrante, UFLA

Dr. Carlos Antônio Martinez-Palacios, UMSNH

Dr. André Rodrigues Da Cunha Barreto Vianna, UFPR

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Orientador

**LAVRAS-MG
2020**

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

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

À Universidade Federal de Lavras, Departamento de Zootecnia e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de aperfeiçoamento.

Ao meu orientador Luis David Solis Murgas, agradeço pelas oportunidades, incentivo e confiança no meu trabalho.

Aos colegas do Núcleo de Estudos em Fisiologia de Água Doce pela convivência e troca de ideias no Biotério Central da UFLA.

Aos pesquisadores e colegas do Laboratório Nacional de Nutrigenômica e Microbiômica Digestiva Animal da Universidade Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México pela oportunidade de aprendizado e pelo auxílio nas análises de RNA-Seq.

À minha família, pelo constante apoio e paciência, conselhos e amizade.

Agradeço muito à Tharyn pelo apoio em todas minhas decisões e obrigado por me mostrar o quanto nós dois podemos ser mais fortes juntos.

À todas as outras pessoas que contribuíram indiretamente para a condução e desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A rápida expansão global da aquicultura e a produção restrita de farinha de peixe (FP) aumentaram consideravelmente a demanda por fontes alternativas de proteína em dietas para peixes. As proteínas de origem vegetal têm sido favorecidas como substitutas da FP. No entanto, a presença de fatores antinutricionais pode limitar a sua utilização. Por outro lado, as microalgas têm sido cada vez mais incorporadas como suplemento na alimentação de peixes. As microalgas, especialmente a chlorella (*Chlorella* sp) e a spirulina (*Arthrospira platensis*), têm despertado atenção devido ao alto teor de proteína, bom perfil de aminoácidos, ácidos graxos, compostos antioxidantes e imunoestimulantes. Este trabalho fornece resultados em três diferentes abordagens. No primeiro estudo, o zebrafish (*Danio rerio*) foi submetido a um teste de alimentação, no qual até 100% da FP foi substituída por *Chlorella* sp (CM) em 0, 10, 20, 30, 40 e 50 g/kg de dieta. Após 60 dias de alimentação, os animais alimentados com 40 g/kg de CM apresentaram crescimento significativamente maior em comparação com o grupo que recebeu a dieta sem CM. Os menores níveis de colesterol total, LDL e triglicérides foram observados nos peixes alimentados com 50 g/kg de CM. Os níveis de CM aumentaram significativamente a atividade fosfatase alcalina nos peixes. As dietas com 40 e 50 g/kg de CM proporcionaram a maior produção de ovos, taxa de eclosão e sobrevivência das larvas aos 6 dias após a fertilização. O segundo estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da substituição da FP por spirulina (*A. platensis*) em dietas para o zebrafish sobre o crescimento, desempenho reprodutivo e na expressão de genes por meio do sequenciamento de RNA (RNA-Seq). O teste de alimentação consistiu em substituir a FP em até 100% por spirulina em 0, 10, 20, 30, 40 e 50 g/kg de dieta. Os animais alimentados com 50 g/kg de SM apresentaram crescimento e desempenho reprodutivo significativamente maior do que os animais alimentados com a dieta sem spirulina. O RNA-Seq revelou que os peixes alimentados com 50 g/kg de spirulina regularam positivamente a expressão de genes relacionados ao crescimento e imunidade. O terceiro estudo avaliou os efeitos da substituição da FP por spirulina em dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) sobre o crescimento e parâmetros bioquímicos plasmáticos. Também foram avaliadas as respostas antioxidantes antes e após o teste de desafio com amônia ionizada. Os peixes foram alimentados com seis dietas experimentais formuladas para conter diferentes níveis de spirulina 0, 20, 40 e 60 g/kg em substituição a farinha de peixe. Os peixes alimentados com as dietas 40 e 60 g/kg de spirulina apresentaram melhor crescimento e menores níveis de colesterol total, triglicérides, LDL e alanina amino transferase. As dietas com 40 e 60 g/kg de spirulina aumentaram a atividade da catalase, superóxido dismutase e a capacidade total antioxidante. As concentrações hepáticas de malondialdeído apresentaram diferenças somente após a exposição a amônia. Os resultados demonstraram que tanto a *Chlorella* sp quanto a spirulina podem ser utilizadas na dieta do zebrafish e pacu.

Palavras-chave: Microalgas. Nutrição. *Chlorella*. Spirulina. RNA-Seq.

ABSTRACT

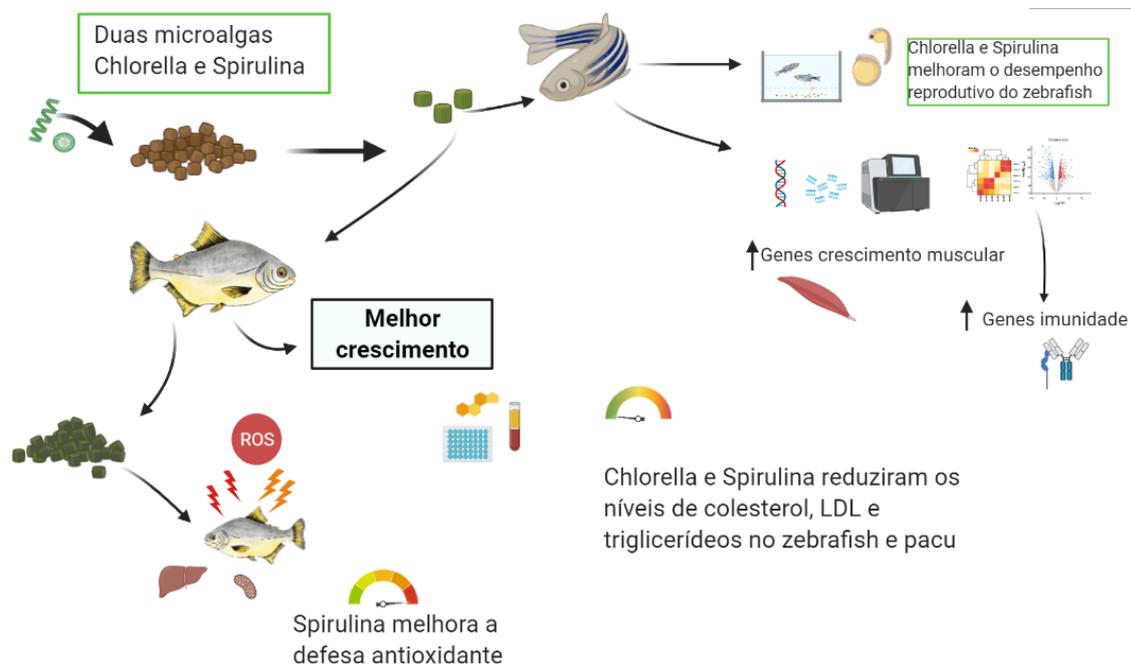
The rapid global expansion of the aquaculture and the restricted production of fish meal (FM) has considerably increased the demand for alternative sources of protein in fish diets. Plant-based proteins have been favored as substitutes for FM. However, the presence of antinutritional factors may limit their use. On the other hand, microalgae have been increasingly incorporated as a supplement in fish feed. Microalgae, especially chlorella (*Chlorella* sp) and spirulina (*Arthrospira platensis*), have attracted attention due to their high protein content, adequate amino acid profile, fatty acids, antioxidant and immunostimulating compounds. This study provides results in three different approaches. In the first one: zebrafish (*Danio rerio*) was subjected to a feeding test, in which up to 100% of the FM was replaced by *Chlorella* sp (CM) in 0, 10, 20, 30, 40, and 50 g/kg diet. After 60 days of feeding, the animals fed 40 g/kg CM showed significantly greater growth compared to the group that received a diet without CM. The lowest levels of total cholesterol, LDL and triglycerides were observed in fish fed 50 g/kg CM. The CM levels significantly increased alkaline phosphatase activity in fish. Diets containing 40 and 50 g/kg CM provided the highest egg production, hatching rate, and larvae survival at 6 days after fertilization. The second study aimed to evaluate the effects of replacing FM by spirulina (SM - *A. platensis*) in zebrafish diets on growth, reproductive performance, and gene expression through RNA sequencing (RNA-Seq). The feeding test consisted of replacing FM is up to 100% with spirulina in 0, 10, 20, 30, 40 and 50 g/kg diet. Animals fed 50 g/kg SM showed significantly higher growth and reproductive performance than animals fed a diet without spirulina. RNA-Seq revealed that fish fed 50 g/kg spirulina positively regulated the expression of genes related to growth and immunity. The third study evaluated the dietary substitution effect of FM with spirulina in pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*) on growth and serum biochemical parameters. Antioxidant responses were also evaluated before and after the ionized ammonia challenge. The fish were fed six experimental diets formulated to contain different spirulina levels (0, 20, 40 and 60 g/kg) to replace FM. Fish fed diets 40 and 60 g/kg spirulina showed better growth and lower levels of total cholesterol, triglycerides, LDL, and alanine aminotransferase. Diets containing 40 and 60 g/kg spirulina increased activities of catalase, superoxide dismutase and total antioxidant capacity. Liver concentrations of malondialdehyde differed only after exposure to ammonia. The results suggest that both chlorella and spirulina can be used in zebrafish and pacu diets.

Keywords: Microalgae. Nutrition. Chlorella. Spirulina. RNA-Seq.

The use of microalgae as a supplement on growth, reproductive performance, antioxidant defenses and nutrigenomics profiling in zebrafish (*Danio rerio*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

Elaborado por **William Franco Carneiro** e orientado por **Luis David Solis Murgas**

A aquicultura é o setor de alimentos que mais cresce no mundo e é cada vez mais importante para alcançar a segurança alimentar. Um dos principais ingredientes utilizados na alimentação de peixes é a farinha de peixe (FP). No entanto, com o crescimento da aquicultura, a produção de pescado destinadas à alimentação dos peixes levou a sobrepesca. Isso reduziu a oferta da FP e consequentemente, aumentou o seu custo. Para contornar essa situação, as microalgas, como a *Chlorella* sp. e spirulina, podem ser utilizadas como um complemento ou alternativa à FP nas rações para aquicultura. As microalgas são ricas em proteínas e compostos bioativos que podem melhorar a saúde e a resistência dos peixes em ambientes de cultivo. Nesta pesquisa, foram avaliadas a substituição da FP por *Chlorella* sp e spirulina em dietas para o zebrafish e seus efeitos no crescimento e desempenho reprodutivo. Também foram avaliados os efeitos da spirulina para o pacu no crescimento e resistência à amônia. Os resultados da substituição da FP por *Chlorella* sp. e spirulina promoveram um aumento no crescimento do zebrafish. Os reprodutores de zebrafish alimentados com as microalgas produziram mais embriões e a prole apresentou maior sobrevivência. Da mesma forma, a substituição de FP por spirulina aumentou o crescimento dos pacus. Além disso, os pacus alimentados com spirulina na dieta apresentaram efeitos positivos na atividade de enzimas antioxidantes, após serem expostos a amônia. Estes resultados demonstram que as microalgas podem ser utilizadas como um suplemento em dietas para os peixes.



SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	REFERENCIAL TEÓRICO	7
2.1	Microalgas	7
2.2	Principais nutrientes das microalgas	8
2.2.1	Proteínas e aminoácidos	8
2.2.2	Lipídios e ácidos graxos	10
2.2.3	Pigmentos e vitaminas	11
2.3	Potencial das microalgas na dieta de peixes	12
2.3.1	Efeitos das microalgas na alimentação de peixes	13
2.3.2	Microalgas como imunostimulantes para peixes	18
2.4	Caracterização das principais microalgas, <i>Chlorella</i> e <i>Spirulina</i>	19
2.4.1	<i>Chlorella</i>	19
2.4.2	<i>Spirulina</i> (<i>Arthrospira platensis</i>)	21
2.5	Espécies de estudo	21
2.6	RNA-Seq	23
	REFERÊNCIAS.....	25
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	37
	ARTIGO 1 - Replacing fish meal by <i>Chlorella</i> sp. meal: Effects on zebrafish growth, reproductive performance, biochemical parameters, and digestive enzymes	37
	ARTIGO 2 - Transcriptoma de zebrafish (<i>Danio rerio</i>) alimentados com spirulina (<i>Arthrospira platensis</i>).....	65
	ARTIGO 3 - Dietas contendo <i>Arthrospira platensis</i> aumentam o crescimento, modulam o metabolismo lipídico e reduzem o estresse oxidativo de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) expostos à amônia	84

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura desempenha um papel importante no programa de segurança alimentar global. A produção mundial de peixes provenientes da aquicultura atingiu 82,1 milhões de toneladas em 2018, o que representa 46% da produção global de pescado (FAO, 2020). A aquicultura é um dos setores de produção animal que apresenta desenvolvimento mais acelerado, com previsão de dobrar a sua produção nos próximos 10 ou 15 anos (FAO, 2016, 2016; TACON; METIAN, 2015). Dessa forma, para garantir a produção constante de peixes se faz necessário o uso de ingredientes de qualidade nas dietas, permitindo assim um crescimento adequado dos animais (CAIMI et al., 2020).

A farinha de peixe (FP) tem sido a principal fonte de proteína na alimentação de peixes nos últimos anos, graças ao seu alto nível de proteína, perfil de aminoácidos adequado, alta palatabilidade e digestibilidade (GLENCROSS et al., 2020; OLSEN; HASAN, 2012). A produção da FP é dependente da captura de peixes pelágicos selvagens, os quais são processados para a obtenção de diferentes produtos (BOYD, 2015). No entanto, o uso desenfreado da FP nas últimas décadas tem pressionado os estoques pesqueiros, os quais não apresentam perspectiva de rápida recuperação (PAULY; ZELLER, 2016). Conseqüentemente, os fabricantes de rações enfrentam o problema da oferta limitada de FP e aumento nos seus custos (CHEMELLO et al., 2020).

Nos últimos anos, estudos têm sido realizados para avaliar o potencial de fontes alternativas à FP. Como resultado, foi possível reduzir a quantidade de FP usada em dietas para espécies carnívoras, sendo o seu uso mais seletivo e dependendo do estágio de vida dos peixes, muito utilizado como um ingrediente estratégico (OLIVA-TELES; ENES; PERES, 2015). De acordo com estes mesmos autores, a FP também foi reduzida em dietas para peixes onívoros, principalmente nas fases de crescimento.

As alternativas mais comumente utilizadas para substituir o FP são as proteínas de origem vegetal (GLENCROSS et al., 2020). O uso dessas proteínas é vantajoso devido ao seu menor custo e alta disponibilidade. No entanto, o perfil de aminoácidos desequilibrado, o alto teor de carboidratos e a presença de fatores antinutricionais levam a uma menor eficiência na utilização dos alimentos de origem vegetal, o que torna esses ingredientes inadequados para muitas espécies (CAIMI et al., 2020; GLENCROSS et al., 2020). Como resultado, as fontes de proteína de origem vegetal não representam uma alternativa final ao uso da FP na aquicultura, embora sua fermentação em condições controladas possa melhorar a sua qualidade nutricional

(DAWOOD; KOSHIO, 2020). Dessa forma, a busca por novos ingredientes para substituir a FP ainda é um desafio para os pesquisadores e fabricantes de ração para aquicultura (SKALLI et al., 2020).

Uma fonte alternativa de proteína deve apresentar alguns requisitos, como: fácil digestão, proteínas de alta qualidade, produção sustentável e segura e custos relativamente baixos. Nesse sentido, as microalgas, devido à sua composição química, surgem como alternativas promissoras a FP, uma vez que podem aumentar o valor nutricional dos alimentos convencionais por meio da sua incorporação na dieta dos peixes.

As microalgas são ricas em pigmentos fotossintetizantes, como clorofilas e carotenoides, compostos imunoestimulantes e antioxidantes e são moduladoras do metabolismo, o que lhes conferem propriedades funcionais (PLAZA et al., 2009). Além disso, as microalgas podem ser ingredientes promissores na alimentação de peixes (Meena et al. 2013; Becker 2007). Entre as diversas espécies de microalgas, a *Arthrospira platensis - spirulina* (SP) e a *Chlorella* spp (CM) têm se destacado como suplemento em dietas para animais e até mesmo como substituto da FP em dietas para aquicultura. A SP tem em sua composição ficocianinas e ficoeritrinas e juntamente com a CM, possuem substâncias que atuam no sistema imune e atividade antioxidante. Em diferentes espécies de peixes foram demonstradas amplas funções biológicas da SP e da CM no crescimento, modulação da microbiota intestinal, parâmetros imunológicos e bioquímicos (ABDEL-TAWWAB; AHMAD, 2009; ABDELKHALEK; GHAZY; ABDEL-DAIM, 2015; ELSHOUNY et al., 2017; LUO et al., 2018; SHI et al., 2017; XU et al., 2014). Todavia, os efeitos das microalgas no desempenho reprodutivo e na proteção contra eventos estressantes para os peixes ainda são pouco compreendidos. Além disso, os mecanismos de regulação das vias metabólicas não foram completamente desvendados.

A técnica de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) permite aumentar a compreensão dos mecanismos moleculares básicos pelos quais os nutrientes da dieta regulam a expressão gênica do animal, as respostas bioquímicas celulares, os processos fisiológicos e a expressão fenotípica (HASAN; FEUGANG; LIAO, 2019; NORHEIM et al., 2012). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da substituição da FP por *Chlorella* sp e *Spirulina* nas dietas de zebrafish (*Danio rerio*), modelo de experimentação animal, e de *spirulina* nas dietas de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) no crescimento, desempenho reprodutivo, nutrigenômica, respostas bioquímicas e capacidade antioxidante.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Microalgas

As microalgas são microrganismos fotossintéticos que incluem uma enorme biodiversidade, entre elas as cianobactérias, microalgas verdes, diatomáceas, dinoflagelados entre outros (HEIMANN; HUERLIMANN, 2015). Recentemente o cultivo de microalgas tem despertado interesse, principalmente devido à sua capacidade de sintetizar vários compostos bioativos, capacidade de alterar sua composição bioquímica conforme as condições de cultivo e ao rápido crescimento da biomassa (DOLGANYUK et al., 2020). As microalgas produzem biomassa a partir de substâncias inorgânicas oxidadas e de elementos minerais devido a energia luminosa que é convertida durante a fotossíntese (DEMIREL et al., 2018). A tecnologia de produção de biomassa de microalgas não polui o meio ambiente, produz oxigênio e é capaz de captar o dióxido de carbono (CO₂) do ambiente. Além disso, consomem uma quantidade relativamente pequena de água e podem ser produzidas em terras improdutivas para outras culturas agrícolas (DEMIREL et al., 2018; SITEPU et al., 2020).

As microalgas são ricas em diversos nutrientes e compostos bioativos, como proteínas, polissacarídeos, lipídios, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, pigmentos, ficobiliproteínas, enzimas, etc. (DOLGANYUK et al., 2020). Devido a essa variedade de compostos produzidos, as microalgas possuem diversas aplicações biotecnológicas, como por exemplo, na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, no tratamento de águas residuais, fixação de CO₂, produção de biocombustíveis e na nutrição animal (NGUYEN; HEIMANN; ZHANG, 2020; NOVOVESKÁ et al., 2019).

Até o presente momento, estudos sobre o uso de microalgas como possível ingrediente para formulação de dietas para diferentes espécies de peixes têm aumentado exponencialmente (SHAH et al., 2018). As principais utilizações das microalgas na aquicultura são em sistemas de produção de larvas de peixes, moluscos e como alimento para zooplâncton (ROY; PAL, 2015). Além disso, as microalgas têm o potencial de reduzir a dependência de matérias primas convencionais, como a farinha de peixe, na fabricação de dietas para aquicultura. Devido a sua composição nutricional e presença de compostos antioxidantes, as microalgas podem ter efeitos benéficos significativos na taxa de crescimento dos peixes, além de melhorar a resistência a doenças e diminuir a excreção de nitrogênio no meio ambiente (BECKER, W., 2007).

2.2 Principais nutrientes das microalgas

As microalgas têm grande potencial para fornecer proteínas, lipídios, vitaminas, e carotenoides na alimentação dos animais. Embora as microalgas sejam consumidas desde a antiguidade, a maioria delas é considerada um alimento não convencional e deve passar por uma série de testes toxicológicos para comprovar sua inocuidade. Portanto, é importante usar microalgas que já superaram esses testes para aplicações na indústria de alimentos, como é o caso da *Spirulina* e da *Chlorella* (BATISTA et al., 2013). A *Arthrospira* spp. (*Spirulina*) e a *Chlorella* spp. estão disponíveis comercialmente e tem sido utilizada como fonte de nutrientes em dietas para animais de produção nos últimos anos (SHAH et al., 2018). Além de possuírem uma composição nutricional semelhante, estas microalgas são comparáveis a ingredientes convencionais utilizados em dietas para peixes (Tabela 1).

Tabela 1 — Composição geral de *Chlorella* sp e *Spirulina* sp

Espécies	Nutrientes (% da matéria seca)					
	Proteína	Gordura	Carboidratos	Fibra	Cinzas	Umidade
<i>Chlorella</i> sp ¹	55-67	8-13	10-20	18-23	5-8	3-5
<i>Spirulina</i> sp ¹	55-70	6-9	10-20	2-4	6-8	2-5
Farinha de peixe ²	65-70	8-12	2-6	0.1-1	9-17	90-94

Fonte: ¹Adaptado de Becker (2013). ²NRC (2011)

2.2.1 Proteínas e aminoácidos

As microalgas geralmente contêm de 30-40% de proteína, uma das principais razões para considerar esses organismos como uma fonte alimentar (BROWN et al., 1997). No entanto, devemos nos atentar que a metodologia de Kjeldahl é comumente utilizada para a determinação de proteína em microalgas. Esse método consiste basicamente na digestão da amostra, conversão do nitrogênio (N) constituinte da amostra em amônio para posterior quantificação por titulação em solução de ácido clorídrico. A concentração de N total é então convertida à proteína por um fator de conversão de 6,25, esse fator considera que o N representa 16% do peso da proteína, portanto $100g \div 16g = 6,25$ (BENEDICT, 1987; MARIOTTI; TOMÉ; MIRAND, 2008). Todavia, a proteína bruta pode ser superestimada ao transformar o N total em proteína. Uma vez que, todo material vegetal, incluindo as algas, tem fontes significativas de material nitrogenado não proteico, como clorofila, ácidos nucléicos, aminoácidos livres e

nitrogênio inorgânico (por exemplo, nitrato, nitrito e amônia) que também é contabilizado como proteína (LOURENÇO et al., 2004). Diante disso, com a ascensão do uso de microalgas na alimentação animal, a determinação da proteína na biomassa de algas deve passar por uma padronização dos processos de qualidade (ANGELL et al., 2016).

A qualidade das proteínas das microalgas deve ser determinada pela composição dos aminoácidos essenciais, e não somente pelo teor de proteína bruta (REITAN et al., 1997). Visto que, os animais são limitados à biossíntese de alguns aminoácidos (não essenciais), enquanto os demais (essenciais), devem ser fornecidos através da alimentação (BECKER, 2013). Nesse sentido, algumas espécies de microalgas também apresentam um perfil de aminoácidos essenciais compatíveis com a farinha de peixe e outros ingredientes com alto valor biológico (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação entre a composição de aminoácidos de duas espécies de microalgas com farinha de peixe.

Aminoácidos essenciais	g por 100g ⁻¹ de proteína		
	<i>Chlorella vulgaris</i> ¹	<i>Spirulina</i> sp ¹	Farinha de peixe ²
Arginina	6,9	8,2	3,43-4,02
Cistina	-	1,0	3,43-4,02
Histidina	2,0	4,7	1,34-1,78
Isoleucina	3,2	6,4	2,45-3,64
leucina	9,5	13,9	3,79-5,0
Lisina	6,4	7,7	4,22-7,3
Metionina	1,3	4,6	1,47-2,2
Treonina	5,3	4,7	2,31-2,82
Triptofano	-	3,3	0,57-0,76
Valina	7,0	6,6	2,77-3,51

Fonte: ¹Adaptado de Becker (2013); ²Adaptado de NRC (2011)

O padrão aminoácido de quase todas as algas, é semelhante ao de outras proteínas alimentares e com o da referência proposta pela FAO (2013), o que faz delas potenciais substitutos da farinha de peixe. Alguns estudos avaliaram a utilização da biomassa de *Arthrospira* sp e *Chlorella* sp como fontes de proteína ou até mesmo como substituto da farinha de peixe na dieta de espécies de peixe onívoras e carnívoras (CAO et al., 2018; CARNEIRO et al., 2020b; HUSSEIN et al., 2013; TEIMOURI; AMIRKOLAIE; YEGANEH, 2013). A

inclusão de níveis entre 0,5 e 10% de spirulina na dieta tem demonstrado bons resultados no crescimento dos peixes. A inclusão de 5% de *Arthrospira* sp na dieta de parrot (*Oplegnathus fasciatus*) aumentou de forma significativa o ganho de peso, taxa de eficiência proteica e o consumo de ração, quando comparado com a dieta controle que possuía farinha de peixe na sua composição (KIM, S. S. et al., 2013). Da mesma forma, um maior crescimento foi observado em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) quando a farinha de peixe foi substituída por 7,5% de spirulina (TEIMOURI; AMIRKOLAIE; YEGANEH, 2013).

As microalgas podem ser consideradas uma fonte alternativa de proteína viável para uso em dietas para peixes. Os resultados descritos anteriormente demonstram que a inclusão de microalgas pode melhorar o desempenho dos peixes. No entanto, mais pesquisas para avaliar o potencial de crescimento de microalgas e identificar os fatores que afetam sua eficácia devem ser realizadas.

2.2.2 Lipídios e ácidos graxos

A oxidação de lipídeos gera energia para as células. Porém, dependendo da classe de lipídeos, outras funções também se destacam como a função estrutural em membranas biológicas, por exemplo. O conteúdo lipídico das microalgas pode variar 20 a 50%, e em alguns casos pode exceder 60% da biomassa (GUSCHINA; HARWOOD, 2013). Os lipídeos das microalgas geralmente são divididos em lipídeos neutros (triacilglicerol, diacilgliceróis e ésteres de estero), localizados principalmente em gotículas lipídicas no citoplasma ou plastídios, e lipídios polares (fosfo e glicolipídios), que constroem as membranas celulares (CANELLI et al., 2020).

Algumas espécies de microalgas contêm naturalmente ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) da série n-3, em especial EPA e DHA (HARUN et al., 2010). Visto que, as microalgas contêm as enzimas de dessaturação (dessaturases acil-CoA, dessaturases acil-ACP e dessaturases acil-lipídicas) para produzir esses compostos (MORALES-SÁNCHEZ; MARTINEZ-RODRIGUEZ; MARTINEZ, 2017). Algumas microalgas contêm quantidade significativas de PUFA, por exemplo, a *Chlorella vulgaris* apresenta na sua biomassa seca 1,5% e 3,7% de ácido linoleico (LA, C18: 2n6) e ácido α -linolênico (ALA, C18: 3n3) respectivamente (BATISTA et al., 2013). O consumo de ácidos graxos ômega 3 são agentes terapêuticos contra doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (WYSOCZÁŃSKI et al., 2016). Os PUFAs geralmente são obtidos de peixes ou extraídos do óleo de peixe. No entanto,

os PUFAs derivados de peixes podem acumular toxinas, além do sabor desagradável e fraca estabilidade oxidativa, o que tem limitado sua aplicação como aditivo alimentar (SPOLAORE et al., 2006; YAAKOB et al., 2014). Dessa forma, as microalgas surgem como alternativa a produção de PUFAs dos peixes, pois quando comparadas o processo de produção das microalgas é simples e econômico (XIA et al., 2020).

Os PUFAs são essenciais para garantir o crescimento e a sobrevivência das larvas de peixes (FERNÁNDEZ-PALACIOS et al., 2011). A suplementação alimentar com *Parietochloris incisa*, uma microalga rica em ARA, aumentou a sobrevivência de alevinos de guppy (*Poecilia reticulata*) (NATH et al., 2012). Além disso, as microalgas também são utilizadas como fonte de PUFAs em criações comerciais de peixes. Uma das principais fontes de PUFAs na criação de salmão (*Salmo salar*) é obtida de *Schizochytrium* sp, uma microalga caracterizada pelo teor de lipídios (55-75% na matéria seca) e até 49% de DHA dos lipídios totais (REN et al., 2010; SHAH et al., 2018). A substituição total do óleo de peixe por *Schizochytrium* sp na dieta de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), melhorou significativamente o ganho de peso, a taxa de conversão alimentar e a taxa de eficiência proteica, além de aumentar os níveis de DHA no filé (SARKER et al., 2016b). Estes resultados indicam claramente que as microalgas podem ser um potencial candidato para substituir de forma parcial ou completa do óleo de peixe, na formulação de dietas para aquicultura.

2.2.3 Pigmentos e vitaminas

As microalgas contêm vários tipos de pigmentos, como os carotenoides, xantofilas, ficobilinas e clorofilas. O conteúdo de carotenoides e de clorofila geralmente é maior do que o encontrado em algumas plantas (KOLLER; MUHR; BRAUNEGG, 2014). Entre as microalgas, *C. vulgaris* contêm fucoxantina, zeaxantina e luteína (TIBBETTS; MILLEY; LALL, 2015), enquanto a *Arthrospira* sp contêm ficobiliproteínas, zeaxantina e β -caroteno (RAGAZA et al., 2020).

Os carotenoides podem ser armazenados no estroma do cloroplasto ou no citosol, dependendo do tipo de microalga. Os carotenoides nas microalgas estão geralmente presentes em baixas concentrações (0,5% μg^{-1} do peso seco), embora em algumas clorófitas possam atingir até 10% μg^{-1} do peso seco quando cultivados em condições adversas, como é o caso da *Dunaliella salina* (MULDERS et al., 2013). Os carotenoides têm grande valor nutricional e terapêutico, devido a capacidade de atuar como provitamina A (GOUVEIA; EMPIS, 2003).

Além disso, os carotenoides têm propriedades anti-inflamatórias devido à sua ação de extinção nas espécies reativas de oxigênio (ROY; PAL, 2015).

As microalgas também são uma fonte valiosa de vitaminas, como: A, B1, B2, B6, B12, C, E, biotina, ácido fólico e ácido pantotênico (DOLGANYUK et al., 2020). Várias vitaminas estão presentes em concentrações mais altas nas microalgas do que em fontes convencionais de ingredientes para aquicultura (VENKATARAMAN; SOMASEKARAN; BECKER, 1994). Por exemplo, a spirulina tem quatro vezes mais vitamina B12 do que o fígado cru, que antes era considerado a melhor fonte desse nutriente (RAGAZA et al., 2020). Outra vantagem da spirulina é a sua utilização em dietas “*fishmeal - free*” como fonte de vitamina B12, visto que essas dietas são deficientes nestas vitaminas. A vitamina B12 também pode ser encontrada em outras microalgas, como a *Chlorella* sp e a *Pleurochrysis carterae*. No entanto, nem sempre está na forma biodisponível e mais estudos são necessários para identificar fontes potenciais de vitamina B12 entre as microalgas (KUMUDHA et al., 2015).

2.3 Potencial das microalgas na dieta de peixes

As dietas comerciais utilizadas na aquicultura representam a maior contribuição para o custo de produção em um empreendimento aquícola (NAYLOR et al., 2009). A farinha de peixe é usada há muito tempo como fonte de proteína na dieta de peixes (GATLIN et al., 2007; NAYLOR et al., 2009; TACON; METIAN, 2015). Porém, devido à indisponibilidade e ao aumento do custo da farinha de peixe, tornou-se essencial a busca por uma fonte alternativa de proteína para preparar uma ração balanceada para os peixes (ROY; PAL, 2015). Dessa forma, muitas pesquisas foram realizadas para buscar novas alternativas para substituir farinha de peixe por novas fontes, tanto econômica quanto ambientalmente sustentáveis.

Entre as matérias-primas, tem havido um número considerável de pesquisas sobre o uso de fontes proteicas de origem vegetal na dieta de espécies de aquicultura (GATLIN et al. 2007). Sendo que, produtos à base de soja são a fonte de proteína vegetal mais amplamente produzida e utilizada em formulações de dietas para a aquicultura (GLENCROSS et al., 2020). As proteínas à base de soja têm sido aplicadas com considerável sucesso em dietas para diferentes espécies (CARNEIRO et al., 2020a; GLENCROSS et al., 2004; LIN; LUO, 2011; RAMENA et al., 2020; REFSTIE; STOREBAKKEN; ROEM, 1998). Por outro lado, outros concentrados proteicos de origem vegetal produzidos a partir do milho, feijão e ervilha também tem potencial como fonte de proteína para aquicultura (GATLIN et al., 2007). Apesar dos substitutos à base

de proteína vegetal proporcionam um bom crescimento em peixes, alguns podem apresentar certas desvantagens. Entre as desvantagens de fontes proteicas vegetais, podemos destacar a baixa digestibilidade de alguns nutrientes, deficiência em certos aminoácidos essenciais, como lisina, metionina, treonina e triptofano, e podem resultar em mudanças significativas na qualidade nutricional dos peixes (LI et al., 2009).

Uma alternativa sustentável para substituição a farinha de peixe, tem sido a incorporação de microalgas nas rações para aquicultura, além de apresentarem uma boa composição nutricional, as microalgas podem melhorar a resposta imune dos animais (REYES-BECERRIL et al., 2013; SARKER et al., 2016a). As microalgas são ingredientes promissores para alimentação dos peixes, geralmente contém todos os aminoácidos essenciais (DAWCZYNSKI; SCHUBERT; JAHREIS, 2007) e são ricas em EPA e DHA, ácidos graxos ômega-3 (CAMACHO-RODRÍGUEZ et al., 2020; CHAUTON et al., 2015)

Inúmeras espécies de microalgas apresentam na sua composição, moléculas e substâncias com ações antioxidantes, imunoestimulantes e moduladoras do metabolismo. Em algumas cepas de *Chlorella* sp podemos encontrar o β -1,3- glucano, que possui ação imunoestimulante em peixes (MEENA et al., 2013; RICHMOND; HU, 2013). Entre os antioxidantes, a *Spirulina* sp é rica em ficocininas e ficoeritrinas (BOROWITZKA, 2013; E et al., 2017). As microalgas também produzem ácidos graxos poli-insaturados, reconhecidos por terem importante papel na prevenção e tratamento de doenças cardíacas, hipertensão, diabete, artrite e outras doenças inflamatórias e autoimunes (GUEDES; SOUSA-PINTO; MALCATA, 2015; SIMOPOULOS, 2008).

2.3.1 Efeitos das microalgas na alimentação de peixes

O uso de microalgas tem sido bem-sucedidas como fonte de alimento e aditivo alimentar na criação comercial de muitos animais aquáticos (larvas e juvenis de peixe, larvas de camarões, crustáceos e moluscos) tanto de água doce como marinha. As microalgas também podem ser usadas para cultivar vários tipos de zooplâncton (rotíferos, cladóceros, camarões ou copépodes) usados como alimento vivo na criação de peixes e crustáceos (BOROWITZKA, 2013; BROWN et al., 1997).

A utilização de microalgas na alimentação de peixes, aumentaram o crescimento, melhorou a qualidade da composição de carcaça (deposição proteica), além de aumentar a eficiência alimentar dos peixes (MUSTAFA; Ghulam et al., 1994). Peixes alimentados com

dietas contendo microalgas também tiveram uma redução na resposta ao estresse (OLVERA-NOVOA et al., 1998). A suplementação com microalgas também foi capaz de aumentar a tolerância a restrição alimentar a posteriori dos peixes (BELAY; KATO; OTA, 1996). Além do crescimento, a utilização de microalgas também tem impactos na reprodução dos peixes. Por exemplo, a produção de ovos foi significativamente maior no ciclídeo do rabo amarelo (*Pseudotropheus acei*) alimentado com spirulina, quando comparados aos peixes do grupo controle sem spirulina (GÜROY et al., 2012). Da mesma forma, a spirulina como aditivo na dieta de zebrafish (*Danio rerio*) aumentou a produção de ovos, induziu a maturação precoce e aumentou a expressão de vitelogenina no fígado (CALABRÒ et al., 2020).

É evidente que as microalgas possuem diversas propriedades e características desejáveis para a nutrição de organismos aquáticos e, apesar da escassez de relatos sobre os resultados da incorporação da biomassa de microalgas em rações, alguns autores têm conseguido bons resultados (Tabela 3).

Tabela 3. Estudos que utilizaram microalgas na nutrição de peixes.

Espécie de peixe	Microalga	Peso inicial/tempo	Experimento	Principais resultados	Referência
<i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	1,13g / 12 semanas	Inclusão, 1 -4%	2 e 4% > GP e TEP	KIM et al., 2002
<i>Carassius auratus</i>	<i>Chlorella</i> sp	29,9g/60 dias	Suplementação: 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2%	Níveis acima de 0,8% > GP, TCE, CA e TEP	XU et al., 2014
<i>Salmo salar</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	107g/4 semanas	Inclusão de 20%	Melhorou a saúde intestinal, evitando inflamação	GRAMMES et al., 2013
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	90g/21 dias	Suplementação 5 e 10%	10% > resposta ao estresse oxidativo e imunoestimulação do sistema inato.	ZAHNAN et al., 2014
<i>Sparus aurata</i>	<i>Scenedesmus almeriensis</i>	1,52g/84 dias	inclusão na dieta: 12, 20, 25 e 39%	20% > GP e TEP	VIZCAÍNO et al., 2014
<i>Oncorhynchus mikiss</i>	<i>Scenedesmus almeriensis</i>	75g/82dias	Substituição farinha de peixe/0, 5, 10, 20 e 40%	Crescimento < nos tratamentos com alga, mas dentro dos valores normais para truta no período de crescimento	TOMÁS-ALMENAR et al., 2018
<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Spirulina platensis</i>	100g/2 semanas	Administração oral de rês doses 1mg, 10mg e 25mg peixe ⁻¹	Melhoram a resposta ao stress oxidativo e > aumentaram a atividade fagocítica nas células do rim cefálico.	WATANUKI et al., 2006
<i>Oreochromis niloticus.</i>	<i>Spirulina</i> sp.	0,02g / 11 semanas	100% de substituição do glúten de milho	Spirulina aumentou o GP e TCE.	HUSSEIN et al., 2013

Nakagawa et al. (1985) relataram que houve mudanças significativas na composição do músculo e na natureza dos adipócitos em peixes alimentados com microalgas. Estes mesmos autores verificaram uma redução nos níveis de albumina e lipídio sérico, em peixes que receberam extrato de *Chlorella*. A albumina sérica em peixes, é uma lipoproteína e funciona como um transportador de lipídios. A redução do valor com o extrato dietético de *Chlorella* está provavelmente associada à melhora do metabolismo lipídico.

Os peixes podem resistir a períodos de restrição alimentar, tanto pelo inverno ou até mesmo pela escassez de alimentos. Dessa maneira os lipídeos de reserva são metabolizados antes do consumo de proteína muscular. No entanto, peixes que recebem uma dieta nutricionalmente desequilibrada, a proteína muscular é preferencialmente mobilizada antes do lipídio de reserva, para obtenção de energia necessária durante a falta de alimento (NAKAGAWA, HEISUKE; SATO; GATLIN, 2007). Como a tolerância à restrição alimentar, está relacionada ao funcionamento do metabolismo energético e é crítico para a sobrevivência, a mobilização de constituintes corporais foi comparada em peixes alimentados com dietas com ou sem suplementação de algas. O extrato de *Chlorella* suprimiu a perda de peso corporal durante a restrição alimentar em (*Plecoglossus altivelis*) (NAKAGAWA, et al., 1983). Além disso, estes mesmos autores relataram que o lipídeo muscular diminuiu consideravelmente o consumo de proteína muscular em animais que receberam o extrato de *Chlorella*. A mobilidade da energia armazenada, como lipídio muscular e a gordura intraperitoneal, pode contribuir substancialmente para o suprimento de energia. O extrato de *Chlorella* parece ativar a utilização de lipídios para energia antes do consumo de proteína muscular (NAKAGAWA, HEISUKE; SATO; GATLIN, 2007).

Os lipídios dietéticos, utilizados em dietas para peixes são uma importante fonte de energia e ácidos graxos essenciais (GORDON BELL et al., 2002). Níveis lipídicos ótimos resultam em maiores taxas de crescimento, diminuição nas taxas de conversão alimentar, melhor aproveitamento de nutrientes e uma redução da excreção de nitrogênio (MARTINS; VALENTE; LALL, 2007; YIGIT; YARDIM; KOSHIO, 2002). No entanto, o excesso de lipídios pode levar a uma diminuição no consumo de ração e pode reduzir a utilização de outros nutrientes, resultando em um baixo desempenho dos animais (HEMRE; SANDNES, 1999). Além disso, concentrações lipídicas elevadas podem aumentar os níveis de gordura no fígado, vísceras e no corpo dos peixes, essa gordura tem

um efeito prejudicial nos peixes, podendo afetar a textura, sabor e propriedades da carne desses animais (GRIGORAKIS, 2010). Uma forma de evitar estes problemas é a incorporação de microalgas, conforme o relatado por Ohya e Nakagawa (1990) a inclusão de microalgas na dieta pode reduzir a gordura corporal e visceral em peixes.

A influência da inclusão de farinha de *Ulva* sp (espécie de alga verde), em dietas com baixo (10%) e alto (20%) teor de lipídeos para juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi avaliada por Yildirim et al. (2009). Estes mesmos autores relataram um aumento no crescimento, eficiência alimentar e uma melhor utilização de nutrientes nas dietas com inclusão de 5% de farinha de ulva, independentemente do nível de lipídeo. Salienta-se ainda que, a inclusão de farinha de ulva reduziu aproximadamente 30% do teor de lipídeos corporal dos animais, quando comparados aos tratamentos sem farinha de ulva. Os benefícios observados pelos referidos autores podem ser explicados pelo alto teor de vitamina C, presente na farinha de ulva (GARCÍA-CASAL et al., 2007; ORTIZ et al., 2006), uma vez que a vitamina C afeta o metabolismo lipídico podendo causar alterações na composição corporal e deposição de nutrientes nos peixes (JI et al., 2003; NAKAGAWA, Heisuke et al., 2000).

Em um estudo utilizando até 2% de spirulina na ração, Mustafa et al., (1994), observaram uma diminuição de triglicérides no músculo e na gordura intraperitoneal em goraz (*Pagellus bogaraveo*), esses resultados se assemelham aos mesmo de animais selvagens. A redução dos níveis de gordura nesses animais pode ter ocorrido pela β -oxidação dos ácidos graxos. A entrada de ácidos graxos na mitocôndria é mediada pela carnitina, sua deficiência, por algum distúrbio metabólico ou doença, reduz a oxidação dos ácidos graxos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2006). A carnitina é sintetizada no organismo dos animais a partir da lisina e metionina, exigindo a presença de ferro niacina e das vitaminas B6 e C (COELHO et al., 2005), compostos presentes na Spirulina. Em um estudo avaliando a suplementação de spirulina Red sea bream (*Pragus major*). A suplementação de spirulina em Red sea bream foi avaliada por Nakagawa et al. (2000), que correlacionaram aumentos significativos de algumas substâncias-chave para a β -oxidação de ácidos graxos, como carnitina hepática e acilcarnitina de cadeia longa, nas dietas com spirulina.

Em um estudo realizado por KIRON et al. (2012), o desempenho e a composição corporal de salmão alimentado com polpa de microalgas (5 e 10%) não diferiu estatisticamente dos animais que receberam a ração sem microalga. De fato, o salmão do

Atlântico (*S. salar*) mesmo sendo carnívoro é capaz de tolerar grandes níveis de materiais vegetais em sua ração (TORSTENSEN et al., 2008). No entanto, em um estudo recente, com bacalhau do Atlântico (*Porphyra* spp), outra espécie carnívora, a substituição de 15% e 30% da farinha de peixe por uma mistura de microalgas de *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp. provocou uma redução significativa no crescimento no nível de substituição mais alto (WALKER; BERLINSKY, 2011). Os autores sugerem que um problema de palatabilidade pode ter ocorrido com a inclusão de microalgas, apesar de um aumento significativo no consumo de ração ter ocorrido na segunda etapa do estudo. Provavelmente uma inclusão de microalgas de forma gradual poderia resolver o problema no consumo das dietas.

A substituição de até 20% de farinha de peixe por *Tetraselmis suecica*, na dieta de robalo (*Dicentrarchus labrax*) não afetou o desempenho e crescimento desses animais (TULLI et al., 2012). Estes mesmos autores, relataram que a *Tetraselmis suecica* ainda foi capaz de reduzir o índice hepatossomático, quando comparada a dieta controle, possivelmente por efeitos moduladores de compostos presentes na microalga no metabolismo energético.

A *Spirulina platensis* foi avaliada por Ungsethaphand et al. (2010), como fonte de proteína para tilápia vermelha. Estes autores avaliaram quatro níveis de inclusão de spirulina nas dietas experimentais (5, 10, 15 e 20%), substituindo a farinha de peixe de forma gradual. O ganho de peso, taxa de crescimento específico, conversão alimentar e sobrevivência não foram afetados pela spirulina em relação a dieta controle. Com isso, os referidos autores recomendam a substituição de até 20% da farinha de peixe por spirulina, sem qualquer efeito adverso no crescimento dos peixes. As microalgas quando adicionadas nas dietas de animais, basicamente aumentam o desempenho, auxiliam no metabolismo energético, além de impulsionar o sistema imunológico.

2.3.2 Microalgas como imunoestimulantes para peixes

A utilização de microalgas como aditivos nas dietas, tem sido utilizada como uma forma de manter a saúde e melhorar o desempenho dos peixes, muitos desses aditivos atuam como imunoestimulantes nas dietas, melhorando o ganho de peso, a eficiência alimentar e a resistência a doenças (VALLEJOS-VIDAL et al., 2016). Um imunoestimulante é uma substância natural (ex. microalgas) ou química que estimula o

sistema imunológico por vias específicas (vacinas ou antígenos) ou não específicas (independentemente da especificidade antigênica). Na Aquicultura, os imunostimulantes inespecíficos têm sido amplamente utilizados provavelmente devido ao conhecimento limitado da resposta imune em peixes e à facilidade de sua aplicação (VALLEJOS-VIDAL et al., 2016).

Alguns estudos destacaram as propriedades imunostimulantes das microalgas em peixes. Por exemplo, a *Chlorella* sp pode ser usada como aditivo promotor de crescimento, além de estar envolvida na regulação do sistema imune inato e adaptativo do kinguio (*Carassius auratus*) (XU et al., 2014; ZHANG et al., 2014). O uso de *Chlorella* na dieta (6–8% de substituição da farinha de peixe) também aumentou a resposta imune (contagem total de hemócitos e atividade de propenol oxidase) de pós-larvas de *Macrobrachium rosenbergii*, além de aumentar de forma efetiva a taxa de crescimento (MALIWAT et al., 2017). Estes mesmos autores relataram que a *Chlorella* também aumentou a resistência das pós-larvas do *M. rosenbergii* contra uma infecção por *Aeromonas hydrophila*. Demonstrando assim, que o uso de microalgas também pode ser aplicado tanto para peixes, quanto para crustáceos.

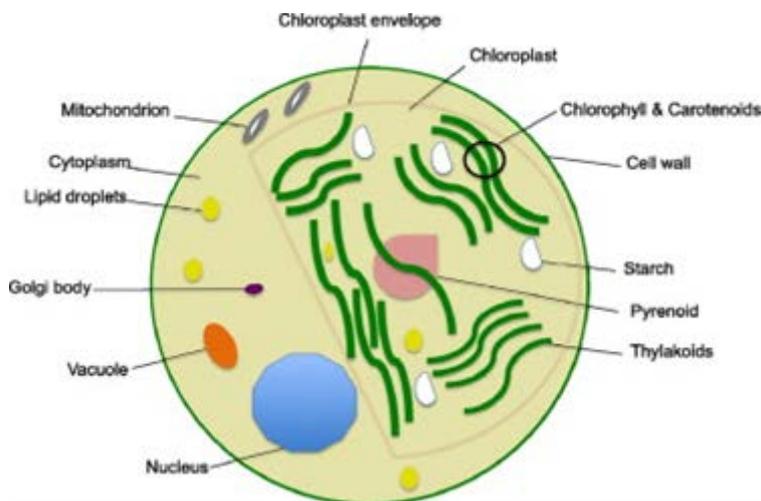
A spirulina também apresentou efeitos imunostimulantes em peixes. Conforme o relatado por Watanuki et al. (2006), carpas (*Cyprinus carpio*) quando alimentadas com spirulina aumentara as respostas da atividade fagocítica e da produção de ânion superóxido nas células fagocíticas renais. A ativação das células foi observada durante pelo menos 5 dias após o tratamento. Além disso, estes mesmos autores relataram um aumento na expressão de genes da interleucina (IL) -1 β e do fator de necrose tumoral- α (TNF) dos em peixes alimentados com spirulina. De forma semelhante, a inclusão de até 10% de spirulina na dieta pode aumentar significativamente a contagem de células vermelhas do sangue, glóbulos brancos, hemoglobina, proteína total e os níveis de albumina da truta arco-íris (*O. mykiss*) (YEGANEH; TEIMOURI; AMIRKOLAIE, 2015). Com base nos relatos anteriores, pode-se sugerir que a utilização da biomassa de microalgas em combinação com a dieta tem potencial de ajudar a melhorar o sistema imune de peixes e de crustáceos.

2.4 Caracterização das principais microalgas, *Chlorella* e *Spirulina*

2.4.1 *Chlorella*

As microalgas do gênero *Chlorella* são unicelulares pertencentes à categoria de microalgas verdes (família Chlorophyta). Podem crescer em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas (SIEW MOI, 2004). A *Chlorella* foi isolada pela primeira vez por Beijerinck em 1890-1893 (PREISIG; ANDERSEN, 2005). A classificação taxonômica da *Chlorella* é: Domínio: Eucariótico, Reino: Protista, Divisão: Chlorophyta, Classe: Trebouxiophyceae, Ordem: Chlorellales, Família: Chlorellaceae, Gênero: *Chlorella*. O nome *Chlorella* vem da palavra grega chloros (*Χλωρός*), que significa verde, e do sufixo latino ella, que se refere ao seu tamanho microscópico (SAFI et al., 2014). A *Chlorella* é uma célula microscópica esférica com diâmetro de 2–10 µm (YAMAMOTO; KURIHARA; KAWANO, 2005) e tem muitos elementos estruturais semelhantes às plantas (Fig. 1). É uma microalga unicelular que cresce em água doce e está presente na terra desde o período pré-cambriano há 2,5 bilhões de anos e desde então sua integridade genética tem se mantido constante (DITFURTH, 1972).

Figura 1 — Ultraestrutura esquemática de *C. vulgaris* representando diferentes organelas



Fonte: Adaptado de Safi et al. (2014)

Atualmente o Japão é o líder mundial no consumo de *Chlorella*, sendo seu principal uso para tratamento médico (RANI; SANDAL; SAHOO, 2018), devido as propriedades imunomoduladoras e anticâncer (JUSTO; SILVA; QUEIROZ, 2001; SINGH; SINGH; BAMEZAI, 1999). A *Chlorella* tem sido amplamente utilizada como alimento e aditivo na nutrição animal, uma vez que contém alto teor de proteínas, ácidos graxos, fibras alimentares, carotenóides, vitaminas, minerais e outros compostos bioativos. O Japão, Alemanha e Taiwan são os principais produtores de *Chlorella*, em

2009 a produção anual foi cerca de cerca de 2000 toneladas de peso seco (BRENNAN; OWENDE, 2010).

2.4.2 Spirulina (*Arthrospira platensis*)

A *Arthrospira* (Spirulina) é uma conhecida microalga azul-esverdeada com aplicação em diversas áreas - desde a nutrição humana e animal até a produção de biocombustíveis (MICHALAK et al., 2020). Desde que *Arthrospira* foi relatado pela primeira vez em 1852 por Stizenberger, muitas espécies deste gênero de cianobactérias foram descritas e isoladas. No entanto, sua classificação ainda é confusa (SILI; TORZILLO; VONSHAK, 2012). O gênero *Arthrospira* foi invalidado em 1925 por Geitler em uma revisão das Cyanophyceae, e fundido com o gênero *Spirulina* (NOWICKA-KRAWCZYK; MÜHLSTEINOVÁ; HAUER, 2019). A maioria dos autores seguiu Geitler por muitos anos, mas cada vez mais os pesquisadores perceberam que os gêneros são distintos e voltaram a usar dois nomes. Em virtude de a *Arthrospira platensis*, originalmente ter pertencido ao gênero *Spirulina*, ela pode ser encontrada sob a designação de spirulina (MIRANDA, 2010). Muitas espécies atualmente listadas como spirulina devem ser reincluídas em *Arthrospira*, isto inclui todas aquelas cultivadas comercialmente e vendidas como spirulina (SILI; TORZILLO; VONSHAK, 2012). No entanto, podemos esperar que o nome spirulina continue a ser utilizado por mais tempo. Este fato ocorre muito mais por termos práticos e mercadológicos, do que taxonômicos, uma vez que o nome comercial destes microrganismos ser conhecido assim há muito tempo (VINET; ZHEDANOV, 2011).

A *Arthrospira* pertence à família Cyanophyceae, onde encontram-se um grupo de cianobactérias fotossintetizantes, filamentosas, caracterizadas por uma cadeia de células na forma de espiral (tricoma), envolvidas por uma bainha fina. Quando observada em microscópio óptico a *Arthrospira platensis* aparece como um filamento verde-azulado, composto por células cilíndricas não ramificadas e em forma helicoidal. A *Arthrospira* é muito utilizada na alimentação humana e animal, são capazes de reduzir a inflamação e manifestar efeitos antioxidantes. É fonte rica de vitaminas, especialmente vitamina B12, minerais, proteínas e carotenoides (SELMÍ et al., 2011).

2.5 Espécies de estudo

O zebrafish (*Danio rerio*) é nativo das bacias hidrográficas do Ganges e Brahmaputra, localizadas no nordeste da Índia (SPENCE et al., 2008), é um peixe tropical pertencente à superclasse Actinopterygii, infra classe Teleostei (comumente conhecidos como peixes ósseos) e à família Cyprinidae (FISHBASE, 2020). Anteriormente era encontrado com o nome de *Brachydanio rerio*, no entanto, após uma revisão do gênero *Danio* foi mudado para *Danio rerio* em 1981 (CHU, 1981), porque ambos os gêneros eram muito semelhantes por terem nadadeiras dorsais curtas e linhas laterais ausentes ou incompletas (FANG, 2003).

O zebrafish é um modelo animal bem estabelecido para diversas áreas da pesquisa como, genética, biologia do desenvolvimento, modelo para doenças em humanos e ecotoxicologia (APPEL, 2000; CASTRO et al., 2018; LIESCHKE; CURRIE, 2007; VIROTE et al., 2020). Por outro lado, alguns estudos têm utilizado o zebrafish como modelo para melhorar as pesquisas para a aquicultura (RIBAS; PIFERRER, 2014; ULLOA et al., 2011). A aplicação do zebrafish como modelo para peixes de produção concentra-se principalmente no manejo, sobrevivência, resposta imune, nutrição e crescimento (HEDRERA et al., 2013; ULLOA; MEDRANO; FEIJO, 2014).

Entre as vantagens do zebrafish como modelo estão sua facilidade de manejo, intervalo de geração curto (aproximadamente 3 meses) e grande número de ovos por desova, permitindo a realização das análises com elevado número de animais (RIBAS; PIFERRER, 2014). Além disso, o zebrafish conta com a disponibilidade de um genoma sequenciado (GRCz11, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000002035.4/), o que permite usar ferramentas genômicas, como o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) para avaliar o efeito das dietas sobre os mecanismos moleculares (ULLOA; MEDRANO; FEIJO, 2014). O zebrafish ainda conta com a disponibilidade de linhagens transgênicas, que carregam promotores específicos acoplados a GFP (*green fluorescent protein*), o que pode tornar estas linhagens indicadores in vivo através da marcação de tecidos específicos do promotor e mudanças na estrutura após tratamento genético ou químico (SHAMCHUK; TIERNEY, 2013). Dessa forma, o zebrafish é uma ferramenta valiosa para estudos de nutrigenômica aplicado a peixes de produção.

Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887), popularmente conhecido como pacu, pertence à família Characidae, subfamília Myleinae (Britski et al., 1999). É uma espécie naturalmente encontrada na bacia do rio La Plata formada pelos rios Paraguai, Paraná e Uruguai e seus afluentes (Reis et al., 2003; Romagosa et al., 1988). Atualmente

é cultivado do nordeste da Argentina até a região centro-oeste do Brasil (CIAN et al., 2017). Devido ao elevado ganho de peso, manejo simples e notável plasticidade alimentar (ABIMORAD; CARNEIRO; URBINATI, 2007; JOMORI et al., 2003) é muito valorizado para fins comerciais. O pacu, juntamente com outros membros da família Characidae, (*Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus* e híbridos), representa a maioria dos peixes nativos cultivados, respondendo por quase 40 % da produção nacional (IBGE, 2016; PEIXE BR, 2019).

2.6 RNA-Seq

O advento da tecnologia do sequenciamento de nova geração (NGS), a partir de 2005, trouxe grandes benefícios a estudos biológicos, reduzindo os custos e aumentando o rendimento da análise em várias ordens de magnitude (METZKER, 2010). As principais aplicações do NGS na aquicultura incluem a metagenômica e a transcriptômica (LIU et al., 2011).

O transcriptoma é o conteúdo total de RNA da célula em um determinado ponto do tempo. O sequenciamento do transcriptoma (RNA-Seq) é uma opção ideal para uma interpretação rápida e econômica do elemento funcional do genoma e dos genes funcionais nas espécies não-modelo que carecem de um genoma de referência (CHANDHINI; REJISH KUMAR, 2019). O sequenciamento do transcriptoma visa especificamente (i) decifrar a região da sequência codificadora da proteína completa de cada gene (ii) determinar a composição transcricional dos genes no que diz respeito ao seu local inicial e final, *splicing* alternativo e modificação pós-transcricional e (iii) medir a expressão do transcrito durante o desenvolvimento e sob diversas condições (LIU et al., 2013). De forma geral, o objetivo geral da transcriptômica por RNA-seq não é identificar genes únicos que possam ser alterados, como no caso da expressão de genes por PCR em tempo real (RT-qPCR), mas definir quais vias biológicas estão sendo alteradas em uma abordagem mais holística genes (MARTIN; DEHLER; KRÓL, 2016).

O RNA-Seq usando NGS tem progredido rapidamente, pois pode produzir grande quantidade de resultados com um custo relativamente baixo. É uma ferramenta poderosa para entender interações complexas entre genótipo e fenótipo, fornecendo insights sobre os mecanismos moleculares que controlam o destino, desenvolvimento e função da célula (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Na aquicultura, tem sido amplamente utilizado

para obter informações sobre o mecanismo de processos biológicos em todo o genoma e transcriptoma, epigenética, desenvolvimento de novos marcadores, análises filogenéticas, mapeamento genético e criação de genomas de referência (CHANDHINI; REJISH KUMAR, 2019). O perfil do transcriptoma também é muito utilizado na aquicultura para a identificação e análise de expressão de genes candidatos envolvidos no crescimento, reprodução, desenvolvimento, imunidade, doença, estresse e toxicologia. Além disso, a transcriptômica é uma ferramenta inevitável em pesquisas envolvendo nutrigenômica.

A interação entre genes e a nutrição (fatores ambientais), chamada de nutrigenômica, é uma área de grande interesse na produção de peixes. Esta ferramenta permite um maior entendimento da regulação de genes envolvidos no metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos em peixes. Abordagens de transcriptoma tem sido empregada para avaliar o efeito de dietas base de proteínas vegetais nos peixes (TACCHI et al., 2011; VON SCHALBURG et al., 2008). No entanto, os resultados obtidos em muitos destes estudos são comumente difíceis de comparar entre si. Devido as diferenças na formulação das dietas, tipos de ingredientes, antecedentes genéticos dos peixes e o delineamento experimental (ULLOA; MEDRANO; FEIJO, 2014). Sendo assim, alguns autores propusera a utilização do zebrafish como modelo para estudos de nutrigenômica (ALESTRÖM; WINTHER-LARSEN, 2016; RIBAS; PIFERRER, 2014)

Os processos biológicos e mecanismos moleculares do crescimento de peixes, se sobrepõem entre diferentes espécies, independentemente da distância evolutiva ou das condições ambientais (ULLOA; MEDRANO; FEIJO, 2014). Com base nisso, as pesquisas realizadas com o zebrafish podem gerar importantes contribuições para nutrição de outros peixes (MACKENZIE; JENTOFT, 2016).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-TAWWAB, Mohsen; AHMAD, Mohammad H. Live *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 9, p. 1037–1046, 2009.
- ABDELKHALEK, Nevien K.M.; GHAZY, Emad W.; ABDEL-DAIM, Mohamed M. Pharmacodynamic interaction of *Spirulina platensis* and deltamethrin in freshwater fish Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: impact on lipid peroxidation and oxidative stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 4, p. 3023–3031, 2015.
- ABIMORAD, Eduardo Gianini; CARNEIRO, Dalton José; URBINATI, Elisabeth Criscuolo. Growth and metabolism of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. **Aquaculture Research**, v. 38, n. 1, p. 36–44, 2007.
- ALESTRÖM, Peter; WINTHER-LARSEN, Hanne C. Zebrafish offer aquaculture research their services. *In: Genomics in Aquaculture*. Elsevier Inc., 2016. p. 165–194. *E-book*.
- ANGELL, Alex R. *et al.* The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 511–524, 2016.
- APPEL, Bruce. Zebrafish neural induction and patterning. **Developmental Dynamics**, v. 219, n. 2, p. 155–168, 2000.
- BATISTA, Ana Paula *et al.* Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**, v. 2, n. 2, p. 164–173, 2013.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207–210, 2007.
- BECKER, E. Wolfgang. Microalgae for Aquaculture: Nutritional Aspects. *In: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 671–691.
- BECKER, Wolfgang. Microalgae for Aquaculture: The Nutritional Value of Microalgae for Aquaculture. *In: Handbook of Microalgal Culture*. 2007. p. 380–391. *E-book*.
- BELAY, Amha; KATO, Toshimitsu; OTA, Yoshimichi. *Spirulina* (*Arthrospira*): Potential application as an animal feed supplement. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, n. 4–5, p. 303–311, 1996.
- BENEDICT, Robert C. Determination of Nitrogen and Protein Content of Meat and Meat Products. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 70, n. 1, p. 69–74, 1987.
- BOROWITZKA, Michael A. **High-value products from microalgae-their development and commercialisation**. Springer, 2013.

BOYD, C.E. Overview of aquaculture feeds. **Feed and Feeding Practices in Aquaculture**, p. 3–25, 2015.

BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. **Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products**. Pergamon, 2010.

BROWN, M. R. *et al.* Nutritional properties of microalgae for mariculture. *In:* , 1997. **Aquaculture**. Elsevier, 1997. p. 315–331.

CAIMI, Christian *et al.* Could dietary black soldier fly meal inclusion affect the liver and intestinal histological traits and the oxidative stress biomarkers of siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) juveniles? **Animals**, v. 10, n. 1, p. 155, 2020.

CALABRÒ, Concetta *et al.* Effects of spirulina diet on the oogenesis of zebrafish: morphological analysis and immunohistochemical determination of the vitellogenin. **Natural Product Research**, 2020.

CAMACHO-RODRÍGUEZ, J. *et al.* Use of continuous culture to develop an economical medium for the mass production of *Isochrysis galbana* for aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 2, p. 851–863, 2020.

CANELLI, Greta *et al.* *Chlorella vulgaris* in a heterotrophic bioprocess: Study of the lipid bioaccessibility and oxidative stability. **Algal Research**, v. 45, p. 101754, 2020.

CAO, Shen Ping *et al.* Effects of dietary fishmeal replacement with *Spirulina platensis* on the growth, feed utilization, digestion and physiological parameters in juvenile gibel carp (*Carassis auratus* gibelio var. CAS III). **Aquaculture Research**, v. 49, n. 3, p. 1320–1328, 2018.

CARNEIRO, William Franco *et al.* Effect of the digestible protein-energy relationship on the growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed fishmeal-free diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 262, p. 114379, 2020a.

CARNEIRO, William Franco *et al.* Replacing fish meal by *Chlorella* sp. meal: Effects on zebrafish growth, reproductive performance, biochemical parameters and digestive enzymes. **Aquaculture**, v. 528, 2020b.

CASTRO, Tássia Flávia Dias *et al.* Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to tebuconazole-based commercial product. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 62, p. 140–146, 2018.

CHANDHINI, Sathyajith; REJISH KUMAR, Vattiringal Jayadrathan. Transcriptomics in aquaculture: current status and applications. **Reviews in Aquaculture**, v. 11, n. 4, p. 1379–1397, 2019.

CHAUTON, Matilde S. *et al.* A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research

challenges and possibilities. **Aquaculture**, v. 436, p. 95–103, 2015.

CHEMELLO, Giulia *et al.* Partially defatted *Tenebrio molitor* larva meal in diets for grow-out rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): Effects on growth performance, diet digestibility and metabolic responses. **Animals**, v. 10, n. 2, p. 229, 2020.

CHU, Xin-Luo. **A Preliminary Revision of Fishes of The Genus Danio From China**. 1981.

CIAN, Raúl E. *et al.* Optimization of single screw extrusion process for producing fish feeds based on vegetable meals and evaluation of nutritional effects using a juvenile *Piaractus mesopotamicus* model. **Animal Feed Science and Technology**, v. 234, p. 54–64, 2017.

COELHO, Christianne De Faria *et al.* **Clinical uses of L-carnitine supplementation**. Revista de Nutricao, 2005.

DAWCZYNSKI, Christine; SCHUBERT, Rainer; JAHREIS, Gerhard. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 891–899, 2007.

DAWOOD, Mahmoud A.O.; KOSHIO, Shunsuke. Application of fermentation strategy in aquafeed for sustainable aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 987–1002, 2020.

DEMIREL, Zeliha *et al.* Influence of media and temperature on the growth and the biological activities of *desmodesmus protuberans* (F.E. Fritsch & M.F. Rich) E. Hegewald. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 18, n. 10, p. 1195–1203, 2018.

DITFURTH, Hoimar von. **Im Anfang war der Wasserstoff**. Hoffmann u. Campe, 1972.

DOLGANYUK, Vyacheslav, *et al.* Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. **Biomolecules**, 2020, 10.8: 1153.

E, Christaki *et al.* Phycobiliproteins: A New Perspective in Natural Pigments Derived from Microalgae. **Journal of Oceanography and Marine Research**, v. 04, n. 01, 2017.

EL-SHEEKH, M. *et al.* Effect of feeding *Arthrospira platensis* (Spirulina) on growth and carcass composition of hybrid red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 14, n. 2, p. 471–478, 2014.

ELSHOUNY, Wagih Abd El Fattah *et al.* Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* against aquatic bacterial isolates. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 6, n. 5, p. 1203–1208, 2017.

FANG, Fang. Phylogenetic Analysis of the Asian Cyprinid Genus *Danio* (Teleostei,

Cyprinidae). **Copeia**, v. 2003, n. 4, p. 714–728, 2003.

FAO.2016. **FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp. 2016.**

FAO (org.). **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020.** FAO, 2020. *E-book.*

FERNÁNDEZ-PALACIOS, Hipólito *et al.* Effects of Broodstock Diet on Eggs and Larvae. *In: Larval Fish Nutrition.* Wiley-Blackwell, 2011. p. 151–181. *E-book.*

FROESE, Rainer. **Danio rerio, Zebra danio.** 2007. Disponível em: . Acesso em: 14 jun. 2020.

GARCÍA-CASAL, Maria N. *et al.* High iron content and bioavailability in humans from four species of marine algae. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 12, p. 2691–2695, 2007.

GATLIN III, Delbert M., *et al.* Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture research*, 2007, 38.6: 551-579.

GLENCROSS, Brett D. *et al.* A comparison of the digestibility of a range of lupin and soybean protein products when fed to either Atlantic salmon (*Salmo salar*) or rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 237, n. 1–4, p. 333–346, 2004.

Glencross, B. D., Baily, J., Berntssen, M. H., Hardy, R., MacKenzie, S., & Tocher, D. R. (2020). Risk assessment of the use of alternative animal and plant raw material resources in aquaculture feeds. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 703-758.

GORDON BELL, J. *et al.* Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 2, p. 222–230, 2002.

GOUVEIA, Luisa; EMPIS, José. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: Effect of storage conditions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, n. 2, p. 227–233, 2003.

GRAMMES, Fabian *et al.* *Candida utilis* and *Chlorella vulgaris* counteract intestinal inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e83213, 2013.

GRIGORAKIS, Kriton. Effects of Nutrition and Aquaculture Practices on Fish Quality. *In: Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications.* Wiley-Blackwell, 2010. p. 82–95. *E-book.*

GUEDES, A. Catarina; SOUSA-PINTO, Isabel; MALCATA, F. Xavier. Application of Microalgae Protein to Aquafeed. *In: Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances.* Elsevier Inc., 2015. p. 93–125. *E-book.*

GÜROY, Betül *et al.* Spirulina as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid *Pseudotropheus acei*. **Aquaculture**

International, v. 20, n. 5, p. 869–878, 2012.

GUSCHINA, Irina A.; HARWOOD, John L. Algal lipids and their metabolism. *In: Algae for Biofuels and Energy*. Springer Netherlands, 2013. p. 17–36.

HARUN, Razif *et al.* **Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products**. Pergamon, 2010.

HASAN, M. Shamimul; FEUGANG, Jean M.; LIAO, Shengfa F. A nutrigenomics approach using RNA sequencing technology to study nutrient–gene interactions in agricultural animals. **Current Developments in Nutrition**, 2019, 3.8: nzz082..

HEDRERA, Manuel I. *et al.* Soybean Meal Induces Intestinal Inflammation in Zebrafish Larvae. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69983, 2013.

HEIMANN, Kirsten; HUERLIMANN, Roger. Microalgal classification: major classes and genera of commercial microalgal species. *In: Handbook of marine microalgae*. Academic Press, 2015. p. 25-41.

HEMRE, G. I.; SANDNES, K. Effect of dietary lipid level on muscle composition in Atlantic salmon *Salmo salar*. **Aquaculture Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 9–16, 1999.

HUSSEIN, Ebtehal El Sayed *et al.* Enhancing the growth of Nile tilapia larvae/juveniles by replacing plant (gluten) protein with algae protein. **Aquaculture Research**, v. 44, n. 6, p. 937–949, 2013.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal. v. 44 - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2016.

JI, Hong *et al.* Effect of dietary vitamins C and E fortification on lipid metabolism in red sea bream *Pagrus major* and black sea bream *Acanihopagrus schlegeli*. **Fisheries Science**, v. 69, n. 5, p. 1001–1009, 2003.

JOMORI, Rosângela Kiyoko *et al.* Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, n. 1–4, p. 277–287, 2003.

JUSTO, Giselle Z.; SILVA, Márcia R.; QUEIROZ, Mary L.S. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 23, n. 1, p. 119–132, 2001.

KIM, Kang Woong *et al.* Effects of dietary *Chlorella ellipsoidea* supplementation on growth, blood characteristics, and whole-body composition in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 33, n. 4, p. 425–431, 2002.

KIM, Sung Sam *et al.* Partial replacement of fish meal with *Spirulina pacifica* in diets for parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic**

Sciences, v. 13, n. 2, p. 197–204, 2013.

KIRON, V. *et al.* Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 5, p. 521–531, 2012.

KOLLER, Martin; MUHR, Alexander; BRAUNEGG, Gerhart. **Microalgae as versatile cellular factories for valued products**. Elsevier, 2014.

KUMUDHA, Anantharajappa *et al.* Methylcobalamin - A form of vitamin B12 identified and characterised in *Chlorella vulgaris*. **Food Chemistry**, v. 170, p. 316–320, 2015.

LEHNINGER, Albert Lester; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 4. edição. Sarvier, São Paulo, 2006.

LI, Peng *et al.* New developments in fish amino acid nutrition: Towards functional and environmentally oriented aquafeeds. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 43–53, 2009.

LIESCHKE, Graham J.; CURRIE, Peter D. **Animal models of human disease: Zebrafish swim into view**. Nature Publishing Group, 2007.

LIN, Shimei; LUO, Li. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 168, n. 1–2, p. 80–87, 2011.

LIU, Shikai *et al.* RNA-Seq reveals expression signatures of genes involved in oxygen transport, protein synthesis, folding, and degradation in response to heat stress in catfish. **Physiological Genomics**, v. 45, n. 12, p. 462–476, 2013.

LOURENÇO, Sergio O. *et al.* Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v. 39, n. 1, p. 17–32, 2004.

LUO, Zhi *et al.* Chlorella additive increased growth performance, improved appetite and immune response of juvenile crucian carp *Carassius auratus*. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 10, p. 3329–3337, 2018.

MACKENZIE, Simon; JENTOFT, Sissel. Future perspective. *In: GENOMICS IN AQUACULTURE*. Elsevier Inc., 2016. p. 275–277.

MALIWAT, Gian Carlo *et al.* Growth and immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) postlarvae fed diets containing *Chlorella vulgaris* (Beijerinck). **Aquaculture Research**, v. 48, n. 4, p. 1666–1676, 2017.

MARIOTTI, François; TOMÉ, Daniel; MIRAND, Philippe Patureau. Converting nitrogen into protein - Beyond 6.25 and Jones' factors. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 2, p. 177–184, 2008.

MARTIN, Samuel A.M.; DEHLER, Carola E.; KRÓL, Elżbieta. **Transcriptomic responses in the fish intestine**. Elsevier Ltd, 2016.

MARTINS, Dulce Alves; VALENTE, Luisa M.P.; LALL, Santosh P. Effects of dietary lipid level on growth and lipid utilization by juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.). **Aquaculture**, v. 263, n. 1–4, p. 150–158, 2007.

MEENA, D. K. *et al.* Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 431–457, 2013.

MICHALAK, Izabela *et al.* Arthrospira (Spirulina) platensis: An effective biosorbent for nutrients. **Process Biochemistry**, v. 88, p. 129–137, 2020.

MORALES-SÁNCHEZ, Daniela; MARTINEZ-RODRIGUEZ, Oscar A.; MARTINEZ, Alfredo. Heterotrophic cultivation of microalgae: production of metabolites of commercial interest. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 5, p. 925–936, 2017.

MULDERS, Kim J.M. *et al.* Growth and pigment accumulation in nutrient-depleted Isochrysis aff. galbana T-ISO. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 5, p. 1421–1430, 2013.

MUSTAFA, Md. Ghulam *et al.* Effects of Ascophyllum and Spirulina Meal as Feed Additives on Growth Performance and Feed Utilization of Red Sea Bream, *Pagrus major*. **Journal of the Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University**, v. 33, n. 2, p. 125–132, 1994.

NAKAGAWA, H. *et al.* Effect of Chlorella-extract supplement on blood properties and body composition of ayu. **Aquaculture Science**, v. 30, n. 4, p. 192–201, 1983.

NAKAGAWA, Heisuke *et al.* Effect of dietary catechin and Spirulina on vitamin C metabolism in red sea bream. **Fisheries Science**, v. 66, n. 2, p. 321–326, 2000.

NAKAGAWA, Heisuke; SATO, Minoru; GATLIN, Delbert M. **Dietary Supplements for the Health and quality of cultured fish**. CABI, 2007. *E-book*.

NATH, P. R. *et al.* Dietary supplementation with the microalgae *Parietochloris incisa* increases survival and stress resistance in guppy (*Poecilia reticulata*) fry. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 2, p. 167–180, 2012.

NAYLOR, Rosamond L., *et al.* Feeding aquaculture in an era of finite resources. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2009, 106.36: 15103-15110.

NGUYEN, Trung T.; HEIMANN, Kirsten; ZHANG, Wei. Protein Recovery from Underutilised Marine Bioresources for Product Development with Nutraceutical and Pharmaceutical Bioactivities. **Marine Drugs**, 2020, 18.8: 391.

NORHEIM, Frode, *et al.* Molecular nutrition research—the modern way of performing nutritional science. **Nutrients**, 2012, 4.12: 1898-1944.

NOVOVESKÁ, Lucie *et al.* Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. **Marine Drugs**, v. 17, n. 11, p. 640, 2019.

NOWICKA-KRAWCZYK, Paulina; MÜHLSTEINOVÁ, Radka; HAUER, Tomáš. Detailed characterization of the *Arthrospira* type species separating commercially grown taxa into the new genus *Limnospira* (Cyanobacteria). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

NRC. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington, D.C.: National Academies Press, 2011.

OHYA, Shotaro; NAKAGAWA, Heisuke. Effect of Chlorella-Extract Supplementation to Diet on in vitro Lipolysis in Ayu. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 56, n. 5, p. 777–782, 1990.

OLIVA-TELES, A.; ENES, P.; PERES, H. Replacing fishmeal and fish oil in industrial aquafeeds for carnivorous fish. *In: Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Elsevier, 2015. p. 203–233. *E-book*.

OLSEN, Ragnar L.; HASAN, Mohammad R. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. **Trends in Food Science & Technology**, 2012, 27.2: 120-128.

OLVERA-NOVOA, M. A. *et al.* Effect of the use of the microalga *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. **Aquaculture Research**, v. 29, n. 10, p. 709–715, 1998.

ORTIZ, J. *et al.* Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 98–104, 2006.

PAULY, Daniel; ZELLER, Dirk. Catch reconstructions reveal that global marine fisheries catches are higher than reported and declining. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2016.

PEIXE, BR. **Anuário PeixeBr da Piscicultura 2020. 2020**, 2019.

PLAZA, Merichel *et al.* **Innovative natural functional ingredients from microalgae**. American Chemical Society, 2009.

PREISIG, Hans R.; ANDERSEN, Robert A. Historical Review of Algal Culturing Techniques. *In: Algal Culturing Techniques*. Elsevier, 2005. p. 1–12. *E-book*.

RAGAZA, Janice Alano *et al.* A review on *Spirulina*: alternative media for cultivation and nutritive value as an aquafeed. **Reviews in Aquaculture**, p. raq.12439, 2020.

RAMENA, Yathish *et al.* Growth, nutrient retention, innate immune response, and intestinal morphology of juvenile, soy-naïve hybrid striped bass, *Morone saxatilis* x *M.*

chrysois fed commercial-type, soy-based, ideal protein, fish meal replacement diets. **Aquaculture**, v. 522, p. 735150, 2020.

RANI, Komal; SANDAL, Nidhi; SAHOO, P. K. A comprehensive review on chlorella- its composition, health benefits, market and regulatory scenario. **The Pharma Innovation Journal**, 2018, 7.7: 584-589.

REFSTIE, Ståle; STOREBAKKEN, Trond; ROEM, Andries J. Feed consumption and conversion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with fish meal, extracted soybean meal or soybean meal with reduced content of oligosaccharides, trypsin inhibitors, lectins and soya antigens. **Aquaculture**, v. 162, n. 3–4, p. 301–312, 1998.

REITAN, Kjell Inge, et al. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. **Aquaculture**, 1997, 155.1-4: 207-221.

REN, Lu Jing *et al.* Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 5, p. 1649–1656, 2010.

REYES-BECERRIL, Martha *et al.* Dietary administration of microalgae *Navicula* sp. affects immune status and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 3, p. 883–889, 2013.

RIBAS, Laia; PIFERRER, Francesc. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. **Reviews in Aquaculture**, 2014, 6.4: 209-240.

RICHMOND, Amos; HU, Qiang. **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition**. John Wiley & Sons, 2013. *E-book*.

ROY, Sudeshna Sen; PAL, Ruma. Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *In: Microalgae In Aquaculture, 2015. Proceedings of the Zoological Society*. Springer, 2015. p. 1–8.

SAFI, Carl, et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2014, 35: 265-278.

SARKER, Pallab K. *et al.* Towards sustainable aquafeeds: Complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 2016.

SELMI, Carlo *et al.* The effects of Spirulina on anemia and immune function in senior citizens. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 8, n. 3, p. 248–254, 2011.

SHAH, Mahfuzur Rahman *et al.* Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *In: , 2018. Journal of Applied Phycology*. Springer Netherlands, 2018. p. 197–213.

SHAMCHUK, Angela L.; TIERNEY, Keith B. The Importance of Olfactory and Motor Endpoints for Zebrafish Models of Neurodegenerative Disease. *In: ANIMAL MODELS FOR THE STUDY OF HUMAN DISEASE*. Elsevier Inc., 2013. p. 651–678. *E-book*.

SHI, Xi *et al.* Effect of fish meal replacement by Chlorella meal with dietary cellulase addition on growth performance, digestive enzymatic activities, histology and myogenic genes' expression for crucian carp *Carassius auratus*. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 6, p. 3244–3256, 2017.

SIEW MOI, Phang. Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 2, p. 159–160, 2004.

SILI, Claudio; TORZILLO, Giuseppe; VONSHAK, Avigad. Arthrospira (Spirulina). *In: Ecology of cyanobacteria II*. Springer, Dordrecht, 2012. p. 677-705.

SIMOPOULOS, Artemis P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental biology and medicine**, 2008, 233.6: 674-688.

SINGH, Anjali; SINGH, Satya Prakash; BAMEZAI, Ramesh. Inhibitory potential of *Chlorella vulgaris* (E-2S) on mouse skin papillomagenesis and xenobiotic detoxication system. **Anticancer Research**, v. 19, n. 3 A, p. 1887–1891, 1999. Disponível em: . Acesso em: 14 out. 2020.

SITEPU, Eko K., et al. Critical evaluation of process parameters for direct biodiesel production from diverse feedstock. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2020, 123: 109762.

SKALLI, Ali *et al.* The inclusion of the microalga *scenedesmus* sp. In diets for rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, juveniles. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1–22, 2020.

SPENCE, Rowena, et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews**, 2008, 83.1: 13-34.

SPOLAORE, Pauline *et al.* Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

TACCHI, Luca *et al.* Transcriptomic responses to functional feeds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, n. 5, p. 704–715, 2011.

TACON, Albert G.J.; METIAN, Marc. Feed matters: Satisfying the feed demand of aquaculture. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, v. 23, n. 1, p. 1–10, 2015.

TEIMOURI, Mahdi; AMIRKOLAIE, Abdolsamad Keramat; YEGANEH, Sekineh. The effects of spirulina platensis meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 396–399, p. 14–19, 2013.

TIBBETTS, Sean M.; MILLEY, Joyce E.; LALL, Santosh P. Chemical composition and

nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 3, p. 1109–1119, 2015.

TOMÁS-ALMENAR, C. *et al.* *Scenedesmus almeriensis* from an integrated system waste-nutrient, as sustainable protein source for feed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 497, p. 422–430, 2018.

TORSTENSEN, B. E. *et al.* Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. **Aquaculture**, v. 285, n. 1–4, p. 193–200, 2008.

TULLI, F. *et al.* Effect of the inclusion of dried tetraselmis suecica on growth, feed utilization, and fillet composition of European sea bass Juveniles fed organic diets. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 21, n. 3, p. 188–197, 2012.

ULLOA, Pilar E., *et al.* Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 2011, 21.4: 649-666.

ULLOA, Pilar E.; MEDRANO, Juan F.; FEIJO, Carmen G. Zebrafish as animal model for aquaculture nutrition research. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. SEP, p. 313, 2014.

VALLEJOS-VIDAL, Eva *et al.* **The response of fish to immunostimulant diets.** Academic Press, 2016.

VENKATARAMAN, L. V.; SOMASEKARAN, T.; BECKER, E. W. Replacement Value of blue-green alga (*Spirulina platensis*) for fishmeal and a vitamin-mineral premix for broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 35, n. 3, p. 373–381, 1994.

VINET, Luc; ZHEDANOV, Alexei. A “missing” family of classical orthogonal polynomials. **Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical**, v. 44, n. 8, p. 1689–1699, 2011.

VIROTE, Bárbara do Carmo Rodrigues *et al.* Obesity Induction in Adult Zebrafish Leads To Negative Reproduction and Offspring Effects. **Reproduction**, 2020.

VIZCAÍNO, A. J. *et al.* Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. **Aquaculture**, v. 431, p. 34–43, 2014.

VON SCHALBURG, K. R. *et al.* Expansion of the genomics research on Atlantic salmon *Salmo salar* L. project (GRASP) microarray tools. **Journal of Fish Biology**, v. 72, n. 9, p. 2051–2070, 2008.

WALKER, Abigail B.; BERLINSKY, David L. Effects of partial replacement of fish meal protein by microalgae on growth, feed intake, and body composition of Atlantic cod. **North American Journal of Aquaculture**, v. 73, n. 1, p. 76–83, 2011.

WATANUKI, Hironobu *et al.* Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on

carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 258, n. 1–4, p. 157–163, 2006.

WYSOCZAŃSKI, Tomasz *et al.* Omega-3 Fatty Acids and their Role in Central Nervous System - A Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 816–831, 2016.

XIA, Yan, *et al.* Strategies for enhancing eicosapentaenoic acid production: From fermentation to metabolic engineering. **Algal Research**, 2020, 51: 102038.

XU, Wei *et al.* Effect of dietary chlorella on the growth performance and physiological parameters of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 14, n. 1, p. 53–57, 2014.

YAAKOB, Zahira, *et al.* An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, 2014, 21.1: 6.

YAMAMOTO, Maki; KURIHARA, Ippei; KAWANO, Shigeyuki. Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Planta**, v. 221, n. 6, p. 766–775, 2005.

YEGANEH, Sakineh; TEIMOURI, Mahdi; AMIRKOLAIE, Abdolsamad Keramat. Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Research in Veterinary Science**, v. 101, p. 84–88, 2015.

YIGIT, Murat; YARDIM, Öztekin; KOSHIO, Shunsuke. The protein sparing effects of high lipid levels in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W. 1792) with special reference to reduction of total nitrogen excretion. **Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh**. 2002.

YILDIRIM, Önder *et al.* Effects of two seaweeds (*Ulva lactuca* and *Enteromorpha linza*) as a feed additive in diets on growth performance, feed utilization, and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 15, n. 3, p. 455–460, 2009.

ZAHARAN, Eman *et al.* Effects of dietary Astragalus polysaccharides (APS) on growth performance, immunological parameters, digestive enzymes, and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 38, n. 1, p. 149–157, 2014.

ZHANG, Qihuan *et al.* Effects of dietary administration of chlorella on the immune status of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. **Italian Journal of Animal Science**, v. 13, n. 3, p. 653–656, 2014.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - Replacing fish meal by *Chlorella* sp. meal: Effects on zebrafish growth, reproductive performance, biochemical parameters, and digestive enzymes

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735612>

Scientific Journal:
Aquaculture
ISSN: 0044-8486
Impact Factor: 3.224
Elsevier

Replacing fish meal by *Chlorella* sp meal: Effects on zebrafish growth, reproductive performance, biochemical parameters, and digestive enzymes

William Franco Carneiro^{a*}, Tassia Flavia Dias Castro^b, Tamira Maria Orlando^a, Fabio Meurer^c, Daniella Aparecida de Jesus Paula^b, Barbara do Carmo Rodrigues Virote^b, André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna^{b,d} Luis David Solis Murgas^{a,b*}

^aDepartamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^bDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^cUniversidade Federal do Paraná, *campus* Avançado de Jandaia do Sul

^dUniversidade Federal do Paraná, Setor Palotina

***Author for correspondence:**

Murgas, L.D.S. lsmurgas@ufla.br;

Carneiro, W.F. willfc14@gmail.com.

Tel: +55 35 38291728, Lavras-MG, 37200-000, Brazil.

Abstract

Protein-rich microalgae are a potential alternative to fishmeal in aquaculture. In this context, this study evaluated the effects of fish meal (FM) replacement by *Chlorella* sp meal (CM) on the growth performance, biochemical parameters, enzymatic activity and reproductive performance of zebrafish (*Danio rerio*). Up to 100% of FM was replaced with CM content at 0, 10, 20, 30, 40 and 50 g/kg diet. After 60 days of feeding trials, animals fed 40 g/kg CM showed significantly better growth compared to animals fed diets with no CM. Likewise, animals fed 50g/kg of CM presented the lowest levels of total cholesterol, LDL and triglycerides. The inclusion of CM had no significant effects on enzymatic amylase and lipase activity, while significantly increasing alkaline phosphatase activity. The highest levels of *Chlorella* sp meal in the diets (40 and 50 g/kg of CM) provided the highest egg production ($P = 0.004$), hatching rate ($P = 0.004$) and larval survival ($P = 0.009$) at 6 days post fertilization. The replacement of FM by CM generated an increase in the final weight, accompanied by an improvement in total cholesterol, LDL, triglyceride levels, in addition to improving the reproductive performance of zebrafish, proving to be an interesting alternative to FM in zebrafish juvenile diets.

Keywords: Microalgae, food additive, *Danio rerio*, enzymatic activity

1 Introduction

Fish meal (FM) has been the choice as a protein source in aquafeed, due to its high protein content, excellent amino acid profile and high digestibility (Gatlin et al., 2007). Although FM supply in the last decades has remained stable, with increasing demand, access to it is less (Boyd, 2015; Tacon and Metian, 2015). Due to the high cost of FM, more attention was given to foods of plant origin in the aquafeed production. Soybean meal (SBM) is one of the most used vegetable protein sources in aquafeed due to its stable supply, cost-benefit ratio, high protein content and a relatively balanced amino acid profile (Gatlin et al., 2007; Pahlow et al., 2015). However, levels of FM substitution with SBM differ for each species of fish. Besides that, the use of SBM can cause physiological anomalies, affect performance and well-being of fish (Geay et al., 2011).

The adverse effects of SBM on fish, such as changes in the integrity of the intestinal mucosa (Hedrera et al., 2013; Miao et al., 2018; Perera and Yúfera, 2016), reduced digestive enzyme activity (Lilleeng et al., 2007), brush border enzyme activity and nutrient transport (Santigosa et al., 2011; Venold et al., 2013) can be direct or indirect consequences of anti-nutritional factors on immunity and metabolism (Geay et al., 2011). A possible solution to mitigate the unwanted effects of SBM, and currently being tested, is the use of some additives in diets (Bravo-Tello et al., 2017; Refstie et al., 2010; Santos et al., 2019; Ulloa et al., 2016).

Microalgae are promising aquafeed ingredients, as they present a good nutritional composition and promote improvements in the fish immune response (Reyes-Becerril et al., 2013; Sarker et al., 2018). In addition, they have a high protein content (50-70%), contain a good amino acid profile and have compounds with antioxidant and immunostimulating action, such as β -1,3-glucan and metabolism modulators (Becker, 2007; Dawczynski et al., 2007; Shi et al., 2017; Xu et al., 2014). Among the various

species of microalgae, *Chlorella* sp has been used as a source of dietary protein for marine and freshwater fish, as it causes an improvement in weight gain and meat quality (Gouveia et al., 2002; Nakagawa et al., 1983; Xu et al., 2014). However, little is known about the effects caused by the inclusion of *Chlorella* sp on reproductive performance of fish.

Zebrafish (*Danio rerio*) are a well-established animal model in several areas of research, such as developmental biology, aquaculture and toxicology (Bergeron et al., 2008; Ulloa et al., 2014). Among advantageous characteristics of this species, we can mention the rapid growth, high fecundity and embryonic transparency (Harper and Lawrence, 2011). However, the nutritional requirements of zebrafish, especially from breeders, still require attention as they are not fully understood (Martins et al., 2020; Varga et al., 2018). Inadequate nutrition can induce undesirable effects on growth, health and reproductive performance of these animals. In addition, lack or excess of nutrients and types of food ingredients can cause physiological and molecular changes and must be carefully evaluated, since interpretation of results, depending on the research developed, can be affected (Martins et al., 2020). Therefore, meeting nutritional requirements and evaluating different food ingredients can improve growth and reproductive performance of zebrafish. Furthermore, a balanced diet can improve health and physiological status, mitigating possible undesirable effects on fish, thus allowing to obtain more consistent results (Fernandes et al., 2016).

The aim of this study was to evaluate the potential of *Chlorella* sp as a substitute for FM in high-plant-protein-diets for zebrafish and its effects on growth, reproductive performance, and physiological and digestive parameters.

2 Material and Methods

2.1. Ethical statement

All experimental procedures in this study were carried out in strict accordance with the Federal University of Lavras - UFLA Animal Experimentation Ethics Committee, Lavras, MG, Brazil, under No. 108/18 and meets the guidelines of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) for care and use of laboratory animals.

2.2 Experimental diets

Six practical isonitrogenous (330 g/kg crude protein) and isoenergetic (16.7 MJ/kg crude energy) diets were formulated and prepared in the laboratory (Table 1). The crude protein requirement values were the same as those proposed by O'Brine et al. (2015). In the present study the control diet formulation was prepared based on the control diet used by Schneider et al. (2014). This diet was chosen due to the low level of FM (50 g/kg) and SBM as the main protein source.

Table 1. Ingredients (g kg⁻¹) and proximal composition (wet weight) of zebrafish (*Danio rerio*) juvenile diets containing increasing *Chlorella* sp levels replacing fish meal.

Ingredients ¹	Diet designation (g/kg fish meal replacement)					
	CM0	CM10	CM20	CM30	CM40	CM50
Fishmeal	50	40	30	20	10	0
<i>Chlorella</i> sp	0	10	20	30	40	50
Soybean meal	594	593.3	594.4	595.5	597	598
Corn meal	311	323.4	318.2	313	308	302
Dicalcium phosphate	26	22.1	23.5	24.8	26	27.4
Premix ³	5	5	5	5	5	5
Salt	5	5	5	5	5	5
Soy oil	4	0.5	3	5	7.8	10.3
Limestone	3	0.3	0.6	1	1.37	1.74
BHT ⁴	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Analyzed composition %						
Dry-matter	88.7	88.7	87.8	89.9	88.4	88.3
Crude protein	32.3	32.7	31.9	32.5	32.2	31.6
Ether extract	3.42	3.46	2.5	2.9	2.33	2.57
Ash	8.7	9.3	7.44	8.23	9.4	10

¹All ingredients were obtained from a local commercial source.

²Proximate composition (Dry-matter basis, g/kg): Dry-matter 859; crude protein 664; ether extract 39.7; ash 51.3.

³Guaranteed vitamin and mineral supplement levels per kilogram of product: vit. A = 1,200,000 IU; vit. D3 = 200,000 IU; vit. E = 12,000 mg; vit. K3 = 2400 mg; vit. B1 = 4,800 mg; vit. B2 = 4,800 mg; vit. B6 = 4,000 mg; vit. B12 = 4,800 mg; folic acid = 1,200 mg; calcium pantothenate = 12,000mg; vit. C = 48,000 mg; biotin

= 48 mg; choline = 65,000 mg; niacin = 24,000 mg; Fe = 10,000 mg; Cu = 6,000 mg; Mn = 4,000 mg; Zn = 6,000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; Se = 20 mg.

⁴BHT = butyl hydroxy toluene.

⁵Diets were analyzed at the ESALQLAB (Universidade de São Paulo).

Diets contained varying FM levels (50, 40, 30, 20, 10 and 0 g/kg), replaced by increasing powdered CM levels (0, 10, 20, 30, 40 and 50 g/kg) (Paversul, RS, BRA). The ingredients were ground in a knife and hammer mill through a 0.3 mm sieve and subsequently mixed and extruded using 4-6 mm extruders (Inbramaq®, Labor PQ30, SP, BRA). After extrusion, the feeds were dried in a circulating oven (55 °C/12 h), ground to an appropriate size and kept at -20 °C until use. The proximal composition of diets and microalgae (Table 1) were analyzed according to AOAC methodologies (2005), for crude protein (Method 968.05), ether extract (Method No. 960.39) moisture (Method 930.15) and ash (Method 942.05).

2.2. Zebrafish origin and maintenance

The fish were maintained at the Central UFLA Animal House, where all experimental phases were performed. Wild type male and female zebrafish juveniles at 30 days post-fertilization (dpf) were kept in two 500 L polyethylene water tanks coupled to a recirculation system and fed twice a day for two weeks with a flocculated commercial feed containing 45% crude protein and 5% crude fat (Alcon basic, Alcon Pet®, SC, BRA). After reaching an average initial weight of 163 ± 2.9 mg, the animals were transferred to the experimental system consisting of thirty 3 L polycarbonate aquariums. (11.5 cm × 34.5 cm × 15.5 cm), connected to a species-specific rack (Hidrur Rack, model ZEB-40, Alesco, SP, BRA), with automated temperature, pH and conductivity controls. Aquarium water was gravity-flowed to the sump filter tank, consisting of three polypropylene bag filters for filtering 100µm particles, and three felt filters for retaining 50µm particles. The water subsequently flowed through a biological filter containing bioballs and ceramic

rings and then pumped into an ultraviolet light chamber before returning to the aquaria. A 14h: 10h light/dark photoperiod was established throughout the test. The supply water was filtered through a reverse osmosis system and then kept in a 50 L reservoir. Water quality temperature and pH parameters were measured daily, with means of 27.8 ± 0.6 °C and 7.4 ± 0.3 , respectively. Weekly measurements of dissolved oxygen and total ammonia averaged 7.9 ± 0.5 mg L⁻¹ and 0.09 ± 0.05 mg L⁻¹, respectively, all suitable for zebrafish reproduction.

Each experimental diet was randomly distributed among five replicated aquariums, and 15 fish were weighed and stocked in each aquarium. The animals were fed three times a day (8:00 AM, 11:00 AM and 3:00 PM) until apparent satiety for 60 days.

2.4 Performance and growth

At the end of the feeding trial, all fish from each tank were removed, anesthetized until reaching a deep anesthetic stage with benzocaine (250 mg L⁻¹) (Ross et al., 2008). After being anesthetized, fish were dried with paper towels, weighed individually with the aid of a precision digital scale and measured using a caliper. Final weight (FW), weight gain (WG), specific growth rate (SGR), daily feed intake (DFI), fork length (FL) and survival rate were determined for each tank using the following formula:

FW (mg) = Individual final wet weight.

WG (%) = ((Individual final wet weight - Individual initial wet weight) / Initial wet weight) *100.

SGR (%) = $100 (\ln W_2 - \ln W_1) / T_2 - T_1$.

DFI (%) = $100 \times (\text{total feed consumed}/\text{days})$.

FL (mm) = Measured from the tip of the snout to the end of the middle caudal fin rays.

Survival rate (%) = $100 \times (\text{final fish number}) / (\text{initial fish number})$.

Where W1 and W2 are the initial and final weight (mg), respectively and T2 – T1 is the number of days in the feeding period.

2.5 Biochemical parameters

After recording growth and performance parameters, 2 μL of blood were collected by caudal vein puncture (Castro et al., 2018) and the fish were then killed by beheading. Total plasma glucose was analyzed immediately using an active portable Accu-Check glucometer (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). The use of the human glucometer has been previously validated for use with zebrafish blood (Eames et al., 2010).

For the analysis of total cholesterol (TCHO), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL) and triglycerides (TG), whole-body samples from three fish per repetition (15 fish per treatment) were used. Fish homogenates were made as described by Sancho et al. (2009) for zebrafish juveniles. Each fish was homogenized individually with five volumes of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2 at 0 °C). Subsequently, the homogenates were centrifuged at 1666 g (4 °C) for 10 min and the resulting supernatants were diluted five times in buffer and tested quickly for determinations.

All biochemical determinations were performed according to method recommended by manufacturing company. The absorbance reading was performed using a microplate spectrophotometer (Biotek Epoch, Biotek, USA). The reading of each homogenate was performed in triplicate. The following parameters were determined: total cholesterol using CHOD-POD Bioclin (Ref. K083), triglycerides using GPO-POD Biotechnica kit (Ref. 10.010.00) and HDL and LDL were evaluated using Bioclin kits (Ref. K071 and K088, respectively).

2.6 Digestive enzyme activities

For enzymatic analyses, 12-h fasting zebrafish ($n = 10$) were collected from each treatment at the end of the test and anesthetized in a benzocaine bath (250 mg L^{-1}). The animals were dissected on an ice plate at $2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ using sterile insect pins and scalpels for individual use. Intact intestines were completely removed following the methodology described by Gupta and Mullins (2010), placed in 2 mL cryogenic tubes, frozen in liquid nitrogen and then stored in an ultra-freezer at $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis.

Intestine homogenization was performed with ice cold buffer solution (100 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7.8 buffer with 0.1% Triton X-100 and 0.1 mmol L^{-1} EDTA) at a 4 mL buffer per 1 g of sample ratio. The homogenate was centrifuged for 30 min at 14,000 rpm and $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and the supernatants were collected and stored at $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ until lipase and amylase analysis, while the remainder was kept for alkaline phosphatase analyses and purified according to Gisbert et al. (2018). All enzymatic assays were performed in triplicate and determined in a microplate reader spectrophotometer (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Total protein concentrations protein in the samples were determined by the Bradford method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976). Specific amylase activity was determined at 660 nm at $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, lipase was measured at 410 nm at $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and alkaline phosphatase activity was measured at 405 nm at $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, performed using commercial Bioclin kits (ref. k003, k025 and k021 respectively), following the manufacturer's recommendations.

2.7 Spawning trials

After the feeding test, 15 females and 15 mature males were randomly separated, totaling 30 animals per treatment. Of this total, 10 animals (5 females and 5 males) were allocated to aquariums, comprising triplicated groups for each dietary treatment to assess the reproductive performance. The animals were kept according to the above-described conditions for the growth test, differing only by the presence of a central perforated

partition for the physical separation between females and males in each aquarium. The animals were kept in these aquariums for three weeks. During this period, each dietary group was mated once a week.

The night before mating, males and females (1: 1 ratio) were housed separately in spawning aquariums (ZebClean, Alesco, SP, Brazil) with system water. The following morning, with the beginning of the light period, the dividers were removed from each aquarium to allow mating. The interaction of fish corresponded to a period of 2 to 3 hours. The eggs were collected at the bottom of each spawning tank and total production of each replica was counted. Subsequently the eggs were classified and separated as good, opaque and with abnormalities. The classification was performed using an optical light microscope (Motic BA310E, Richmond, BC, Canada) with an expansion of 40 X. The fertilized eggs were placed in embryonic egg water (0.6 g/L aquarium salt in reverse osmosis water + 0.01 mg/L methylene blue), sorted into 50 eggs per petri dish (90 mm diameter, 15 mm height) and kept in an incubator (Galindo-Villegas et al., 2012; Guimarães et al., 2018). Daily debris and dead embryos were removed from the petri dishes. For each spawning test the same procedures were adopted and a seven-day period was established for each event.

The parameters analyzed were as follows:

Average egg production per female = total amount of eggs/number of females.

Fertilization rate (%) = (number of eggs fertilized/average number of eggs per female).

Hatching rate (%) = (total number of eggs hatched /average number of fertilized eggs) x 100.

Larval survival (%) = total number of larvae at 6 dpf/ total number of hatched embryos.

2.8 Statistical analyses

Data normality (Shapiro-Wilk test) and homoscedasticity (Levene test) were verified. Data expressed as a percentage have been transformed into arcsine, but are presented as unprocessed data. Subsequently, data were submitted to regression analysis to assess the effect of replacing FM with CM, using the coefficient of determination (R^2) as a criterion to obtain an adequate biological result (Bhujel, 2008; Perez-Velazquez et al., 2019). In cases where a high variation was observed in linear regression models, data were subjected to analysis of variance (ANOVA) at a significance level of 0.05. Similarly, biochemical, enzymatic, and reproductive parameters were submitted to ANOVA. When significant differences were observed, the treatment means were differentiated using the Tukey HSD test. All analyzes were performed using the Minitab v.18 statistical software (State College, PA, USA).

3 Results

3.1. Growth performance

All diets were well accepted by zebrafish juveniles and survival rates were not affected by the assessed treatments. The effects of replacing FM with CM on growth performance were assessed using regression analysis. A significant relationship was observed only for FL ($P < 0.001$), but the coefficient of determination (R^2) was low (0.568). Since the linear regression model did not explain the effects of replacing FM with CM, ANOVA was performed, which revealed statistically significant differences in final weight (FW) and FL (Table 2). Juveniles fed up to 40 g/kg of CM in replacement of FM presented the highest FW when compared to the other treatments. However, WG (%), SGR (%) and DFI (%) were not significantly different between diets. Fish fed diets 30,

40 and 50 g/kg of CM showed significantly higher FL values than fish fed diets 0, 10, and 20 g/kg of CM (Table 2).

Table 2. Zebrafish (*Danio rerio*) juvenile performance and survival after being fed different levels of *Chlorella* sp replacing fishmeal for nine weeks.

Diet ^a	Growth parameters ^b						Survival (%)
	IW ¹ (mg)	FW ² (mg)	WG ³ (%)	SGR ⁴ (%)	DFI ⁵ (%)	FL ⁶ (mm)	
CM 0	160.98±1.1	407.53±5.8 ^b	153.12±2.3	1.55±0.0	2.4±0.2	24.4±0.1 ^{cd}	88.6±3.6
CM 10	163.35±1.4	430.61±9.0 ^{ab}	163.87±7.7	1.61±0.0	2.0±0.3	24.1±0.0 ^d	94.3±4.2
CM 20	162.99±1.0	416.44±1.9 ^{ab}	155.56±2.5	1.56±0.0	2.3±0.2	26.0±0.0 ^{bc}	88.6±2.9
CM 30	163.98±1.0	416.80±5.6 ^{ab}	154.27±4.6	1.55±0.0	2.3±0.1	27.5±0.1 ^{abc}	88.6±2.9
CM 40	162.93±0.8	439.83±2.5 ^a	170.02±2.9	1.66±0.0	2.2±0.2	27.1±0.1 ^{ab}	87.1±3.5
CM 50	163.64±2.2	422.68±7.1 ^{ab}	158.39±4.2	1.58±0.0	2.0±0.1	29.0±0.1 ^a	91.5±2.7
P-Value	0.688	0.011	0.092	0.090	0.628	<0.001	0.681

^aDietary *Chlorella* sp.

^bData are expressed as means ± SEM. Columns superscripted by different letters are significantly different (P < 0.05).

¹ Initial weight.

² Final weight.

³ Weight gain.

⁴ Specific growth rate.

⁵ Daily feed intake.

⁶ Fork length.

3.2 Biochemical Parameters

TCHO levels were significantly lower in the 50 and 40 g/kg CM treatments when compared to other treatments. Furthermore, no significant differences were observed in the levels of TCHO in 0, 10, 20 and 30 g/kg CM treatments. (Table 3). On the other hand, the highest HDL level was observed in the 50 g/kg CM treatment, differing significantly from the other treatments (Table 3). LDL and TG were significantly higher in 0 g/kg CM treatment when compared to the 50 g/kg treatment (Table 3). On the other hand, a

significant reduction in LDL levels was observed in CM30, CM40 and CM50 treatments when compared to fish fed CM0, CM10 and CM20 diets (Table 3).

Table 3. Effect of fish meal replacement by *Chlorella* sp on biochemical zebrafish (*Danio rerio*) juvenile parameters after feeding for nine weeks.

<i>Diet</i> ^a	Metabolites^b				
	TCHO¹	HDL²	LDL³	TG⁴	Glucose⁵
CM 0	2.6±0.1 ^a	1.1±0.0 ^{bc}	1.5±0.0 ^a	1.2±0.0 ^a	2.7±0.1
CM 10	2.5±0.0 ^a	1.0±0.0 ^d	1.2±0.1 ^{ab}	1.1±0.0 ^a	2.8±0.1
CM 20	2.5±0.1 ^a	1.1±0.0 ^{cd}	1.4±0.1 ^a	1.1±0.0 ^a	2.8±0.2
CM 30	2.5±0.1 ^a	1.2±0.0 ^b	0.9±0.1 ^b	1.1±0.0 ^a	2.7±0.1
CM 40	2.4±0.1 ^{ab}	1.2±0.0 ^b	1.0±0.0 ^b	1.0±0.0 ^{ab}	2.7±0.1
CM 50	2.1±0.1 ^b	1.3±0.0 ^a	0.9±0.0 ^b	0.9±0.0 ^b	2.8±0.1
P-Value	0.005	<0.001	<0.001	0.004	0.956

^a Dietary *Chlorella* sp., in g/kg.

^b Data are expressed as means ± SEM. Columns superscripted by different letters are significantly different (P < 0.05).

¹TCHO: Cholesterol total (mmol L⁻¹).

²HDL: High-density lipoprotein (mmol L⁻¹).

³LDL: Low-density lipoprotein (mmol L⁻¹).

⁴TG: Triglyceride (mmol L⁻¹).

⁵ Glucose (mmol L⁻¹).

3.3 Enzymatic activities

Lipase and amylase were not affected by FM replacement by *Chlorella* sp. in any of the treated groups. In contrast, a significant increase in alkaline phosphatase activity with increasing dietary CM was observed, where fish fed 20, 30, 40 and 50 g/kg CM presented the highest alkaline phosphatase activity values when compared to animals fed 0 g/kg CM (Table 4).

Table 4. Digestive enzymatic activities (U mg⁻¹ protein) in zebrafish (*Danio rerio*) intestines after being fed different *Chlorella* sp levels replacing fishmeal for nine weeks.

<i>Diet</i> ^a	Enzymatic activity U mg⁻¹ protein		
	Lipase	Amylase	Alkaline phosphatase
CM 0	3.5±0.3	82.8±4.6	39.59±0.5 ^b
CM 10	3.5±0.4	79.9±2.6	54.25±2.4 ^{ab}
CM 20	3.0±0.1	72.9±0.8	61.92±7.2 ^a

CM 30	3.6±0.3	72.6±4.3	58.41±2.7 ^a
CM 40	3.5±0.5	69.1±1.0	56.66±1.7 ^a
CM 50	3.2±0.1	74.5±2.0	61.83±2.1 ^a
P-Value	0.80	0.056	0.006

^aDietary *Chlorella* sp, in g/kg

Data are expressed as means ± SEM. Columns superscripted by different letters are significantly different (P < 0.05).

3.4 Reproductive performance

Egg production per female zebrafish varied from 61.64 to 116.55. Significantly higher values of egg production per female were obtained from fish fed the CM40 and CM50 diets when compared to CM0, CM10 and CM20 g/kg CM diets (Fig. 1A). On the other hand, no significant difference was observed in egg production per female in the CM0, CM10 and CM20 groups (Fig. 1A). There were no significant differences in fertilization rate in any of the dietary groups (Fig. 1B).

Hatching rate showed values ranging from 60.22 to 80.49%. The highest hatching rate was observed in fish fed CM50 diet, but they were statistically similar to those of fish fed CM20, CM30 and CM40 diets (Fig. 1C). The lowest hatching rate was observed in the CM0 and CM10 groups, which were significantly lower than CM50 group (Fig. 1C). Survival rate of larvae from fish fed CM40 and CM50 diets was significantly higher when compared to the larvae of animals fed CM0 diet, however, they were statistically similar to those of fish fed other diets (Fig. 1D).

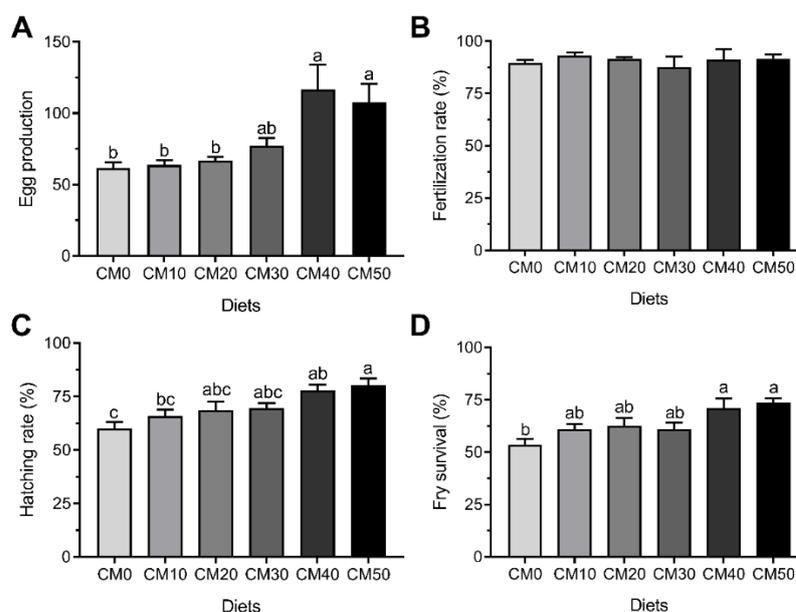


Fig. 1. Egg production (A), fertilization rate % (B), hatching rate % (C) and fry survival % (D) for each diet group. Error bars represent standard error of the mean. Different letters indicate between-group differences at $p < .05$ as indicated by the Tukey post hoc test.

4 Discussion

Fish fed diets containing 40g/kg and 50g/kg CM presented higher growth responses (FW and FL, respectively) when compared to diets with no CM. This improvement can be attributed to the presence of phytonutrients present in *Chlorella* sp., such as *Chlorella* growth factor (CGF), which is rich in free amino acids, peptides, glycoproteins and phytohormones, as well as some vitamins and minerals (An et al., 2016; Kotrbáček et al., 2015). The results reported herein were consistent with previous studies, which indicate that the inclusion of dietary *Chlorella* sp improves the growth of different fish species. Previous research has shown the inclusion of 20-40 g/kg *Chlorella* sp in diets for crucian carp (*Carassius auratus*) increased food consumption and growth and reduced feed conversion ratio (Luo et al., 2018; Shi et al., 2017). An increase in growth performance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed diets containing between 100 and 150 g/kg *Chlorella vulgaris* was observed (Rahimnejad et al., 2017). However, some

authors have observed that inclusion of microalgae in diet of carnivorous fish did not have visible effects on growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Güroy et al., 2012). Moreover, a slight reduction in protein digestibility was observed in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing algae (Norambuena et al., 2015). These divergences can be attributed to differences in eating habits of each fish species. This is because herbivorous and/or omnivorous species have greater amylase activities, which can contribute to improving the digestion efficiency of algae (Hidalgo et al., 1999; Montgomery and Gerking, 1980). Another possible explanation may be due to the *C. vulgaris* inclusion decreases n-3/n-6 fatty acid ratio, as reported by Tibbetts et al. (2017). Changes in n-3/n-6 ratio can directly affect lipid digestibility of many cold-water fish, since n-3 PUFA (n-3 polyunsaturated fatty acids) is better digested by these animals when compared to its n-6 counterpart (Bandarra et al., 2011; Eroldoğan et al., 2013).

In this study, SGR ranged from 1.55 to 1.66%. No significant effect of FM replacement by CM on specific growth rates was observed, indicating that CM may be incorporated into juvenile zebrafish diets without compromising animal growth. The SGR reported herein are similar to those reported by other authors for zebrafish juveniles (Ahmadifar et al., 2019; O'Brine et al., 2015). The CM inclusion rates in the present study also had no effect on the DFI.

Feed intake for all groups was similar, indicating that the replacement of up to 50 g/kg FM with *Chlorella* sp. did not affect *D. rerio* juvenile palatability. This result is consistent with the results reported by Tibbetts et al. (2017), who worked with diets containing up to 300 g/kg *Chlorella vulgaris* for Atlantic salmon juveniles. Luo et al. (2018) observed an increase in feed intake with the inclusion of up to 40 g/kg *Chlorella* sp. in crucian carp (*C. auratus*) juveniles. However, other researchers have reported that

microalgae may present palatability problems, leading to decreased feed intake. For example, up to 40% feed intake reduction has been reported for Atlantic cod (*Gadus morhua*) when receiving diets containing 140 g/kg green microalgae (*Nannochloropsis* sp. and *Isochrysis* sp. Mix) (Walker and Berlinsky, 2011). Decreased palatability has also been reported in other monogastric species, such as poultry and swine (Gatrell et al., 2014). These results suggest that palatability problems are related to different animal species used in different experiments (Hasan and Chakrabarti, 2009; Qiao et al., 2019).

Dietary microalgae supplementation may influence physiological fish conditions, including lipid metabolism (Mustafa and Nakagawa, 1995; Xu et al., 2014). In the present study, the lowest TCHO, LDL and TG concentrations were found in animals fed the highest microalgae levels compared to those fed no CM. Similar results were observed by Rahimnejad et al. (2017), who reported a significant reduction in serum cholesterol level in Japanese flounder (*P. olivaceus*) fed up to 150 g/kg *C. vulgaris*. A similar cholesterol lowering trend was observed in crucian carp (*C. auratus*) fed diets supplemented with 160 - 200 g/kg *Chlorella* powder (Xu et al., 2014) and in juvenile ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Nakagawa et al., 1983; Nematipour et al., 1990). The results obtained in this study provide evidence that dietary 50 g/kg CM may stimulate lipid metabolism functions in zebrafish, as different CM levels decreased TCHO levels without affecting blood glucose levels. Decreased serum lipid levels may be due to the presence of water-soluble fibers, vegetable protein, phospholipids, vitamin C, vitamin E and beta carotene present in *Chlorella* sp (Kay and Barton, 1991). Another possible blood lipid reduction mechanism may be due to *Chlorella* sp acting in reducing intestinal tract fat absorption, as reported by Cherng and Shih (2005) and Sano et al. (1988). Overall, the present results suggest that the presence of phytosterols in *Chlorella* sp induces hypocholesterolemic effects (Luo et al., 2015).

Digestive enzymes play a fundamental role in the digestion process and are directly correlated to dietary fish nutritional status and adaptability to change (Ahmadifar et al., 2019; Engrola et al., 2007; Gisbert et al., 2009). Fish are able to modulate digestive enzymatic activities as a response to food sources and dietary nutrient concentrations (Santigosa et al., 2008). Dietary CM inclusion had no significant effects on amylase and lipase activities in juvenile zebrafish intestinal tracts. Similar results were reported by Vizcaíno et al. (2014) in seabream juveniles (*Sparus aurata*), fed different *Scenedesmus almeriensis* levels. On the other hand, increased alkaline phosphatase activities were observed with increasing CM concentrations. Alkaline phosphatase plays an important role in the intestinal epithelium digestive processes, allowing for amino acid absorption or transport by enterocytes (Vizcaíno et al., 2014; Zambonino Infante and Cahu, 2001). The increase in alkaline phosphatase activity observed for diets containing over 20 g/kg CM may have contributed to improve the overall efficiency of zebrafish juvenile digestive and absorptive processes.

One of the main objectives of zebrafish husbandry is the development of breeding stock to ensure a consistent supply of viable embryos (Fowler et al., 2019). Obtaining quality gametes and success in the initial farming of larvae obtained is markedly dependent on the adequate nutrition of breeders (Fernández-Palacios et al., 2011). Diet composition significantly affects reproductive performance of zebrafish in terms of egg production, hatching rate and larval survival (Martins et al., 2020; Monteiro et al., 2018). In the present study we observed that the replacement of 80 and 100% of FM by CM significantly increased the larval survival and hatching rate. In addition to providing an increase in egg production by females at a rate of 1.74-1.89 times compared to that observed in animals in the CM0 group. Similar results to the present study were reported for yellow tail cichlid (*Pseudotropheus acei*), which showed a significant increase in the

egg production and hatching rate when fed *Spirulina* inclusion up to 10% in the diet compared to fish fed without microalgae (Güroy et al., 2012). In another study, James et al. (2006) reported that *Spirulina* inclusion of 8% promoted an increase in the reproductive performance of swordtail (*Xiphophorus helleri*).

Lipids, proteins, fatty acids, vitamins E and C and carotenoids are the main nutrients that influence many processes of teleost reproduction, such as fertility, fertilization, incubation and larval development (Fernández-Palacios et al., 2011; Izquierdo et al., 2001). In the present study, nutritional composition of the diets was kept consistent, differing only in protein source (FM or CM). However, due to differences in nitrogen levels present in protein sources used (FM or CM) for diets to remain isocaloric, crude fat content showed a small variation ($\pm 1.13\%$, table 1). We cannot discard that the difference in fat level also influences growth and reproductive performance of animals. Although previous studies suggest that an increase in dietary fat content may increase egg production in zebrafish (Markovich et al., 2007), however, this effect was not observed in the present study. On the other hand, James et al. (2006) reported that *Spirulina* in diet increased reproductive performance of red swordtail (*X. helleri*). Furthermore, inclusion of *Spirulina* up to 2.5% in diet for yellow tail cichlid (*Pseudotropheus acei*) increased total egg production and hatching rate (Güroy et al., 2012). However, the mechanisms responsible for the increase in reproductive performance, caused by microalgae are not fully understood, but some authors have reported that improvement in fish reproduction can be modulated by the presence of carotenoids in the diet (Maoka, 2011; Nakano et al., 1999). Thus, in order to understand the possible effects of microalgae on maturation and biochemical composition of eggs during spawning, studies on zebrafish breeders should be investigated.

5 Conclusions

Levels of 40 and 50 g/kg of CM replacing FM for 60 days promoted greater growth, number of eggs and survival of zebrafish spawn. In addition, 50 g/kg of CM decreases total cholesterol level, which may suggest the use of *Chlorella* to improve these fish health. Since feed consumption of zebrafish is very low, the higher levels of CM inclusion (40 and 50 g/kg) in this study are financially justified. CM offers great potential for inclusion in practical diets for zebrafish juveniles and this preliminary study provides support for future research to identify the bioactive compounds present in *Chlorella* sp and their effects on other species used in aquaculture.

Acknowledgments

The authors thanks Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), grant number 304940/2014-3 and 142263/2016-8; the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Rede Mineira de Bioterismo-FAPEMIG for financial support.

References

- Ahmadifar, E., Sheikhzadeh, N., Roshanaei, K., Dargahi, N., Faggio, C., 2019. Can dietary ginger (*Zingiber officinale*) alter biochemical and immunological parameters and gene expression related to growth, immunity and antioxidant system in zebrafish (*Danio rerio*)? *Aquaculture* 507, 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.049>
- An, B.K., Kim, K.E., Jeon, J.Y., Lee, K.W., 2016. Effect of dried *Chlorella vulgaris* and *Chlorella* growth factor on growth performance, meat qualities and humoral immune responses in broiler chickens. *Springerplus* 5, 718. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2373-4>
- AOAC, 2005. Official methods of analysis of AOAC International, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.
- Bandarra, N.M., Rema, P., Batista, I., Pousão-Ferreira, P., Valente, L.M.P., Batista,

- S.M.G., Ozório, R.O.A., 2011. Effects of dietary n-3/n-6 ratio on lipid metabolism of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 1332–1341. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100087>
- Becker, E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 25, 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>
- Bergeron, S.A., Milla, L.A., Villegas, R., Shen, M.C., Burgess, S.M., Allende, M.L., Karlstrom, R.O., Palma, V., 2008. Expression profiling identifies novel Hh/Gli-regulated genes in developing zebrafish embryos. *Genomics* 91, 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.09.001>
- Bhujel, R.C., 2008. *Statistics for {Aquaculture}*. John Wiley & Sons.
- Boyd, C.E., 2015. Overview of aquaculture feeds. *Feed Feed. Pract. Aquac.* 3–25. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100506-4.00001-5>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bravo-Tello, K., Ehrenfeld, N., Solís, C.J., Ulloa, P.E., Hedrera, M., Pizarro-Guajardo, M., Paredes-Sabja, D., Feijóo, C.G., 2017. Effect of microalgae on intestinal inflammation triggered by soybean meal and bacterial infection in zebrafish. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187696>
- Castro, T.F.D., da Silva Souza, J.G., de Carvalho, A.F.S., de Lima Assis, I., Palmieri, M.J., Vieira, L.F.A., Marcussi, S., Machado, M.R.F., Murgas, L.D.S., 2018. Anxiety-associated behavior and genotoxicity found in adult *Danio rerio* exposed to tebuconazole-based commercial product. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 62, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.06.011>
- Cherng, J.Y., Shih, M.F., 2005. Preventing dyslipidemia by *Chlorella pyrenoidosa* in rats and hamsters after chronic high fat diet treatment. *Life Sci.* 76, 3001–3013. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.055>
- Dawczynski, C., Schubert, R., Jahreis, G., 2007. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chem.* 103, 891–899. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.041>
- Eames, S.C., Philipson, L.H., Prince, V.E., Kinkel, M.D., 2010. Blood sugar measurement in zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis. *Zebrafish* 7, 205–213. <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0640>
- Engrola, S., Conceição, L.E.C., Dias, L., Pereira, R., Ribeiro, L., Dinis, M.T., 2007. Improving weaning strategies for Senegalese sole: Effects of body weight and digestive capacity. *Aquac. Res.* 38, 696–707. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01701.x>
- Eroldoğan, T.O., Yilmaz, A.H., Turchini, G.M., Arslan, M., Sirkecioğlu, N.A., Engin, K., Özşahinoğlu, I., Mumoğullarında, P., 2013. Fatty acid metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Effects of n-6 PUFA and MUFA in fish oil replaced diets. *Fish Physiol. Biochem.* 39, 941–955. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9753-7>

- Fernandes, H., Peres, H., Carvalho, A.P., 2016. Dietary protein requirement during Juvenile Growth of Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 13, 548–555. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1303>
- Fernández-Palacios, H., Norberg, B., Izquierdo, M., Hamre, K., 2011. Effects of Broodstock Diet on Eggs and Larvae, in: *Larval Fish Nutrition*. Wiley-Blackwell, pp. 151–181. <https://doi.org/10.1002/9780470959862.ch5>
- Fowler, L.A., Williams, M.B., Dennis-Cornelius, L.N., Farmer, S., Barry, R.J., Powell, M.L., Watts, S.A., 2019. Influence of Commercial and Laboratory Diets on Growth, Body Composition, and Reproduction in the Zebrafish *Danio rerio*. *Zebrafish* 16, 508–521. <https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1742>
- Galindo-Villegas, J., García-Moreno, D., De Oliveira, S., Meseguer, J., Mulero, V., 2012. Regulation of immunity and disease resistance by commensal microbes and chromatin modifications during zebrafish development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2605–E2614. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209920109>
- Gatlin, D.M., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: A review. *Aquac. Res.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x>
- Gatrell, S., Lum, K., Kim, J., Lei, X.G., 2014. Nonruminant nutrition symposium: Potential of defatted microalgae from the biofuel industry as an ingredient to replace corn and soybean meal in swine and poultry diets. *J. Anim. Sci.* 92, 1306–1314. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7250>
- Geay, F., Ferraresso, S., Zambonino-Infante, J.L., Bargelloni, L., Quentel, C., Vandeputte, M., Kaushik, S., Cahu, C.L., Mazurais, D., 2011. Effects of the total replacement of fish-based diet with plant-based diet on the hepatic transcriptome of two European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) half-sibfamilies showing different growth rates with the plant-based diet. *BMC Genomics* 12, 522. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-522>
- Gisbert, E., Giménez, G., Fernández, I., Kotzamanis, Y., Estévez, A., 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture* 287, 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.039>
- Gisbert, E., Nolasco, H., Solovyev, M., 2018. Towards the standardization of brush border purification and intestinal alkaline phosphatase quantification in fish with notes on other digestive enzymes. *Aquaculture* 487, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.004>
- Gouveia, L., Choubert, G., Pereira, N., Santinha, J., Empis, J., Gomes, E., 2002. Pigmentation of gilthead seabream, *Sparus aurata* (L. 1875), using *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Volvocales) microalga. *Aquac. Res.* 33, 987–993. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00751.x>
- Guimarães, I.G., Skjærven, K., Moren, M., Espe, M., Hamre, K., 2018. Dietary taurine supplementation in plant protein based diets do not affect growth and reproductive performance of zebrafish. *Aquac. Res.* 49, 2013–2022.

<https://doi.org/10.1111/are.13658>

- Gupta, T., Mullins, M.C., 2010. Dissection of organs from the adult zebrafish. *J. Vis. Exp.* e1717. <https://doi.org/10.3791/1717>
- Güroy, B., Şahin, I., Mantoğlu, S., Kayali, S., 2012. Spirulina as a natural carotenoid source on growth, pigmentation and reproductive performance of yellow tail cichlid *Pseudotropheus acei*. *Aquac. Int.* 20, 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10499-012-9512-x>
- Harper, C., Lawrence, C., 2011. *The Laboratory Zebrafish*, The Laboratory Zebrafish. Crc Press. <https://doi.org/10.1201/b13588>
- Hasan, M.R., Chakrabarti, R., 2009. Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture: a review., FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 531.
- Hedrera, M.I., Galdames, J.A., Jimenez-Reyes, M.F., Reyes, A.E., Avendaño-Herrera, R., Romero, J., Feijóo, C.G., 2013. Soybean Meal Induces Intestinal Inflammation in Zebrafish Larvae. *PLoS One* 8, e69983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069983>
- Hidalgo, M.C., Urea, E., Sanz, A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267–283. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00413-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00413-X)
- Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H., Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197, 25–42. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00581-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00581-6)
- James, R., Sampath, K., Thangarathinam, R., Vasudevan, I., 2006. Effect of dietary Spirulina level in growth, fertility, coloration and leucocyte count in red swordtail, *Xiphophorus helleri*, *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah*.
- Kay, R.A., Barton, L.L., 1991. Microalgae as Food and Supplement. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30, 555–573. <https://doi.org/10.1080/10408399109527556>
- Kotrbaček, V., Doubek, J., Doucha, J., 2015. The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. *J. Appl. Phycol.* 27, 2173–2180. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0516-y>
- Lilleeng, E., Froystad, M.K., Ostby, G.C., Valen, E.C., Krogdahl, A., 2007. Effects of diets containing soybean meal on trypsin mRNA expression and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 147, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.043>
- Luo, Z., Ye, H.M., Gao, Y., Ling, S.C., Wei, C.C., Zhu, X., 2018. Chlorella additive increased growth performance, improved appetite and immune response of juvenile crucian carp *Carassius auratus*. *Aquac. Res.* 49, 3329–3337. <https://doi.org/10.1111/are.13797>
- Maoka, T., 2011. Carotenoids in Marine Animals. *Mar. Drugs* 9, 278–293. <https://doi.org/10.3390/md9020278>
- Markovich, M.L., Rizzuto, N. V, Brown, P.B., 2007. Diet Affects Spawning in

- Zebrafish. *Zebrafish* 4. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.9993>
- Martins, G., Diogo, P., Santos, T., Cabrita, E., Pinto, W., Dias, J., Gavaia, P.J., 2020. Microdiet Formulation with Phospholipid Modulate Zebrafish Skeletal Development and Reproduction. *Zebrafish* 17, 27–37. <https://doi.org/10.1089/zeb.2019.1794>
- Miao, S., Zhao, C., Zhu, J., Hu, J., Dong, X., Sun, L., 2018. Dietary soybean meal affects intestinal homeostasis by altering the microbiota, morphology and inflammatory cytokine gene expression in northern snakehead. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18430-7>
- Monteiro, J., Martins, S., Farias, M., Costa, T., Certal, A., 2018. The Impact of Two Different Cold-Extruded Feeds and Feeding Regimens on Zebrafish Survival, Growth and Reproductive Performance. *J. Dev. Biol.* 6, 15. <https://doi.org/10.3390/jdb6030015>
- Montgomery, W.L., Gerking, S.D., 1980. Marine macroalgae as foods for fishes: an evaluation of potential food quality. *Environ. Biol. Fishes* 5, 143–153. <https://doi.org/10.1007/BF02391621>
- Mustafa, M.G., Nakagawa, H., 1995. A review: Dietary benefits of algae as an additive in fish feed. *Isr. J. Aquac.* 47, 155–162.
- Nakagawa, H., Kasahara, S., Uno, E., Minami, T., Akira, K., 1983. Effect of Chlorella-extract supplement on blood properties and body composition of ayu. *Aquac. Sci.* 30, 192–201. <https://doi.org/10.11233/aquaculturesci1953.30.192>
- Nakano, T., Kanmuri, T., Sato, M., Takeuchi, M., 1999. Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1426, 119–125. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00145-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00145-7)
- Nematipour, G.R., Nakagawa, H., Ohya, S., 1990. Effect of Chlorella-extract supplementation to diet on in vitro lipolysis in ayu. *Nippon SUISAN GAKKAISHI* 56, 777–782. <https://doi.org/10.2331/suisan.56.777>
- Norambuena, F., Hermon, K., Skrzypczyk, V., Emery, J.A., Sharon, Y., Beard, A., Turchini, G.M., 2015. Algae in Fish Feed: Performances and Fatty Acid Metabolism in Juvenile Atlantic Salmon. *PLoS One* 10, e0124042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124042>
- O’Brine, T.M., Vrtělová, J., Snellgrove, D.L., Davies, S.J., Sloman, K.A., 2015. Growth, Oxygen Consumption, and Behavioral Responses of *Danio rerio* to Variation in Dietary Protein and Lipid Levels. *Zebrafish* 12, 296–304. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1008>
- Pahlow, M., van Oel, P.R., Mekonnen, M.M., Hoekstra, A.Y., 2015. Increasing pressure on freshwater resources due to terrestrial feed ingredients for aquaculture production. *Sci. Total Environ.* 536, 847–857. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.124>
- Perera, E., Yúfera, M., 2016. Soybean Meal and Soy Protein Concentrate in Early Diet Elicit Different Nutritional Programming Effects on Juvenile Zebrafish. *Zebrafish* 13, 61–69. <https://doi.org/10.1089/zeb.2015.1131>

- Perez-Velazquez, M., Gatlin, D.M., González-Félix, M.L., García-Ortega, A., de Cruz, C.R., Juárez-Gómez, M.L., Chen, K., 2019. Effect of fishmeal and fish oil replacement by algal meals on biological performance and fatty acid profile of hybrid striped bass (*Morone chrysops* ♀ × *M. saxatilis* ♂). *Aquaculture* 507, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.011>
- Qiao, H., Hu, D., Ma, J., Wang, X., Wu, H., Wang, J., 2019. Feeding effects of the microalga *Nannochloropsis* sp. on juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Algal Res.* 41, 101540. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101540>
- Rahimnejad, S., Lee, S., Park, H., Choi, J., 2017. Effects of Dietary Inclusion of *Chlorella vulgaris* on Growth, Blood Biochemical Parameters, and Antioxidant Enzyme Activity in Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. World Aquac. Soc.* 48, 103–112. [https://doi.org/10.1111/JWAS.12320@10.1111/\(ISSN\)1749-7345.HARAPAC_2018](https://doi.org/10.1111/JWAS.12320@10.1111/(ISSN)1749-7345.HARAPAC_2018)
- Refstie, S., Baeverfjord, G., Seim, R.R., Elvebø, O., 2010. Effects of dietary yeast cell wall β -glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal. *Aquaculture* 305, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.04.005>
- Reyes-Becerril, M., Guardiola, F., Rojas, M., Ascencio-Valle, F., Esteban, M.Á., 2013. Dietary administration of microalgae *Navicula* sp. affects immune status and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Shellfish Immunol.* 35, 883–889. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2013.06.026>
- Ross, L.G., Ross, Barbara, Ross, Bryony, 2008. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*, Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals: Third Edition. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. <https://doi.org/10.1002/9781444302264>
- Sancho, E., Fernández-Vega, C., Villarroel, M.J., Andreu-Moliner, E., Ferrando, M.D., 2009. Physiological effects of triclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 150, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.02.004>
- Sano, T., Kumamoto, Y., Kamiya, N., Okuda, M., Tanaka, Y., 1988. Effect of lipophilic extract of *Chlorella vulgaris* on alimentary hyperlipidemia in cholesterol-fed rats. *Artery* 15, 217–24.
- Santigosa, E., García-Meilán, I., Valentin, J.M., Pérez-Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Gallardo, M.A., 2011. Modifications of intestinal nutrient absorption in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources in sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Aquaculture* 317, 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.026>
- Santigosa, E., Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., Gallardo, M.A., 2008. Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture* 282, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.007>
- Santos, K.O., Costa-Filho, J., Riet, J., Spagnol, K.L., Nornberg, B.F., Kütter, M.T., Tesser, M.B., Marins, L.F., 2019. Probiotic expressing heterologous phytase

- improves the immune system and attenuates inflammatory response in zebrafish fed with a diet rich in soybean meal. *Fish Shellfish Immunol.* 93, 652–658.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.030>
- Sarker, P.K., Kapuscinski, A.R., Bae, A.Y., Donaldson, E., Sitek, A.J., Fitzgerald, D.S., Edelson, O.F., 2018. Towards sustainable aquafeeds: Evaluating substitution of fishmeal with lipid-extracted microalgal co-product (*Nannochloropsis oculata*) in diets of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLoS One* 13, e0201315.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201315>
- Schneider, A.C.R., Machado, A.B.M.P., de Assis, A.M., Hermes, D.M., Schaefer, P.G., Guizzo, R., Fracasso, L.B., de-Paris, F., Meurer, F., Barth, A.L., da Silveira, T.R., 2014. Effects of *Lactobacillus Rhamnosus* GG on Hepatic and Serum Lipid Profiles in Zebrafish Exposed to Ethanol. *Zebrafish* 11, 371–378.
<https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0968>
- Shi, X., Luo, Z., Chen, F., Wei, C.-C., Wu, K., Zhu, X.-M., Liu, X., 2017. Effect of fish meal replacement by *Chlorella* meal with dietary cellulase addition on growth performance, digestive enzymatic activities, histology and myogenic genes' expression for crucian carp *Carassius auratus*. *Aquac. Res.* 48, 3244–3256.
<https://doi.org/10.1111/are.13154>
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2015. Feed matters: Satisfying the feed demand of aquaculture. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 23, 1–10.
<https://doi.org/10.1080/23308249.2014.987209>
- Tibbetts, S.M., Mann, J., Dumas, A., 2017a. Apparent digestibility of nutrients, energy, essential amino acids and fatty acids of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) diets containing whole-cell or cell-ruptured *Chlorella vulgaris* meals at five dietary inclusion levels. *Aquaculture* 481, 25–39.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.018>
- Tibbetts, S.M., Mann, J., Dumas, A., 2017b. Apparent digestibility of nutrients, energy, essential amino acids and fatty acids of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) diets containing whole-cell or cell-ruptured *Chlorella vulgaris* meals at five dietary inclusion levels. *Aquaculture* 481, 25–39.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.018>
- Ulloa, P.E., Medrano, J.F., Feijoo, C.G., 2014. Zebrafish as animal model for aquaculture nutrition research. *Front. Genet.* 5, 313.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00313>
- Ulloa, P.E., Solís, C.J., De La Paz, J.F., Alarent, T.G.S., Caruffo, M., Hernández, A.J., Dantagnan, P., Feijóo, C.G., 2016. Lactoferrin Decreases the Intestinal Inflammation Triggered by a Soybean Meal-Based Diet in Zebrafish. *J. Immunol. Res.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1639720>
- Varga, Z.M., Ekker, S.C., Lawrence, C., 2018. Workshop Report: Zebrafish and Other Fish Models - Description of Extrinsic Environmental Factors for Rigorous Experiments and Reproducible Results. *Zebrafish* 15, 533–535.
<https://doi.org/10.1089/zeb.2018.29006.zol>
- Venold, F.F., Penn, M.H., Thorsen, J., Gu, J., Kortner, T.M., Krogdahl, Å., Bakke, A.M., 2013. Intestinal fatty acid binding protein (*fabp2*) in Atlantic salmon (*Salmo*

- salar): Localization and alteration of expression during development of diet induced enteritis. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 164, 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.09.009>
- Vizcaíno, A.J., López, G., Sáez, M.I., Jiménez, J.A., Barros, A., Hidalgo, L., Camacho-Rodríguez, J., Martínez, T.F., Cerón-García, M.C., Alarcón, F.J., 2014. Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture* 431, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.010>
- Walker, A.B., Berlinsky, D.L., 2011. Effects of partial replacement of fish meal protein by microalgae on growth, feed intake, and body composition of Atlantic cod. *N. Am. J. Aquac.* 73, 76–83. <https://doi.org/10.1080/15222055.2010.549030>
- Xu, W., Gao, Z., Qi, Z., Qiu, M., Peng, J.Q., Shao, R., 2014. Effect of dietary chlorella on the growth performance and physiological parameters of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* 14, 53–57. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_1_07
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 130, 477–487. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(01\)00274-5](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(01)00274-5)

**ARTIGO 2 - Transcriptoma de zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com
spirulina (*Arthrospira platensis*)**

Scientific Journal:
Aquaculture
ISSN: 0044-8486
Impact Factor: 3.224
Elsevier

Transcriptoma de zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com spirulina (*Arthrospira platensis*)

William Franco Carneiro^a, Pamela Navarrete Ramírez^b, Mitzi Ernestina Juarez Gutierrez^b, Carlos Cristian Martínez Chávez^b, Carlos Antonio Martínez Palácios^b, Luis David Solis Murgas^{c*}

^aDepartamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^bInstituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México

^c Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

*Corresponding author: Murgas, L.D.S. ismurgas@ufla.br, Lavras-MG, Brasil.

Resumo

As microalgas ricas em proteínas são uma alternativa potencial à farinha de peixe em aquicultura. Neste estudo avaliou-se os efeitos da substituição da farinha de peixe (FM) por Spirulina (SM) no crescimento, desempenho reprodutivo e nas diferenças transcricionais de juvenis de Zebrafish (*Danio rerio*) por meio de sequenciamento de RNA (RNA-seq). Um total de 450 zebrafish foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos, com cinco repetições cada. As dietas experimentais continham níveis variados de farinha de peixe (50, 40, 30, 20, 10 e 0 g / kg) que foram substituídas por níveis crescentes de SM (0, 10, 20, 30, 40 e 50 g / kg). Após 60 dias de ensaios de alimentação, os animais alimentados com 50 g / kg de SM apresentaram um crescimento significativamente maior em comparação com os animais da dieta sem SM. Da mesma forma, animais alimentados com 50g /kg de SM apresentaram maior índice gonadossomático, produção de ovos por fêmea, taxa de fertilização e eclosão. A análise transcriptômica revelou um conjunto conciso de genes diferencialmente expressos nos peixes alimentados com 50 g/kg de SM, a maioria dos quais intrínsecos ao crescimento e diferenciação muscular. Além disso, o RNA-Seq revelou que os peixes alimentados com SM regularam positivamente a expressão dos genes relacionados ao sistema imune como *il4*, *il10*, *il15*, *cxcl12b*, *cxcr4b*, *cxcl12a* e *cxcl19*. Esses resultados serão úteis para compreender os efeitos da SM no crescimento e no sistema imune dos peixes.

Palavras-chave: Microalgas, aditivo alimentar, *Danio rerio*, RNA-Seq

1 INTRODUÇÃO

A farinha de peixe (FM) é amplamente utilizada como fonte de proteína na indústria aquícola. A FM possui um bom perfil de aminoácidos essenciais, ácidos graxos, minerais e baixo nível de fatores antinutricionais (Chiu et al., 2013; Nakagawa et al., 2007). Embora a produção mundial de farinha de peixe atinja um nível relativamente estável, a sua produção ainda não poderia corresponder à rápida expansão da aquicultura a nível global (Boyd, 2015; Tacon and Metian, 2015). Desse modo, há uma demanda crescente por mais informações sobre o potencial de fontes alternativas de proteína em substituição a FM em dietas formuladas.

A *Arthrospira platensis* (spirulina), é uma microalga azul-esverdeada (Cianobactéria) pertencente à família Oscillatoriaceae, amplamente distribuída em água doce e água do mar (Wu et al., 2016). Devido ao seu elevado teor de proteína (55-70%), composição aminoácídica, ácidos graxos e minerais a spirulina aparece como uma alternativa promissora à FM. Os efeitos benéficos da utilização de spirulina na alimentação de peixes foram avaliadas em algumas espécies de peixe, incluindo a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), carpa comum (*Cyprinus carpio*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Belal and Khalafalla, 2012; Ramakrishnan et al., 2008; Teimouri et al., 2013). Além disso, a spirulina possui alta atividade antioxidante e exerce uma variedade de atividades imunomoduladoras e anti-inflamatórias regulando citocinas-chave, incluindo interleucina (IL) -1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e fator de necrose tumoral (TNF) - α (Abdelkhalek et al., 2015; El Sheikh et al., 2014; Shokri et al., 2014). Devido a estas características, a spirulina também pode ser utilizada como um aditivo nas dietas, como forma de melhorar o crescimento e a saúde dos peixes.

O uso de aditivos na dieta dos peixes demonstrou ser um método altamente eficaz para aumentar a resistência e suprimir os efeitos adversos de substâncias tóxicas presentes nos sistemas de cultivo (Dawood et al., 2017; Taheri Mirghaed et al., 2019; Zhang et al., 2012). Além disso, a suplementação dietética com aditivos imunoestimulantes pode aumentar o crescimento, melhorar a resposta antioxidante e fortalecer o sistema imune dos peixes (Chakraborty and Hancz, 2011; Oliva-Teles, 2012; Vallejos-Vidal et al., 2016). Entretanto, os mecanismos pelos quais esses alimentos alteram o metabolismo e a capacidade imunológica não foram completamente elucidados. Com o advento do sequenciamento de RNA de nova geração (RNA-Seq) juntamente com o progresso no

sequenciamento de genomas de diferentes espécies de peixes, a implementação destas tecnologias pode ajudar a identificar os genes afetados pela nutrição e identificar as variantes genéticas que influenciam a resposta do organismo aos nutrientes (Ulloa et al., 2014; Wang et al., 2009).

Uma forma de contornar estes problemas é a utilização do zebrafish (*Danio rerio*) como um modelo animal para ensaios com diferentes dietas experimentais (Ribas and Piferrer, 2014; Ulloa et al., 2014, 2011). O zebrafish cumpre em grande parte as condições necessárias para um bom modelo de peixes para pesquisas em aquicultura, conforme o descrito por Ribas e Piferrer (2014). Portanto, objetivamos avaliar os efeitos da substituição da FM por spirulina na dieta do zebrafish no crescimento e no desempenho reprodutivo do zebrafish. Além disso, uma abordagem de sequenciamento de RNA foi empregada para entender melhor os efeitos da spirulina nas dietas do zebrafish.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Comissão de Ética no Uso de Animais

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram realizados em estrita conformidade com as normas institucionais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil, sob o protocolo nº 108/18 e atende às diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para o cuidado e uso de animais de laboratório.

2.2. Origem e manutenção do zebrafish

Um total de 450 juvenis de zebrafish (WT zebrafish short -fin) de origem heterogênea e de ambos os sexos, foram obtidos de um distribuidor local (Ecofish, Muriaé-MG, Brasil). Os juvenis com 30 (dpf) mantidos no Biotério Central da UFLA, onde foram realizadas as fases experimentais. Desde a primeira alimentação até o início do ensaio, os peixes foram criados em um sistema de recirculação de água (RAS), conforme descrito por Carneiro et al. (2020). Após duas semanas de aclimação, os juvenis com 160.14 ± 1.09 mg de peso corporal médio, foram transferidos para o sistema experimental, constituído de trinta aquários de polycarbonato de 3 L (11.5 cm×34.5 cm × 15.5 cm), ligados em um rack específico para a espécie (Rack Hidrus, modelo ZEB-40, Alesco, SP, BRA). Os aquários eram acoplados em um RAS com controle automatizado de temperatura, pH e condutividade. A água dos aquários fluía por gravidade para o

tanque de filtragem, constituído por três filtros *bag* em polipropileno para filtrar partículas de 100µm, e três filtros de feltro para retenção de partículas com 50µm. Posteriormente a água fluía para um filtro biológico com *bioballs* e anéis de cerâmica de onde era bombeada para uma câmara com luz ultravioleta antes de retornar para os aquários. Durante todo o ensaio de crescimento os peixes foram mantidos sob uma luz artificial com ciclo de 14h luz/10h escuro. A temperatura média foi mantida em uma média de 27,8 ± 0,6 ° C, pH 7,4 ± 0,3, os compostos nitrogenados permaneceram em níveis residuais.

2.3 Dietas experimentais

Seis dietas isoproteicas e isoenergéticas foram formuladas para conter diferentes níveis de substituição da FM por *Arthrospira platensis* (SM). Até 100% da FM foi substituída por SM, nos níveis de 0 (SM0), 10 (SM1), 20 (SM2), 30 (SM3), 40 (SM4) e 50 (SM5) g/kg das dietas (Tabela 1). Os valores para a exigência de proteína bruta, foram os mesmos propostos por O’Brine et al. (2015). A composição proximal das dietas e da SM (Tabela 1) foram analisadas de acordo com a metodologia preconiza pela AOAC (2005), para proteína bruta (Method 968.05), extrato etéreo (Method nº 960.39) umidade (Method 930.15) e cinzas (Method 942.05).

Tabela 1. Ingredientes (g kg⁻¹) e composição proximal (peso úmido) de dietas para juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) com níveis crescentes de Spirulina em substituição a farinha de peixe.

Ingredientes ¹	Diet designation (g/kg fish meal replacement)					
	SM0	SM1	SM2	SM3	SM4	SM5
Farinha de peixe	50	40	30	20	10	0
Farelo de soja	594	592	591	588	587	586
Spirulina	0	10	20	30	40	50
Farelo de milho	315	321	320	318	317	316
Fosfato bicálcico	26	22	24	25	26	28
Premix ³	5	5	5	5	5	5
Sal	5	5	5	5	5	5
Calcário	3	4	6	7	9	10
BHT ⁴		5	5	5	5	5
Analyzed composition, g/ kg						
Dry matter	887	886	879	889		889
Crude protein	323	322	321	325		326
Ether extract	34	53	41	42		48
Ash	67	66	57	65		72

¹All ingredients were obtained from a local commercial source. ²Proximate composition (Dry-matter basis, g/kg): Dry-matter 877; crude protein 723; ether extract 29.5; ash 47. ³Guaranteed vitamin and mineral supplement levels per kilogram of product: vit. A = 1,200,000 IU; vit. D3 = 200,000 IU; vit. E = 12,000 mg; vit. K3 = 2400 mg; vit. B1 = 4,800 mg; vit. B2 = 4,800 mg; vit. B6 = 4,000 mg; vit. B12 = 4,800 mg; folic acid = 1,200 mg; calcium pantothenate = 12,000mg; vit. C = 48,000 mg; biotin = 48 mg; choline = 65,000 mg; niacin = 24,000 mg; Fe =10,000 mg; Cu = 6,000 mg; Mn = 4,000 mg; Zn = 6,000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; Se = 20 mg. ⁴BHT = butyl hydroxy toluene. ⁵Diets were analyzed by the ESALQLAB (Universidade de São Paulo).

As dietas foram distribuídas aleatoriamente para os seis grupos, cada grupo contendo cinco repetições com 15 animais por réplica. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente três vezes ao dia (8h, 11h e 15h), por um período de 60 dias.

2.4 Desempenho e crescimento

No final do ensaio de crescimento, todos os peixes de cada tanque foram retirados e, após a anestesia em banho de benzocaína (250 mg L^{-1}) (Ross e Ross, 2008), foram pesados e medidos individualmente. O peso final (FW), ganho de peso (WG), taxa de crescimento específico (SGR), consumo alimentar diário (DFI), comprimento padrão (BL) e taxa de sobrevivência foram determinados para cada tanque usando a seguinte fórmula:

PF (mg) = Peso final individual seco.

GP (%) = $((\text{Peso final individual seco} - \text{Peso inicial individual seco}) / \text{Peso inicial seco}) * 100$.

TCE (%) = $100 (\text{Ln } W_2 - \text{Ln } W_1) / T_2 - T_1$.

CA (%) = $100 \times (\text{Consumo total de alimento/dias})$.

Taxa de sobrevivência (%) = $100 \times (\text{número final de peixes}) / (\text{número inicial de peixes})$.
Onde: W_1 e W_2 são o peso inicial e peso final (mg) respectivamente; $T_2 - T_1$ são o número de dias de experimento.

2.5 Biblioteca de cDNA, sequenciamento e processamento de dados

Para as análises de RNA-Seq foram considerados os peixes do grupo controle e do grupo SM5, sendo cada grupo constituído por três repetições. A escolha destes grupos deve-se a análise preliminar dos resultados de crescimento. Como o grupo SM5 apresentou os melhores resultados decidimos avaliar as diferenças na expressão dos genes entre este grupo e o grupo dos peixes que não receberam SM.

Foram coletados dois animais por réplica, representando seis peixes por grupo, e seguidamente cada amostra foi armazenada em RNA-Later (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Após um período *overnight* os tubos contendo as amostras e o RNA-Later foram armazenados a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ até as análises posteriores. O RNA foi isolado usando o kit Omega E.Z.N.A.® Total RNA Kit II (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA). As bibliotecas de transcriptoma foram construídas usando um kit TruSeq RNA Library Preparation V2 (Illumina Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Cada amostra foi

indexada por código de barras, originando uma única biblioteca de cDNA. As bibliotecas foram sequenciadas em uma plataforma Illumina HiSeq 2500 (with 2×150 bp paired-end).

A qualidade dos dados brutos gerados após o sequenciamento foi verificada no software FastQC (versão 0.10.1). Os dados foram filtrados usando Trimmomatic v0.30, remoção do primer e sequência do adaptador, truncamento de leituras de sequência com qualidade de extremidade de par <25 , truncamento de leituras de sequência sem qualidade média de 25 em uma janela deslizante de 4 bp com base no algoritmo phred.

2.6 Mapeamento, identificação e anotação de genes expressos diferencialmente

As leituras processadas foram mapeadas contra o genoma de referência do zebrafish (DanRer10), através do software STAR v. 2.7.5b (Dobin et al., 2013). As leituras do mapeamento foram contadas usando o software FeatureCounts v. 1.6.4+galaxy2 (Liao et al., 2014). Os resultados obtidos foram então utilizados na análise de genes diferencialmente expressos (DEG) entre o SM0 e o SM5 utilizando o software DESeq2 v. 2.11.40.6+galaxy1 (Love et al., 2014). Genes com um valor p ajustado $<0,05$ identificado por DESeq foram atribuídos como diferencialmente expressos. A taxa de descoberta falsa (FDR) foi ajustada usando o método de Hochberg e Benjamini (BH) (Benjamini e Hochberg, 1995). Um FDR $<0,05$ e $|\log_2(\text{fold changes})| \geq 1$ foram definidos como o limite para a expressão significativamente diferencial.

Uma análise de enriquecimento funcional de ontologia genética foi realizada mapeando todos os genes diferencialmente expressos no banco de dados Gene Ontology (GO) (Ashburner et al., 2000). Esta análise possibilitou estudar as categorias dos genes e onde ocorreram as alterações sobre os efeitos da SM na dieta. Os termos GO enriquecidos foram avaliados através do pacote Goseq (Young et al., 2010). As categorias de GO enriquecido foram calculadas usando a aproximação de Wallenius (Wallenius, 1963) e os valores de P foram ajustados usando o método BH. As categorias com valor p ajustado (FDR) $<0,05$ foram consideradas enriquecidas. Os valores P e FDR_bh resultantes servem como indicação do possível enriquecimento de cada termo GO. Para resumir as categorias GO, cada termo enriquecido foi anotado a um termo GO de alto nível. Um termo GO de alto nível significa termos que estão diretamente ligados ao termo raiz Componente celular (CC), Processo biológico (BP) ou Função molecular (MF). O banco de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes

and Genomes) foi utilizado para análise das rotas relevantes dos DEGs (Kanehisa et al., 2012). Os valores de $P < 0,05$ foram definidos como significativamente enriquecidos. As sequências anotadas exclusivas foram analisadas usando a função GAGE do pacote GAGE (Generally Applicable Gene-set/Pathway Analysis, Luo et al., 2009) para identificar mudanças mecanicistas, conforme sugerido pelas mudanças coordenadas de expressão em conjuntos de genes.

2.7 Análise estatística

A normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Teste de Levene) dos dados foram verificadas e seguidamente submetidas à análise de variância (ANOVA); posteriormente, diferenças significativas entre os tratamentos foram detectadas pelo teste de Tukey. Uma análise de regressão polinomial foi realizada nos dados de peso final e ganho de peso para avaliar melhor a relação entre o crescimento dos peixes e a substituição de FM por CM. Todos os dados foram analisados com nível de significância de 95% ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico Minitab v.18 (State College, PA, USA).

3 RESULTADOS

3.1 Crescimento

Os peixes aceitaram prontamente as dietas experimentais, e o consumo de ração não foi afetado pela composição da dieta (Tabela 2). A sobrevivência não foi afetada pelas diferentes dietas experimentais. No final do período experimental, o desempenho dos peixes avaliado pelo peso corporal final, ganho de peso, taxa de crescimento específico e comprimento corporal total aumentou linearmente com o aumento de SM em substituição a FM nas dietas. A eficiência alimentar, e a taxa de eficiência demonstraram tendência de variação semelhante aos parâmetros de crescimento.

Tabela 2. Desempenho e sobrevivência de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) após a alimentação com diferentes níveis de *Arthrospira platensis* em substituição a farinha de peixe por nove semanas.

Parâmetros	Dietas						Regressão linear	
	SM0	SM1	SM2	SM3	SM4	SM5	p-valor	R ²
PI	160,46±0.17	159,98±0.51	159,80±1.14	160,33±0.21	160,56±0.13	159,74±0.66		
PF	391,57±2,10 ^d	412,31±15.48 ^{cd}	444,38±13,77 ^{bc}	470,60±17.23 ^{ab}	477,12±11.99 ^{ab}	499,84±10.99 ^a	0,00	0,78
GP	13,95±0,07 ^d	14,65±0,53 ^{cd}	15,68±0,39 ^{bc}	16,39±0,04 ^{ab}	16,53±0,32 ^{ab}	17,18±0,22 ^a	0,00	0,77
TCE	1,49±2,10 ^d	1,57±0,07 ^{cd}	1,70±0,05 ^{bc}	1,79±0,01 ^{ab}	1,81±0,04 ^{ab}	1,90±0,03 ^a	0,00	0,78
EA	0,42±0,02 ^b	0,46±0,03 ^{ab}	0,51±0,03 ^{ab}	0,55±0,02 ^a	0,56±0,03 ^a	0,57±0,023 ^a	0,00	0,52
CA	33,21±1,50	32,35±1,81	30,95±1,82	29,68±0,92	29,65±1,59	29,89±1,08	0,61	0,15
TEP	1,29 ±0,05 ^b	1,39±0,10 ^{ab}	1,59±0,10 ^{ab}	1,70±0,06 ^a	1,75±0,11 ^a	1,74±0,06 ^a	0,00	0,53
SOB	93,33±5.44	91,67±10	95,00±6.38	95,00±6.38	93,33±9.43	95,00±6.38	0,86	0,10
CT	31,81±0,22 ^c	32,16±0,26 ^c	33,19±0,61 ^{bc}	35,28±0,42 ^{ab}	36,36±0,51 ^a	36,67±0,51 ^a	0,00	0,86

Dados são expressos como média ± erro padrão da média. Médias na mesma linha com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) usando análise de variância e o teste de Tukey ($p < 0,05$)

PF= Peso corporal médio; GP= ganho de peso; TCE= taxa de crescimento específico; TEA= eficiência alimentar; CA= consumo alimentar; TEP= taxa de eficiência proteica; Sob= Sobrevivência média final; CT= comprimento total.

3.2 Desempenho reprodutivo

Os parâmetros reprodutivos do zebrafish alimentados com diferentes níveis de SM em substituição a FM na dieta são apresentados na Tabela 3. O índice gonadosomático (IGV) foi significativamente maior nas fêmeas alimentadas com a dieta SM5, quando comparadas as fêmeas do grupo SM0. A produção de ovos foi significativamente maior nas fêmeas alimentadas com a dieta SM5. No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada na produção de ovos por fêmea entre a dieta SM0 e as dietas com 1 e 2% de SM. A dieta SM5 promoveu a maior taxa de fertilização, quando comparada aos tratamentos SM3 e SM0. A maior taxa de eclosão foi observada nos animais alimentados com a dieta SM4 e SM5, enquanto a menor taxa de eclosão foi verificada nos animais alimentados com a dieta SM0.

Tabela 3. Parâmetros reprodutivos de zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com diferentes níveis de *Spirulina platensis* em substituição a farinha de peixe durante nove semanas.

Dietas	Índice gonadosomático	Produção de ovos	Taxa de fertilização	Taxa de eclosão
SM0	6,31±0,73 ^b	101,11±10,07 ^c	77,43±0,35 ^{bc}	58,60±4,43 ^b
SM1	7,01±0,80 ^{ab}	125,67±4,17 ^c	85,37±1,76 ^{ab}	65,97±3,02 ^{ab}
SM2	7,50±0,86 ^{ab}	124,56±3,97 ^c	84,46±0,20 ^{abc}	68,65±3,90 ^{ab}
SM3	9,36±0,72 ^{ab}	144,22±8,19 ^{bc}	75,97±2,11 ^c	68,25±1,63 ^{ab}
SM4	9,58±0,31 ^{ab}	220,01±37,29 ^{ab}	86,40±3,29 ^{ab}	75,53±2,56 ^a
SM5	10,01±0,77 ^a	246,56±17,03 ^a	88,41±1,87 ^a	78,97±0,89 ^a
Regressão Linear				
p-valor	0,000	0,000	0,096	0,000
R ²	0,61	0,72	-	0,66

Dados são expressos como média ± erro padrão da média. Médias na mesma linha com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$) usando análise de variância e o teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.4 Análise do RNA-seq

Os dados brutos do sequenciamento do RNA (RNA-seq) produziram um total de 21.090.086 milhões de leituras para o grupo SM0, enquanto para o grupo SM5 foram produzidas 39.292.076 milhões de leituras. Após a trimagem das sequências para remoção do adaptador e filtragem de pares de bases de baixa qualidade e sequências de contaminantes, os conjuntos de dados foram reduzidos para 20.772.060 milhões de leituras para o grupo SM0 e de 38.619.740 milhões de leituras para o grupo SM5, todos exibindo valor de qualidade média maior que 30, sendo que os valores podem variar de 0 a 40 (Cock et al., 2009). Em seguida,

mais de 83% das leituras de alta qualidade foram mapeadas exclusivamente para o genoma de referência do zebrafish (GRCz10/ danRer10, set.2014).

Após a contagem das leituras mapeadas, os dados foram submetidos ao pacote DESeq2 para execução da análise de expressão diferencial de genes (DEGs). Foram encontrados um total de 850 genes diferencialmente expressos, dos quais 680 foram *up-regulated* e 170 *down-regulated* ($\log_2 FC > 1$) (FDR < 0,05). Posteriormente, os DEGs foram anotados e enriquecidos no banco de dados GO e KEGG, a fim de identificar suas funções específicas.

Os DEGs que retornaram resultados do banco de dados GO foram classificados em três principais categorias: processo biológico (BP), componente celular (CC) e função molecular (MF). Os dez principais termos GO de cada categoria e o respectivo número de genes em cada processo podem ser observados na figura 1. As análises GO dos DEGs revelaram que alguns deles podem desempenhar papéis cruciais no crescimento do zebrafish. Os principais resultados dos DEGs enriquecidos mostraram que os genes regulados nas categorias funcionais estavam relacionados principalmente ao desenvolvimento e diferenciação muscular. A administração de SM na dieta aumentou a expressão de genes envolvidos no controle do crescimento e desenvolvimento muscular, como fatores de crescimento (por exemplo, *smyd1b*, *pdlim5a*, *myoz1b*, *klhl40a*, *myod1*).

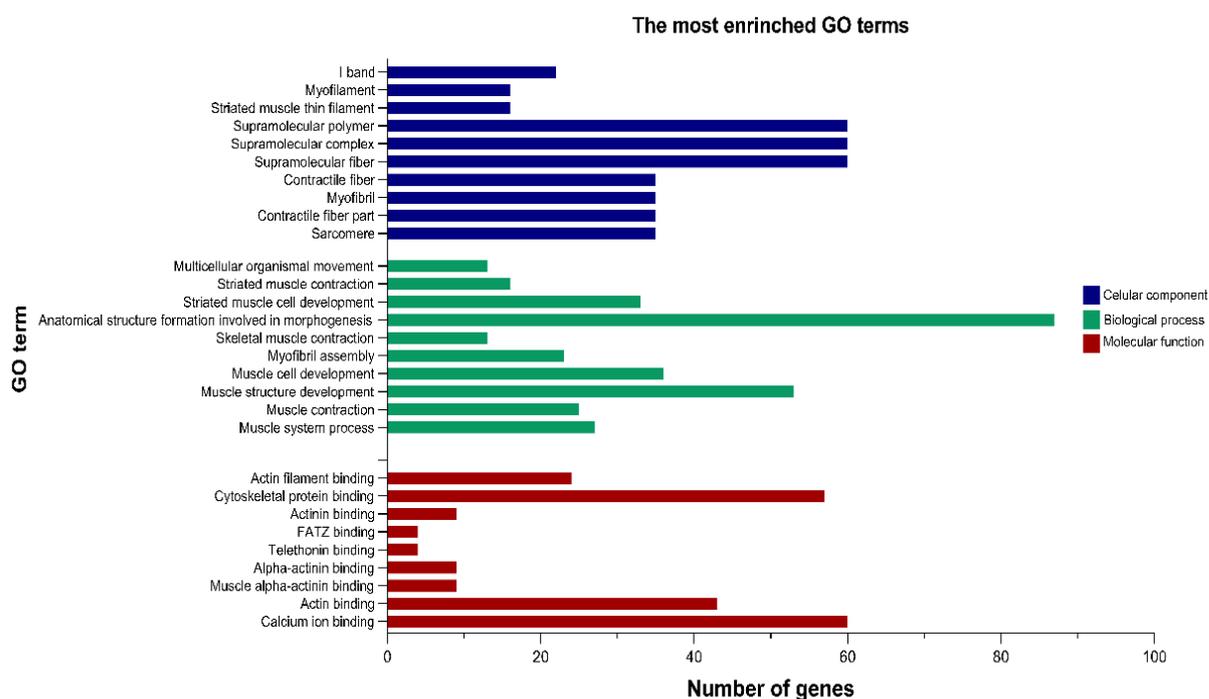


Figura 1. Análise funcional de DEGs com base em dados RNA-Seq. Os resultados foram resumidos nos dez termos GO mais enriquecidos em três categorias principais: componente celular, processo biológico e celular e função molecular.

A análise da rota KEGG foi realizada para interpretação biológica dos termos GO encontrados. Entre as vias KEGG, a via da *Oxidative phosphorylation* (dre00190) e a da *glycolysis/gluconeogenesis* (dre00010) foi significativamente enriquecida. Além disso, a via rede imunológica intestinal para produção de IgA (imunoglobulina A) (dre04672) também foi significativamente enriquecida.

A segunda análise de enriquecimento funcional foi realizada utilizando o pacote do GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) implementado no R studio 4.0.2 (Subramanian et al., 2005). O GSEA é conduzido no modo pré-classificado usando um algoritmo recente mais rápido baseado no pacote FGSEA (Sergushichev, 2016). Foram identificados 13 processos biológicos *up-regulated* significativos (FDR <0,1). Dentre os termos enriquecidos de interesse podemos destacar a ativação da rota de resposta imune (Fig. S1). Entre os genes *up-regulated* da rota de resposta imune podem ser observados a expressão da *il10* (interleucina 10), *il15* (interleucina 15), *tnfa* (fator de necrose tumoral-alfa) e *sod2* (superóxido dismutase 2).

4 DISCUSSÃO

4.1 Crescimento

Os resultados do presente estudo demonstram que a substituição completa de farinha de peixe por spirulina melhorou significativamente os parâmetros de crescimento do zebrafish. Além disso, não foram observadas mortalidade e/ou doenças nos peixes alimentados com spirulina em comparação aos animais alimentados com as dietas sem SM. A utilização de *S. platensis* foi relatada como promotor de crescimento em diferentes espécies de peixes (Cao et al., 2018; Gogoi et al., 2018; Velasquez et al., 2016; Yong et al., 2017). A melhoria no crescimento dos peixes alimentados com spirulina pode ser devido à um aumento na eficiência alimentar e na digestibilidade de seus nutrientes. Por outro lado, alguns estudos relataram que a spirulina pode melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, contribuindo para um melhor crescimento ao melhorar a absorção dos nutrientes (James et al., 2006; Teimouri et al., 2019). Salienta-se ainda que, a spirulina contém vários nutrientes, especialmente vitaminas, minerais, aminoácidos essenciais e ácidos graxos, que podem ser benéficos para os peixes, promovendo assim o maior crescimento (Cao et al., 2018; Mustafa et al., 1994).

4.2 Desempenho reprodutivo

O sucesso na reprodução dos peixes é influenciado por diversos fatores, como a nutrição dos reprodutores, taxas de alimentação, densidade de estocagem, idade e tamanho (Izquierdo et al., 2001; K.P. et al., 2007). No presente estudo, o desempenho reprodutivo do zebrafish foi significativamente afetado pela substituição de FM por spirulina nas dietas. O índice gonadossomático das fêmeas alimentadas com a dieta SM5 (10,1%) foi significativamente maior que os observados nas fêmeas do grupo SM0 (6,31%). Além disso, um aumento de aproximadamente 2,5 vezes na produção de ovos foi observado nas fêmeas alimentadas com a dieta contendo 50 g/kg de spirulina em relação as fêmeas do grupo SM0. Estes resultados são consistes com os relatados por James et al. (2006), de que fêmeas de peixe espada vermelho (*Xiphophorus helleri*) apresentaram um aumento no IGS em resposta a níveis de spirulina na dieta. Estes mesmos autores observaram que os peixes alimentados com 8% de spirulina na dieta apresentaram um aumento peso das gônadas de até quatro vezes as dos peixes alimentados com 0 e 3% de spirulina.

A taxa de eclosão aumentou de forma proporcional aos níveis de SM nas dietas, sendo as maiores taxas observadas nos animais alimentados com as dietas SM4 e SM5 comparados ao grupo SM0. Efeitos similares foram observados em ciclídeo da cauda amarela (*Pseudotro*

pheusacei), que apresentaram maior taxa de eclosão quando alimentados com spirulina na dieta (Güroy et al., 2012). O aumento no desempenho reprodutivo de peixes alimentados com spirulina ainda não é totalmente compreendido (Güroy et al., 2012; Khanzadeh et al., 2016). Contudo, estudos anteriores demonstraram que o desempenho reprodutivo pode ser modulado por carotenoides ou funções antioxidantes presentes nas microalgas (Khanzadeh et al., 2016; Scabini et al., 2011; Watanabe and Vassallo-Agius, 2003). Por outro lado, Calabrò et al. (2020) observaram que fêmeas de zebrafish alimentadas com spirulina atingiram a maturação sexual em um menor período do que fêmeas alimentadas com uma dieta sem suplementação da microalga. Além disso, estes mesmos autores relataram um aumento significativo na expressão de vitelogenina (vtg) nas fêmeas de zebrafish suplementados com spirulina nas dietas se comparadas aos peixes do grupo controle.

4.3 Expressão diferencial de genes

A saúde e o crescimento adequado dos peixes estão diretamente ligados a qualidade dos nutrientes consumidos por estes animais. Além disso, tanto a energia quanto os nutrientes, também são necessários para manter o pleno funcionamento do sistema imune dos peixes (Martin and Król, 2017). Entender os impactos da nutrição no crescimento e na imunidade dos peixes é cada vez mais importante, devido ao crescente número de peixes mantidos com dietas formuladas (Chandhini and Rejish Kumar, 2019; Martin and Król, 2017).

O sequenciamento do transcriptoma é uma ferramenta valiosa para caracterizar a expressão gênica subjacente aos mecanismos envolvidos no crescimento, reprodução, imunidade e estresse em peixes (Chandhini and Rejish Kumar, 2019; Hilerio-Ruiz et al., 2021; Martin and Król, 2017). No presente estudo, o sequenciamento do transcriptoma identificou 850 genes diferencialmente expressos, que foram agrupados de acordo com o termo de ontologia do gene correspondente.

Ao analisar o perfil de expressão gênica global dos peixes alimentados com spirulina foi identificado uma regulação positiva de importantes genes envolvidos em fatores miogênicos e de crescimento. Foi observada uma regulação positiva na expressão diferencial de fatores reguladores miogênicos (MRFs) primários, como a *myod1* e secundários, como a *myog*. Os MRFs primários são responsáveis pelo direcionamento das células progenitoras miogênicas em proliferação para uma linhagem miogênica, enquanto os MRFs secundários (*myog*) efetuam o controle da diferenciação e fusão de mioblastos para formar miofibras (Almeida et al., 2008;

Watabe, 2000). Além do papel central dos MRFs, a miogênese pode ser sinergizada pela ação de outra família de proteínas chamada de fator potenciador de miócitos 2 (MEF-2) (Asfour et al., 2018). Essas proteínas sozinhas quase não têm potencial de miogênese. No entanto, se presentes junto com MRFs diferentes, eles podem potencializar a miogênese (Jin et al., 2016). No presente estudo, foi observada uma regulação positiva na expressão de genes da família MEF-2, como o *mef2ca* e *mef2d*. Além disso, foram detectadas a expressão dos genes *smyhc2* e *smyhc3* da cadeia pesada de miosina (MyHC), apoiando assim a atividade pró-miogênica do Mef2. Salienta-se ainda que, foi observada uma regulação positiva na expressão do *igfbp1a* (proteína 1a de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina). As proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs), prolongam as meias-vidas dos IGFs, protegendo-os da filtração glomerular, degradação enzimática (Guler et al., 1989) e regulam a disponibilidade de IGFs para tecidos-alvo (Shimizu and Dickhoff, 2017). As mudanças na demanda de energia muscular ou capacidade oxidativa em peixes frequentemente são relacionadas ao jejum das longas migrações de desova (Miller et al., 2009). No entanto, a disponibilidade de nutrientes por si só é um fator de extrema importância, visto que, direciona o turnover proteico e a atividade mitocondrial, conforme o relatado em dourada (Calduch-Gine et al, 2014).

O aumento nas taxas de crescimento dos peixes que consumiram spirulina pode ser atribuído a uma melhora nas funções imunológicas, como demonstrado em estudos com aves e peixes (Belay et al., 1996; Zhang et al., 2020). No presente estudo, a spirulina estimulou o sistema imune dos peixes, visto que, foi observada uma regulação positiva dos genes relacionados na resposta imune do zebrafish. Com base na regulação positiva da interleucina (*il4*, *il10* e *il15*), quimiocinas (*cxcl12b*, *cxcr4b*, *cxcl12a* e *cxcl19*) e enzimas antioxidantes (*sod1*) pode-se sugerir que as respostas imunes inatas do zebrafish podem ser moduladas pela spirulina. Efeitos semelhantes foram observados na resposta imune inata de bagres do canal (*Ictalurus punctatus*), quando alimentados com spirulina (Duncan and Klesius, 1996). Da mesma forma, a administração oral de spirulina em carpa comum (*Cyprinus carpio*) apresentou um aumento na expressão de interleucina-1 β (IL-1 β) e de genes do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Watanuki et al., 2006). Esses efeitos imuno-aprimorados da spirulina em peixes podem ser devido à presença de vitaminas, minerais, ficocianina, β -caroteno e polissacarídeos em sua composição (Khalil et al., 2017; Khan et al., 2005). Além dos polissacarídeos da spirulina, as ficocianinas podem estimular a produção de certas citocinas (Hayashi et al., 2006).

5 CONCLUSÃO

A substituição da farinha de peixe por spirulina demonstrou ser uma alternativa viável para o zebrafish. A inclusão de até 50 g/kg de spirulina melhorou o crescimento e o desempenho reprodutivo do zebrafish. O sequenciamento do transcriptoma por RNA-Seq revelaram grandes mudanças no perfil de expressão dos genes relacionados a fatores miogênicos e do sistema imune inato dos peixes alimentados com spirulina. Fornecendo assim, uma visão dos mecanismos moleculares subjacentes ao crescimento e imunidade. Estudos adicionais usando os dados do transcriptoma gerados no presente estudo provavelmente fornecerão novas percepções significativas sobre os mecanismos detalhados da suplementação de spirulina na dieta de peixes, o que pode, por sua vez, beneficiar a indústria de aquicultura.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), bolsas nº 304940 / 2014-3 e 142263 / 2016-8; e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Abdelkhalek, N.K.M., Ghazy, E.W., Abdel-Daim, M.M., 2015. Pharmacodynamic interaction of *Spirulina platensis* and deltamethrin in freshwater fish Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: impact on lipid peroxidation and oxidative stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 3023–3031. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3578-0>
- Belal, E.B., Khalafalla, M.A., 2012. Use of spirulina (*Arthrospira fusiformis*) for promoting growth of Nile Tilapia fingerlings. *African J. Microbiol. Res.* 6, 6423–6431. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.288>
- Boyd, C.E., 2015. Overview of aquaculture feeds. *Feed Feed. Pract. Aquac.* 3–25. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100506-4.00001-5>
- Cao, S.-P., Zou, T., Zhang, P.-Y., Han, D., Jin, J.-Y., Liu, H.-K., Yang, Y.-X., Zhu, X.-M., Xie, S.-Q., 2018. Effects of dietary fishmeal replacement with *Spirulina platensis* on the growth, feed utilization, digestion and physiological parameters in juvenile gibel carp (*Carassis auratus gibelio* var. CAS III). *Aquac. Res.* 49, 1320–1328. <https://doi.org/10.1111/are.13590>
- Carneiro, W.F., Castro, T.F.D., Orlando, T.M., Meurer, F., de Jesus Paula, D.A., do Carmo

- Rodrigues Virote, B., da Cunha Barreto Vianna, A.R., Murgas, L.D.S., 2020. Replacing fish meal by *Chlorella* sp. meal: Effects on zebrafish growth, reproductive performance, biochemical parameters and digestive enzymes. *Aquaculture* 735612.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735612>
- Chakraborty, S.B., Hancz, C., 2011. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Rev. Aquac.*
<https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2011.01048.x>
- Chiu, A., Li, L., Guo, S., Bai, J., Fedor, C., Naylor, R.L., 2013. Feed and fishmeal use in the production of carp and tilapia in China. *Aquaculture* 414–415, 127–134.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.07.049>
- Cock, P.J.A., Fields, C.J., Goto, N., Heuer, M.L., Rice, P.M., 2009. The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic Acids Res.* 38, 1767–1771. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1137>
- Dawood, M.A.O., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuini, M.F., Hossain, M.S., Nhu, T.H., Moss, A.S., Dossou, S., Wei, H., 2017. Dietary supplementation of β -glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquac. Nutr.* 23, 148–159. <https://doi.org/10.1111/anu.12376>
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- El Sheikh, S.M., Shalaby, M.A.M., Hafez, R.A., Metwally, W.S.A., El-Ayoty, Y.M., 2014. The immunomodulatory effects of probiotic bacteria on peripheral blood mononuclear cells (PBMCS) of allergic patients. *Am. J. Immunol.* 10, 116–130.
<https://doi.org/10.3844/ajisp.2014.116.130>
- Gogoi, S., Mandal, S.C., Patel, A.B., 2018. Effect of dietary *Wolffia arrhiza* and *Spirulina platensis* on growth performance and pigmentation of Queen loach *Botia dario* (Hamilton, 1822). *Aquac. Nutr.* 24, 285–291. <https://doi.org/10.1111/anu.12558>
- James, R., Sampath, K., Thangarathinam, R., Vasudevan, I., 2006. Effect of dietary *Spirulina* level in growth, fertility, coloration and leucocyte count in red swordtail, *Xiphophorus helleri*, *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*.
- Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W., 2014. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923–930.

- <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Mustafa, M.G., Takeda, T., Umino, T., Wakamatsu, S., Nakagawa, H., 1994. Effects of *Ascophyllum* and *Spirulina* Meal as Feed Additives on Growth Performance and Feed Utilization of Red Sea Bream, *Pagrus major*. *J. Fac. Appl. Biol. Sci. Hiroshima Univ.* 33, 125–132. <https://doi.org/10.15027/24679>
- Nakagawa, H., Sato, M., Gatlin, D.M., 2007. Dietary Supplements for the Health and quality of cultured fish, *Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish*. CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845931995.0000>
- O’Brine, T.M., Vrtělová, J., Snellgrove, D.L., Davies, S.J., Sloman, K.A., 2015. Growth, Oxygen Consumption, and Behavioral Responses of *Danio rerio* to Variation in Dietary Protein and Lipid Levels . *Zebrafish* 12, 296–304. <https://doi.org/10.1089/zeb.2014.1008>
- Oliva-Teles, A., 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. *J. Fish Dis.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01333.x>
- Ramakrishnan, C.M., Haniffa, M.A., Manohar, M., Dhanaraj, M., Arockiaraj, A.J., Seetharaman, S., Arunsingh, S. V, 2008. Effects of Probiotics and *Spirulina* on Survival and Growth of Juvenile Common Carp (*Cyprinus carpio*), *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*.
- Ribas, L., Piferrer, F., 2014. The zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism, with emphasis on applications for finfish aquaculture research. *Rev. Aquac.* <https://doi.org/10.1111/raq.12041>
- Shokri, H., Khosravi, A., Taghavi, M., 2014. Efficacy of *Spirulina platensis* on immune functions in cancer mice with systemic candidiasis, *Journal of Mycology Research*. University of Tehran.
- Tacon, A.G.J., Metian, M., 2015. Feed matters: Satisfying the feed demand of aquaculture. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 23, 1–10. <https://doi.org/10.1080/23308249.2014.987209>
- Taheri Mirghaed, A., Fayaz, S., Hoseini, S.M., 2019. Effects of dietary 1,8-cineole supplementation on serum stress and antioxidant markers of common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to ambient ammonia. *Aquaculture* 509, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.071>

- Teimouri, M., Amirkolaie, A.K., Yeganeh, S., 2013. The effects of spirulina platensis meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 396–399, 14–19.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.009>
- Teimouri, M., Yeganeh, S., Mianji, G.R., Najafi, M., Mahjoub, S., 2019. The effect of *Spirulina platensis* meal on antioxidant gene expression, total antioxidant capacity, and lipid peroxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 45, 977–986. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-0608-3>
- Ulloa, P.E., Iturra, P., Neira, R., Araneda, C., 2011. Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: Towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* <https://doi.org/10.1007/s11160-011-9203-0>
- Ulloa, P.E., Medrano, J.F., Feijoo, C.G., 2014. Zebrafish as animal model for aquaculture nutrition research. *Front. Genet.* 5, 313. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00313>
- Vallejos-Vidal, E., Reyes-López, F., Teles, M., MacKenzie, S., 2016. The response of fish to immunostimulant diets. *Fish Shellfish Immunol.*
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.028>
- Velasquez, S.F., Chan, M.A., Abisado, R.G., Traifalgar, R.F.M., Tayamen, M.M., Maliwat, G.C.F., Ragaza, J.A., 2016. Dietary *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) replacement enhances performance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Appl. Phycol.* 28, 1023–1030. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0661-y>
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., Kuča, K., 2016. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Arch. Toxicol.* <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1744-5>
- Yong, T.C., Bueno Galaz, G., Shapawi, R., 2017. Effects of dietary inclusion of *Spirulina* meal on growth and hematological parameters of cultured Asian sea bass, *Lates calcarifer*, *Borneo Journal of Marine Science and Aquaculture*.
- Zhang, J., Liu, Y., Tian, L., Yang, H., Liang, G., Xu, D., 2012. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 1027–1032.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.001>

ARTIGO 3 - Dietas contendo *Arthrospira platensis* aumentam o crescimento, modulam o metabolismo lipídico e reduzem o estresse oxidativo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) expostos à amônia

Scientific Journal:
Algal Research
ISSN: 2211-9264
Impact Factor: 4.008
Elsevier

Dietas contendo *Arthrospira platensis* aumentam o crescimento, modulam o metabolismo lipídico e reduzem o estresse oxidativo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) expostos à amônia

William Franco Carneiro^a, Pedro Leite de Castro Uzeda^b, Tassia Flavia Dias Castro^b, Tharyn Reichel^c, Carlos Antônio Martínez-Palacios^d, Luis David Solis Murgas^{a,b*}

^aDepartamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^bDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^cDepartamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^dInstituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico

*Corresponding author: Murgas, L.D.S. ismurgas@ufla.br, Lavras-MG, Brasil.

Resumo

A amônia é um dos poluentes comumente encontrados em sistemas intensivos. Em níveis elevados, pode comprometer a saúde dos animais e causar grandes perdas econômicas na aquicultura. Dietas suplementadas com aditivos e/ou ingredientes imunoestimulantes podem melhorar as condições de saúde e a resistência as doenças dos animais. Neste contexto, a inclusão de *Arthrospira platensis* (SM) vem apresentado resultados promissores como promotor de crescimento, estímulo do sistema imune e função antioxidante em peixes. O objetivo deste estudo foi avaliar a substituição da farinha de peixe por SM, no desempenho de crescimento, eficiência alimentar, parâmetros bioquímicos e capacidade antioxidante hepática de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) expostos à amônia. Os peixes foram alimentados durante 45 dias com dietas contendo diferentes níveis de SM: 0 (SM0), 20 (SM20), 40 (SM40) e 60g/kg (SM60), em substituição a farinha de peixe, seguidos por 24h de exposição à 2.5 mg L⁻¹ de amônia. O desempenho de crescimento foi determinado após o teste de alimentação de 45 dias. As coletas para avaliar a atividade da ALT, AST, CAT, SOD, TAC e MDA foram realizadas antes e após o desafio com amônia. Os resultados demonstraram que os peixes alimentados com as dietas SM40 e SM60 melhoram significativamente o desempenho de crescimento, weight gain % (P= .017) e Specific growth rate % (P= 0.011) em comparação com a dieta SM0. Os peixes alimentados com as dietas SM40 e SM60 apresentaram os menores níveis de colesterol total (P < .001), triglicerídeos (P < .001) e LDL (P < .001), comparados com o tratamento sem SM. A atividade plasmática da alanina amino transferase (ALT) foi

significativamente menor ($P = .002$) nos peixes que receberam a dieta SM40 e SM60, comparados a dieta SM0. A inclusão de SM aumentou significativamente os níveis de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e a capacidade total antioxidante (TAC) nos tratamentos SM40 e SM60. As concentrações de malondialdeído (MDA) apresentaram aumento em todos os tratamentos após a exposição a amônia, quando comparado aos níveis observados antes do desafio. As dietas com 60g/kg de spirulina inibiu significativamente os efeitos adversos da exposição à amônia nas respostas antioxidantes dos peixes. Em conclusão, a dieta SM60 melhorou o desempenho de crescimento e demonstrou ser eficaz na redução dos efeitos adversos da toxicidade da amônia em juvenis de pacu. Estes efeitos parecem estar relacionados com compostos antioxidantes presentes na spirulina, que podem melhorar o crescimento e mitigar os danos no tecido hepático induzidos por amônia em juvenis de pacu.

Palavras-chave: Neotropical fish; fish nutrition; antioxidant defenses; hepatoprotective; oxidative stress

1 INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos de alto valor nutricional está crescendo à medida que a população mundial aumenta. Neste sentido, a produção de peixes em cativeiro pode ser a resposta para atender este consumo. Produzindo mais de 50% de todo o pescado consumido pelo homem, a aquicultura é um importante setor do programa global de segurança alimentar (FAO 2016; Santis et al., 2015). No entanto, para atender as crescentes demandas por pescado, os sistemas de aquicultura estão se tornando cada vez mais intensivos. A intensificação da aquicultura requer altas taxas de alimentação, elevada densidade de estocagem e manejo intenso, sujeitando os animais a condições de estresse, que podem afetar negativamente a saúde e o crescimento.

Um fator determinante para a expansão dos sistemas intensivos de aquicultura é o uso de dietas de alta qualidade. Visto que em sistemas intensivos, a única fonte de nutrientes dos animais é obtida através das dietas. O aumento dos compostos nitrogenados na água, em sistemas de aquicultura podem ocorrer devido à superalimentação e desequilíbrio nutricional das dietas (Mirghaed et al., 2020; Wilson, 2002). Os peixes excretam a maior parte dos resíduos nitrogenados como amônia, que pode ser encontrada de duas formas nos ambientes aquáticos, a ionizada (NH_4^+) e não ionizada (NH_3) (Pereira e Mercante, 2005). A amônia não ionizada pode ser muito tóxica para os peixes, concentrações de < 1 mg/L de nitrogênio amoniacal não

ionizado pode levar a morte da maioria das espécies de peixes (Barbieri and Bondioli, 2015; Benli et al., 2008).

Os níveis de amônia na água podem afetar negativamente a saúde dos peixes, como demonstrado em alguns estudos, a intoxicação por amônia pode causar um aumento no estresse (Barbieri e Bondioli 2015; Gonçalves et al. 2017), imunossupressão (Xuan et al. 2013), estresse oxidativo (Hegazi, Attia, e Ashour 2010; Pan, Chien, e Wang 2011; Sinha et al. 2014; Hoseini et al. 2019) e danos nos tecidos dos peixes (Peyghan e Takamy 2002; Benli, Köksal, e Özkul 2008; Dong et al. 2013). Estes efeitos, geralmente diminuem o crescimento e tornam os peixes mais suscetíveis as doenças (Ashley 2007; Tort 2011). Como a capacidade dos peixes de suportar o estresse ambiental e aumentar a resistência a patógenos depende em grande parte do seu estado nutricional, a necessidade de intervenções alimentares que melhorem a saúde dos peixes tornou-se um passo importante para o desenvolvimento da aquicultura sustentável.

O uso de aditivos na dieta dos peixes demonstrou ser um método altamente eficaz para aumentar a resistência e suprimir os efeitos adversos de substâncias tóxicas presentes nos sistemas de cultivo (Mai et al., 2012; Zhang et al. 2012; Tahmasebi-Kohyani et al. 2012; Dawood et al. 2017; Taheri Mirghaed, Fayaz, e Hoseini 2019; Hoseini et al. 2019). Além disso, a suplementação dietética com aditivos imunoestimulantes pode aumentar o crescimento, melhorar a resposta antioxidante e fortalecer o sistema imune dos peixes (Chakraborty e Hancz 2011; Oliva-Teles 2012; Vallejos-Vidal et al. 2016). Na última década, houve um interesse crescente no uso de extratos de plantas, ervas e microalgas como suplementos alimentares imunoestimulantes em peixes.

A presença de compostos imunoestimulantes, ações antioxidantes e moduladoras do metabolismo fazem das microalgas ingredientes promissores na alimentação de peixes (Meena et al. 2013; Becker 2007). Entre as diversas espécies de microalgas, a *Arthrospira platensis* - spirulina (SM) vem recebendo atenção como suplemento em dietas para animais. Devido a presença de ficocianinas e ficoeritrinas, substâncias que atuam no sistema imune e atividade antioxidante, a SM pode servir como uma ferramenta profilática para prevenir doenças, melhorando as respostas imunológicas dos peixes antes de eventos estressantes.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie naturalmente distribuída na América do Sul (Godoy, 1975). Atualmente é cultivado do nordeste da Argentina até a região centro-oeste do Brasil (Cian et al. 2017). Devido ao elevado ganho de peso, manejo simples e notável plasticidade alimentar (Jomori et al., 2003; Urbinati et al., 2010) é muito valorizado para fins

comerciais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da substituição da farinha de peixe por *Arthrospira platensis* no desempenho de crescimento, parâmetros bioquímicos plásmaticos, estado antioxidante hepático e a resistência à intoxicação por amônia de juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram realizados em estrita conformidade com as normas institucionais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, MG, Brasil, sob o protocolo nº 108/18 e atende às diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para o cuidado e uso de animais de laboratório.

2.1 Dietas

Foram formuladas quatro dietas, isoproteicas e isoenergéticas, com 320 g kg⁻¹ de proteína bruta e 17 MJ g kg⁻¹ de energia bruta (Tabela 1), utilizando o software de formulação de ração SuperCrac 6.1 (TD Software, Viçosa, MG, BRA). As dietas continham níveis crescentes de spirulina meal (SM) (*A. platensis*, Olson Nutrição, RS, Brazil, 57% de proteína bruta), 0, 20, 40 e 60 g kg⁻¹, em substituição a FM. Os ingredientes foram cuidadosamente misturados e umedecidos com aproximadamente 40 % de água e depois transformados em pellets, forçando a mistura através de um moedor de carnes, os pellets foram cortados em um tamanho de aproximadamente 1 mm. Os grânulos foram secos em uma estufa de ventilação de ar forçada com uma temperatura de 55 °C por 24h e posteriormente armazenadas em sacos plásticos herméticos em um freezer a uma temperatura de 4 °C até o uso.

A composição proximal das dietas foi realizada seguindo a metodologia da AOAC (AOAC, 2000). A umidade foi avaliada secando as amostras a 105 °C por 24 h em uma estufa; gordura bruta pelo método Soxhlet; proteína bruta (N x 6,25) pelo método Dumas modificado (Ebling, 1968) em um analisador de nitrogênio Leco FP-528 e cinzas por incineração a 550 °C em um forno mufla (Thermo Fisher Scientific, USA). Todas as análises químicas foram realizadas em triplicatas.

Tabela 1. Ingredientes (g kg⁻¹) e composição proximal (peso seco) de dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com níveis crescentes de spirulina (*Arthrospira platensis*) em substituição a farinha de peixe.

Ingredientes ¹ (g kg ⁻¹)	Diet designation (g kg ⁻¹) fish meal replacement)			
	SM0	SM20	SM40	SM60
Spirulina	-	20	40	60
Fish meal	60	40	20	-
Soybean meal	569.5	567.2	565	564
Wheat meal	200	200	200	190.9
Broken rice	84.9	88.7	92.4	103.1
Corn meal	50	50	50	50
Soybean oil	10	10	10	10
Dicalcium phosphate	10	10	10	10
Premix ²	10	10	10	10
Calcareous	3.6	2.1	0.6	-
BHT ³	2	2	2	2
Analyzed composition ⁴ (g kg ⁻¹)				
Dry-matter	925.7	932.5	929.6	926.5
Crude protein				
Ether extract	23.1	23.3	22.2	23.3
Ash	73.7	57.4	55	44.9
Gross energy (MJ kg ⁻¹)	17.3	17.2	17.16	17.16

ingredients were obtained from a local commercial source.

²Total rações (Varginha, MG, Brazil): Guaranteed vitamin and mineral supplement levels per kilogram of product: vit. A = 1,200,000 IU; vit. D3 = 200,000 IU; vit. E = 12,000 mg; vit. K3 = 2400 mg; vit. B1 = 4,800 mg; vit. B2 = 4,800 mg; vit. B6 = 4,000 mg; vit. B12 = 4,800 mg; folic acid = 1,200 mg; calcium pantothenate = 12,000mg; vit. C = 48,000 mg; biotin = 48 mg; choline = 65,000 mg; niacin = 24,000 mg; Fe =10,000 mg; Cu = 6,000 mg; Mn = 4,000 mg; Zn = 6,000 mg; I = 20 mg; Co = 2 mg; Se = 20 mg.

³BHT = butyl hydroxy toluene.

⁴Diets were analyzed by the Aquaculture and Fish Nutrition Laboratory (Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México).

2.2 Peixes e protocolos experimentais

Os juvenis de pacu (*P. mesopotamicus*) foram adquiridos de um fornecedor local e transferidos para o Central Animal House of UFLA. Após a aclimação dos peixes por três semanas, um número total de 180 juvenis de pacu ($0,97 \pm 0,04$ g) foram alocados em 12 aquários de vidro, de 45 L (45 x 30 x 35 cm), distribuídos em quatro tratamentos com três repetições, em uma densidade de 15 peixes por aquário. A água dos aquários fluía por gravidade para um tanque de filtragem de 250 L, constituído de um sistema com filtragem mecânica através de feltro e espumas, posteriormente a água fluía para um filtro biológico com anéis de cerâmica de onde a água era bombeada para uma câmara com luz ultravioleta (UV light) antes de retornar para os aquários. A temperatura da água foi controlada com três aquecedores de 250 watts (Roxin HT-1300), mantidos no tanque de filtragem. Cada aquário contava com um

sistema de aeração individual, composto por pedras porosas ligadas através de uma mangueira de silicone a um aerador eletromagnético (Boyu - Acq-003). Um fotoperíodo de 12 h: 12 h de luz/escuro foi estabelecido durante todo o ensaio. Os animais foram alimentados a mão três vezes ao dia (8h, 11h e 15h), até a saciedade aparente por um período de 45 dias. Os parâmetros de qualidade água medidos diariamente foram temperatura e pH, que apresentaram uma média de $28,6 \pm 1,4$ ° C e $7,8 \pm 0,7$. As medições semanais de oxigênio dissolvido e amônia total foram em média de $6,9 \pm 1,2$ mg L⁻¹ e $0,06 \pm 0,07$ mg L⁻¹, respectivamente, todos os valores adequados para criação de juvenis de pacu.

2.3 Desempenho zootécnico

Os peixes foram medidos e pesados individualmente com auxílio de um paquímetro e de uma balança digital de precisão. O peso final (FW), ganho de peso (WG), taxa de crescimento específico (SGR), consumo alimentar diário (DFI), comprimento total (TL), índice hepatossomático (HSI), feed efficiency ratio (FER), consumo alimentar diário (FI), protein efficiency ratio (PER) e taxa de sobrevivência foram determinados para cada tanque usando a seguinte fórmula:

FW (g) = Peso final individual.

WG (g) = (Peso final individual – Peso inicial individual).

SGR (%) = $100 (\ln W_2 - \ln W_1) / T_2 - T_1$.

DFI (%) = $100 \times (\text{Consumo total de ração/dias})$.

TL (mm) = Medido da ponta do focinho até o final da nadadeira caudal.

PER (%) = $100 \times \text{WG} / (\text{consumo alimentar} / \% \text{ proteína na dieta})$

HIS = $100 \times (\text{peso do fígado} / \text{peso corporal})$

Taxa de sobrevivência (%) = $100 \times (\text{número final de peixes}) / (\text{número inicial de peixes})$.

Onde W1 e W2 são o peso inicial e final (mg), respectivamente; T2 - T1 é o número de dias no período de alimentação.

2.5 Parâmetros bioquímicos

Ao final do teste de alimentação, os animais foram mantidos em jejum por 24 h. Quatro animais por replica foram capturados, anestesiados e posteriormente coletado amostras de sangue (200 µl) por punção caudal, com seringas heparinizadas e armazenados em tubos plásticos. As amostras de plasma foram separadas após 10 min de centrifugação (5500 g) e armazenadas a -80 °C até as análises.

Os níveis plasmáticos de glicose, colesterol total (TCHO), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL) e triglicerídeos (TGO) foram medidos utilizando kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). A leitura das absorbâncias de cada um dos ensaios foi realizada através de um espectrofotômetro Biotek Epoch (Biotek, Winooski, VT, USA), sendo realizado triplicata de cada amostra.

A atividade de alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST) do plasma, foram determinadas cineticamente, através de um espectrofotômetro com leitor de microplacas (Biotek, Winooski, VT, USA) usando kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil).

2.6 Enzimas antioxidantes

A coleta do fígado foi feita em três animais por réplica. A dissecação dos animais foi realizada em uma placa de gelo a 2 °C, utilizando pinças e bisturis estéreis de uso individual. Os fígados foram removidos por inteiro, acondicionados em tubos criogênicos com volume de 2 mL, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultra freezer a -80 °C até as análises posteriores.

Um fragmento de fígado (\pm 200 mg) por réplica foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7) na proporção 1:5 (peso/volume) e centrifugado a $16.000 \times g$ por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi dividido em alíquotas para atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), total antioxidant capacity (TAC), peroxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBARS) e proteína total. Todas as análises foram feitas em triplicata e as leituras foram feitas em um espectrofotômetro com leitor de microplacas (PowerWave XS, Biotek, Winooski, VT, USA).

A atividade de CAT foi medida em 240 nm, conforme descrito por Aebi (1984), na qual ocorre o decréscimo de absorbância a 240 nm devido à degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. A leitura da absorbância foi realizada a cada 15 s por 3 min e a atividade foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. A atividade da SOD foi medida com base na capacidade da enzima de inibir a redução do nitro blue tetrazolium (NBT) pelos radicais superóxido (Crouch et al., 1981) medida através de um espectrofotômetro em 560 nm, a atividade foi expressa em U SOD mg^{-1} proteína. A peroxidação lipídica e o TAC foram medidos usando kits comerciais, seguindo as recomendações do fabricante (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA).

2.7 Desafio à amônia

Ao final do período experimental seis animais por repetição foram expostos a uma concentração de 3 mg L⁻¹ de amônia total durante 24 h. A solução estoque de amônia foi preparada dissolvendo a quantidade necessária de cloreto de amônio em água deionizada e adicionada ao sistema de acordo com a equação de Bower e Bidwell (1978) com base no pH e temperatura da água dos aquários. O fluxo de água foi interrompido durante o desafio. O pH, temperatura, oxigênio dissolvido e amônia total da água foram medidos antes e após a adição da solução estoque de amônia.

Os peixes foram amostrados após o desafio para determinar a sobrevivência, parâmetros bioquímicos plásmáticos de AST, ALT, enzimáticos de CAT, SOD, MDA e TCA. A coleta do sangue, dissecação para retirada do fígado e as análises foram realizadas conforme o descrito anteriormente.

2.8 Análise estatística

Os dados foram verificados quanto a normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Teste de Levene). Posteriormente os dados de desempenho de crescimento, total colesterol, triglycerides, HDL e LDL foram avaliados através da ANOVA unidirecional e teste de Tukey para encontrar os efeitos dos níveis de SM em substituição a FM nas dietas. Os dados de glucose, AST, ALT e os marcadores de condição oxidativa no fígado, foram submetidos a ANOVA bidirecional para encontrar os efeitos SM na dieta e exposição a amônia. Efeitos significativos da interação da SM e exposição a amônia foram encontrados; assim testes de ANOVA unidirecional e Tukey foram utilizados para analisar estes dados. Diferenças significativas foram consideradas em $P < 0.05$. Os dados foram analisados utilizando no SAS 9.4 e os dados são expressos como média \pm SEM.

3. RESULTADOS

3.1. Desempenho zootécnico

Os peixes tiveram um bom crescimento e nenhum problema de saúde foi verificado durante o período experimental. Não foi registrada mortalidade em nenhum dos tratamentos, após 45 dias de alimentação com as dietas experimentais. Os maiores crescimentos em termos de peso final (g), ganho de peso (%) e taxa de crescimento específico (SGR) foram obtidos nos grupos SM40 e SM60 (Tabela 2), quando comparados ao grupo SM0. A taxa de eficiência alimentar (FER) e a taxa de eficiência proteica (PER) não foram influenciados pelos níveis de

SM nas dietas, mas os peixes alimentados com a dieta SM0 apresentaram valores numericamente mais baixos. O consumo alimentar (DFI g day⁻¹) foi significativamente maior no grupo SM40, em comparação com o grupo SM0. Não foram observadas diferenças significativas para o HSI em nenhum dos peixes alimentados com as diferentes dietas experimentais.

Tabela 2. Desempenho zootécnico de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e sobrevivência após alimentação por 40 dias com diferentes níveis de spirulina em substituição a farinha de peixe.

Parameters	Treatment				P -value
	SM0	SM20	SM40	SM60	
Initial weight (g)	0.96±0.02	0.99±0.03	0.96±0.02	0.98±0.02	0.689
Final weight (g)	5.90±0.11 ^b	6.83±0.03 ^{ab}	7.79±0.50 ^a	7.65±0.42 ^a	0.006
Weight gain (%)	516.45±16.74 ^b	588.35±18.62 ^{ab}	711.29±57.93 ^a	677.78±31.98 ^a	0.017
SGR ¹ (%)	5.19±0.08 ^b	5.51±0.08 ^{ab}	5.97±0.20 ^a	5.86±0.12 ^a	0.011
Total length (cm)	7.44±0.26	7.11±0.05	7.43±0.02	7.29±0.21	0.501
HSI	1.44±0.07	1.68±0.16	1.64±0.05	1.66±0.14	0.476
FER ²	64.69±1.48	65.93±3.14	70.47±2.87	74.15±4.01	0.182
FI ³ g day ⁻¹	0.22±0.01 ^b	0.25±0.01 ^{ab}	0.28±0.01 ^a	0.26±0.01 ^{ab}	0.025
PER ⁴	1.80±0.04	2.06±0.10	1.94±0.08	2.07±0.11	0.187
Survival (%)	100	100	100	100	-

Dados expressos como ± SEM.

¹Taxa de crescimento específico.

²Eficiência alimentar.

³Consumo alimentar.

⁴Taxa de eficiência proteica.

⁵Índice hepatossomático.

3.2 Parâmetros bioquímicos e enzimas antioxidantes

O HDL não apresentou diferenças significativas entre as diferentes dietas (Tabela 3). Por outro lado, a concentração de colesterol total, triglicérides e LDL exibiram tendência de variação semelhante durante o período experimental. Uma redução significativa nos níveis de TCH, TG e LDL foi observada com o aumento da spirulina na dieta em substituição a FM (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos plasmáticos de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com níveis crescentes de spirulina (*Arthrospira platensis*) em substituição a farinha de peixe durante cinco semanas

Parâmetros	Dietas				P-value
	SM0	SM20	SM40	SM60	
Total cholesterol	193.31±4.51 ^a	175.10±1.88 ^a	135.15±9.67 ^b	134.23±8.96 ^b	<0.001
Triglycerides	259.74±9.58 ^a	198.97±19.85 ^{ab}	166.24±16.10 ^b	159.14±21.18 ^b	<0.001
HDL ¹	64.22±3.48	56.01±4.75	48.29±6.49	67.69±10.66	0.268
LDL ²	77.15±1.04 ^a	79.30±1.99 ^a	53.62±9.07 ^b	34.72±6.94 ^b	<0.001

Data are expressed as means ± SEM. Means with different letters superscripts in the same line are significantly different (P < 0.05).

¹ High density lipoprotein

² Low density lipoprotein

A exposição a amônia levou a um aumento significativo nas atividades plasmáticas de AST, ALT e nos níveis de glicose plasmática (Tabela 4). A substituição de FM por SM nas

dietas SM40 e SM60 apresentou atividade da ALT significativamente menor que a dieta SM0. Os níveis de substituição da FM por SM tiveram efeitos de interação significativa na atividade plasmática de ALT. Por outro lado, a substituição de FM por spirulina nas dietas não apresentaram efeitos significativos nos níveis de AST e glicose plasmática.

Tabela 4. Atividade de AST, ALT e níveis plasmáticos de glicose em juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com níveis crescentes de spirulina (*Arthrospira platensis*) em substituição a farinha de peixe por 35 dias, seguidos por 24 h de exposição a amônia.

Desafio à amônia	Dieta	AST (U L ⁻¹)	ALT (U L ⁻¹)	Glicose (mg dL ⁻¹)
<i>Médias individuais dos tratamentos</i>				
Antes do desafio	SM0	52.97±0.72	5.36±0.11	78.22±4.88
	SM20	52.42±0.47	5.41±0.18	81.78±0.70
	SM40	51.26±1.90	5.26±0.09	88.63±15.93
	SM60	50.37±0.96	5.54±0.30	70.00±5.60
Após o desafio	SM0	70.05±1.95	22.80±0.88a ^{***}	91.77±4.52
	SM20	74.58±2.01	19.75±0.31ab ^{***}	106.80±9.35
	SM40	75.66±0.21	16.83±0.99b ^{***}	95.05±12.05
	SM60	72.40±1.37	16.39±0.72b ^{***}	112.34±15.09
<i>Efeitos principais médios</i>				
	SM0	61.51±3.93	14.08±3.92 ^a	85.00±4.24
	SM20	63.50±5.04	12.58±3.21 ^{ab}	94.29±6.99
	SM40	63.46±5.52	11.04±2.62 ^b	91.84±9.05
	SM60	61.39±4.98	10.96±2.45 ^b	91.17±11.90
Antes do desafio		51.76±0.58 ^b	5.39±0.09 ^b	76.66±4.26 ^b
Após o desafio		73.17±0.93 ^a	18.94±0.85 ^a	101.49±5.32 ^a
Two-way anova: P-values				
Antes do desafio		0.261	0.002	0.813
Após o desafio		<0.001	<0.001	0.007
Dietas		0.092	0.001	0.327

AST: Aspartate transaminase.

ALT: Alanine transaminase.

Dados são expressos como média ± SEM.

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos após a exposição a amônia. Asteriscos mostram as diferenças significativas (***) P < 0.001) em comparação com os níveis de spirulina correspondentes antes do desafio com amônia.

O status antioxidante hepático dos juvenis de pacu alimentados com diferentes níveis de SM é demonstrado na Tabela 5. A atividade hepática da CAT e TAC foi significativamente maior nos peixes alimentados com as dietas SM40 e SM60 se comparados as dietas SM0 e SM20, enquanto a maior atividade da SOD foi observada no grupo que recebeu a dieta SM60, comparada com os peixes alimentados com qualquer uma das outras dietas. Antes da exposição a amônia as maiores atividade da CAT e SOD foram observadas nos peixes alimentados com a dieta SM60, ao passo que os maiores de níveis da TAC foram nos grupos SM40 e SM60,

comparados aos peixes que receberam a dieta SM0. A exposição a amônia por 24h aumentou significativamente a atividade da CAT, SOD e TAC em todos os animais. Por outro lado, não foi observada interação significativa entre as dietas e a exposição a amônia, exceto para atividade da TAC (Tabela 5).

Após a exposição a amônia, a atividade hepática da CAT e da SOD foi significativamente maior nos peixes alimentados com a dieta SM60, comparados aos peixes do grupo SM0. Por outro lado, a exposição a amônia aumentou significativamente os níveis de TAC em todos os grupos, quando comparado aos mesmos tratamentos antes do desafio. Além disso não foram observadas diferenças significativas para os níveis de TAC em nenhuma das dietas testadas após a intoxicação por amônia.

Tabela 5. Efeitos da substituição de farinha de peixe por spirulina na atividade de enzimas antioxidantes hepáticas de juvenis de pacu, alimentados por cinco semanas, seguidos por 24 h de exposição a amônia.

Dietas	Desafio à amônia	CAT ($\mu\text{mol mg}^{-1} \text{protein}^{-1}$) ₁₎	SOD ($\text{U mg}^{-1} \text{protein}^{-1}$) ₁₎	TAC ($\mu\text{M L}^{-1}$)
<i>Médias individuais dos tratamentos</i>				
Antes do desafio	SM0	8.95±0.48 ^c	76.70±3.70 ^b	17.16±0.27 ^c
	SM20	10.74±0.38 ^b	102.84±9.90 ^{ab}	20.92±0.12 ^b
	SM40	12.13±0.25 ^{ab}	104,50±5.12 ^{ab}	25.18±0.61 ^a
	SM60	12.74±0.15 ^a	126.67±5.57 ^a	25.27±0.39 ^a
Após o desafio	SM0	13.41±0.77 ^B	85.15±3.00 ^C	30.59±0.38 ^{A***}
	SM20	14.24±0.18 ^{AB}	99.85±5.87 ^C	31.44±0.38 ^{A***}
	SM40	17.22±1.51 ^{AB}	118.66±0.80 ^B	29.88±0.81 ^{A***}
	SM60	17.91±0.74 ^A	138.40±4.57 ^A	30.02±0.20 ^{A***}
Efeitos principais médios				
	SM0	11.18±1.08 ^b	80.92±2.85 ^c	23.88±3.01 ^c
	SM20	12.49±0.80 ^b	101.35±5.19 ^b	26.18±2.36 ^b
	SM40	14.68±1.33 ^a	111.58±3.93 ^b	27.53±1.15 ^a
	SM60	15.33±1.20 ^a	132.53±4.15 ^a	27.65±1.08 ^a
Two-way anova: P-values				
	Antes do desafio	11.14±0.46 ^b	102.67±6.01	22.13±1.03 ^b
	Após o desafio	15.69±0.70 ^a	110.52±6.27	30.48±0.28 ^a
	Dietas	<0.001	<0.001	<0.001
	Amônia	<0.001	0.057	<0.001
	Dieta x amônia	0.229	0.424	<0.001

CAT: Catalase.

SOD: Superoxide dismutase.

TAC: Capacidade antioxidante total.

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos antes da exposição a amônia; enquanto que letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos após a exposição a amônia. Asteriscos mostram as diferenças significativas (***) P < 0,001) em comparação com os níveis de spirulina correspondentes antes do desafio com amônia.

A exposição a amônia levou a um aumento significativo nas concentrações de MDA hepático (Figura 1A). Os peixes alimentados com a dieta SM60 diminuíram significativamente os níveis de MDA em comparação ao grupo SM0 (Figura 1B). Os níveis dietéticos de spirulina e a exposição à amônia tiveram efeitos de interação significativos nos níveis de MDA. Após o

desafio, os níveis de MDA foram significativamente maiores em todos os tratamentos comparados aos mesmos níveis de spirulina antes da exposição a amônia (Figura 1C). As concentrações de MDA antes da exposição a amônia não apresentaram diferenças significativas para nenhuma das dietas testadas. Por outro lado, após a exposição a amônia, foi observada uma tendência de redução nos níveis de MDA com o aumento da *A. platensis* nas dietas, sendo que os peixes alimentados com até 60g/kg de spirulina apresentaram os menores níveis (Figura 1).

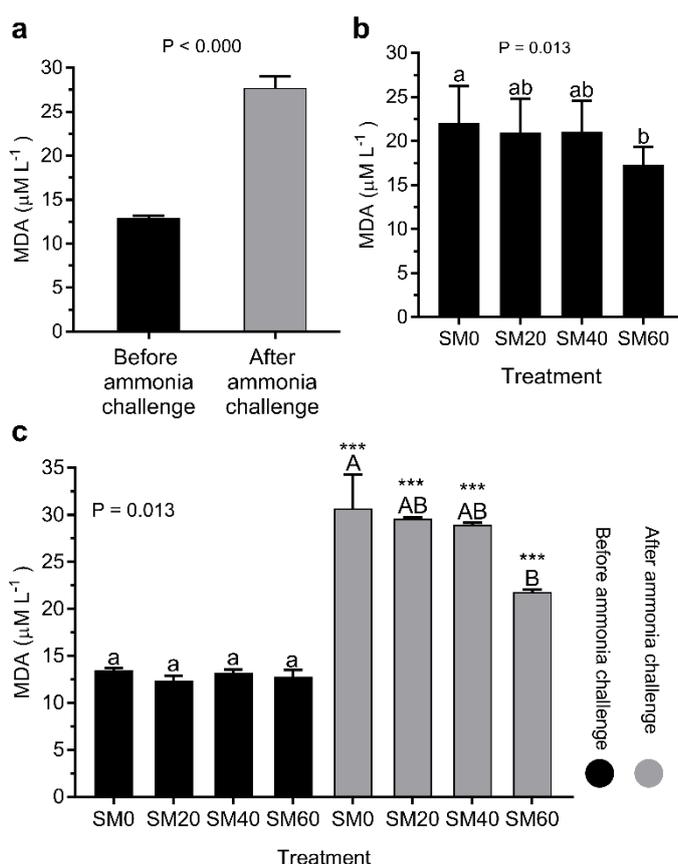


Figura 1. Concentração de MDA hepático em juvenis de pacu, alimentados com níveis crescentes de spirulina em substituição a farinha de peixe por cinco semanas, seguidos de 24 h de exposição a amônia. Concentração de MDA antes e depois da exposição a amônia (a); Concentrações de MDA nos diferentes tratamentos (b); Concentrações de MDA antes e depois da exposição a amônia nas diferentes dietas, letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos antes do desafio. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos antes e depois da exposição a amônia. Os asteriscos indicam diferenças significativas (***) $P < 0.001$ em comparação com os níveis de spirulina correspondentes antes do desafio (c).

4. Discussão

Os resultados do presente estudo demonstram que a farinha de peixe (60 g kg^{-1}) pode ser completamente substituída por SM, sem nenhum impacto negativo no desempenho de

crescimento e eficiência alimentar dos juvenis de pacu. Além disso, a sobrevivência observada foi de 100% em todos os tratamentos, indicando que a saúde dos animais não foi comprometida. Os peixes alimentados com as dietas SM40 e SM60 exibiram peso final, ganho de peso e SGR significativamente maiores aos que receberam a dieta SM0. Os mecanismos de ação da spirulina no crescimento dos peixes pode ser atribuído a presença de compostos bioativos, efeitos pré bióticos (Ramakrishnan et al., 2008), alto teor de proteínas, adequado perfil de aminoácidos e ácidos graxos (Becker, 2013; Nakagawa et al., 2007), alto teor de vitaminas (Abdel-Tawwab and Ahmad, 2009), atividade antioxidante e imunoestimulante (Ravi et al., 2010). O desempenho de crescimento elevado também foi relatado em outras espécies de peixe, quando alimentados com dietas contendo spirulina. Melhores taxas de crescimento foram observadas em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com até 30% de spirulina na dieta (Velasquez et al., 2016). A substituição de até 40% de FM por spirulina em dietas para tilápias (*O. mossambicus*) não causaram efeitos negativos no crescimento (Olvera-Novoa et al., 1998). Da mesma forma, Cao et al. (2018) observaram que a FM na dieta poderia ser totalmente substituída por *A. platensis*, sem causar efeitos adversos no crescimento da gibel carp (*Carassius gibelio*).

A spirulina, possui uma parede celular fina, composta de 80% de pectina e 20% de celulose (Cohen, 1997) e não contem fatores anti-nutrients, quando comparada a fontes de proteína de origem vegetal, o que resulta em uma melhor digestão e absorção pelos peixes (Nakagawa et al., 2007). No presente estudo, a taxa de eficiência alimentar e a taxa de eficiência proteica não apresentaram diferenças significativas entre os peixes alimentados com as dietas contendo spirulina e o grupo SM0. Por outro lado, o consumo alimentar foi significativamente maior nos peixes que receberam a dieta SM40, quando comparados aos alimentados com a dieta SP0. O aumento no feed intake nos peixes alimentados com spirulina pode ser atribuído a esta microalga melhorar a atratividade das dietas. Silva-Neto et al. (2012) relataram que a inclusão de 0,5% de spirulina na dieta pode ser utilizada como um atrativo alimentar nutricionalmente eficiente para *Litopenaeus vannamei*. Resultados semelhantes foram observados por Jaime-Ceballos et al. (2007), que relataram um aumento na atratividade em dietas com 5% de *A. platensis* para *L. schimitti*. Estes autores sugeriram que o aumento no feed intake, proporcionado pela spirulina, pode ser atribuído a compostos ativos responsáveis por sua atratividade, como: nucleotídeos, aminoácidos e/ou pigmentos.

Os parâmetros bioquímicos sanguíneos são uma ferramenta importantes para avaliar as condições gerais da saúde dos peixes, especialmente em situações de desequilíbrio ambiental ou nutricional (Adel et al., 2016; Gabriel et al., 2015; Kader et al., 2012). Estudos anteriores demonstraram que a inclusão de microalgas na dieta pode influenciar o metabolismo lipídico (Mustafa and Nakagawa, 1995; Xu et al., 2014). O presente estudo indicou que os níveis de TCHO e TG foram significativamente menores nos peixes alimentados com as dietas SM40 e SM60. Efeitos semelhantes foram observados rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com até 10% de spirulina na dieta (Yeganeh et al., 2015). Essa redução pode devido ao potencial efeito hipocolesterolêmico da spirulina. Além disso, a spirulina contém compostos antioxidantes como ficocianina, β -caroteno e compostos fenólicos, que diminuem os níveis lipídicos séricos (Colla et al., 2008).

Os peixes podem reagir a fatores de estresse ambiental, elevando os níveis plasmáticos de glicose (Barton, 2002). No presente estudo os níveis plasmáticos de glicose não diferiram entre os diferentes tratamentos, antes e após a exposição a amônia. Por outro lado, após a exposição a amônia a glicose plasmática aumentou significativamente em todos os tratamentos, quando comparado aos níveis antes da exposição. Estudos anteriores demonstraram que o aumento nos níveis de amônia ambiental leva a um aumento nos níveis plasmáticos de glicose dos peixes (Randall and Tsui, 2002; Yousefi et al., 2020). Esse aumento nos níveis plasmáticos de glicose, pode ser atribuído a uma demanda de energia para os peixes enfrentarem o estresse ambiental (Taheri Mirghaed et al., 2018).

A AST e ALT são enzimas metabólicas celulares encontradas em baixas concentrações no plasma sanguíneo dos peixes (Rama and Manjabhat, 2014). O aumento na atividade destas enzimas pode ser usado como um indicador na detecção de doenças, alterações em funções metabólicas ou danos no tecido (Firat et al., 2011; Rama and Manjabhat, 2014). No presente estudo, foi observado um aumento significativo nas atividades plasmáticas de AST e ALT em todos os tratamentos após a exposição a amônia. Esse aumento pode ser atribuído a danos causados nos hepatócitos, que liberam AST e ALT no espaço extracelular (Ozer et al., 2008) devido a toxicidade da amônia. Após serem liberadas a AST e ALT entram na corrente sanguínea e assim, aumentam os níveis séricos (Firat et al., 2011; Ozer et al., 2008). Além disso, foi relatado que AST e ALT desempenham um papel importante no sistema de desintoxicação da amônia em teleósteos (d'Apollonia and Anderson, 1980). Resultados semelhantes foram demonstrados para carpa comum (*Cyprinus carpio*), que apresentaram elevação nos níveis

circulantes de AST e ALT quando expostas a amônia (Rama and Manjabhat, 2014; Taheri Mirghaed et al., 2018). Por outro lado, após a exposição a amônia, os peixes alimentados com as dietas SM40 e SM60 demonstraram uma melhora significativa nas funções hepáticas, diminuindo os níveis de ALT, quando comparados aos pacus alimentados com a dieta SM0. Esse efeito protetor da Spirulina é atribuído as suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (Abdelkhalek et al., 2017). A suplementação de spirulina na dieta de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) demonstrou um efeito hepatoprotetor, reduzindo significativamente a atividade enzimática das transaminases hepáticas, quando estes animais foram expostos à deltametrina e diazinon (Abdelkhalek et al., 2017, 2015).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos reativos, chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo a sua eliminação realizada por mecanismos denominados antioxidantes (El Golli-Bennour and Bacha, 2011). O status antioxidante dos organismos podem ser avaliados através de testes de enzimas antioxidantes, as quais podem servir como biomarcadores do estresse oxidativo (Kohen and Nyska, 2002). As enzimas Superoxide dismutase (SOD) e catalase (CAT) são componentes importantes para desintoxicar ROS (Yilmaz, 2019). Visto que, a dismutação do O_2^- altamente reativo é catalisada pela SOD em H_2O_2 menos reativo, o qual é decomposto em água e oxigênio pela CAT (Mirghaed et al., 2020; Yilmaz, 2019). O aumento na atividade destas enzimas tem sido associado a mitigação do estresse oxidativo em peixes (Hoseini et al., 2019). No presente estudo a substituição de FM por SM proporcionou um aprimoramento na atividade hepática de CAT, SOD e TAC, sugerindo a ativação do sistema antioxidante protegendo os organismos de danos oxidativos (Teimouri et al., 2019; Yousefi et al., 2020; Zhang et al., 2018). Isso pode ser atribuído à compostos antioxidantes como ficocianina e β -caroteno, presentes na spirulina, que podem inibir geração de radicais livres e a peroxidação lipídica (Wu et al., 2016). Além disso, estudos anteriores sugeriram que dietas contendo spirulina podem melhorar os níveis de TAC dos peixes (Abdel-Latif and Khalil, 2014; Yu et al., 2018). Da mesma forma, no presente estudo o aumento hepático da TAC nos peixes alimentados com 40 e 60 g/kg de spirulina apresentam ação de eliminação de radicais livres.

A atividade hepática da CAT e SOD, após a exposição a amônia, foi semelhante aos níveis observados antes do desafio. Por outro lado, a TAC aumentou de forma significativa em todos os tratamentos após a exposição a amônia. Estes resultados indicam que a 60 g/kg de

spirulina estimularam o sistema antioxidante dos juvenis de pacu, mesmo após a intoxicação aguda por amônia, reduzindo o estresse oxidativo.

O malondialdeído (MDA) é o produto da peroxidação lipídica, leva à toxicidade celular e acelera o dano às células e aos tecidos, também pode ser usado como um dos índices da peroxidação lipídica (Halliwell, 2012; Liu et al., 2010). No presente estudo não foram observadas diferenças significativas nos níveis de MDA antes da exposição a amônia. Embora os níveis de MDA terem aumentado de forma significativa em todos os tratamentos após o desafio à amônia, 60g/kg de *A. platensis* suprimiu significativamente a peroxidação lipídica nos juvenis de pacu. Da mesma forma, Xing et al. (2016) relataram que a toxicidade da levou ao aumento do nível de MDA em amônia *Ctenopharynodon idella*. Os resultados da peroxidação lipídica no presente estudo estão de acordo com Abdelkhalek et al. (2015), que observaram redução nos níveis de MDA no fígado de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), suplementadas com *A. platensis*. Os resultados deste estudo indicam um possível papel protetor de 60g/kg de *A. platensis* por intoxicação à amônia por 24h, pois reduziu a peroxidação lipídica no fígado de juvenis de pacu. Além disso, a SM proporcionou um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, as quais desempenham um papel muito importante na mitigação e resistência aos danos causados pela peroxidação lipídica (Liu et al., 2010). A spirulina, possui em sua composição compostos antioxidantes, ficocianina e β -caroteno, que podem elevar o status antioxidante, individualmente ou por uma ação sinérgica (Teimouri et al., 2019).

Conclusão

A substituição da farinha de peixe por até 60g/kg de *Arthrospira platensis*, melhorou o desempenho de crescimento dos juvenis de pacu sem afetar a eficiência alimentar, reduzindo os níveis plasmáticos de colesterol total, triglicerídeos e LDL. Além disso, os presentes resultados indicam um papel hepatoprotetor da spirulina, atenuando o aumento induzido pela exposição por amônia na atividade de ALT e AST, estimulando o sistema antioxidante e suprimindo o estresse oxidativo. Portanto, a suplementação com 60g/kg de spirulina platensis na dieta pode aumentar o crescimento e a resistência a intoxicação por amônia em juvenis de pacu.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), bolsas nº 304940 / 2014-3 e 142263 / 2016-8; e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para apoio financeiro.

Referências

- Abdel-Latif, H.M.R., Khalil, R.H., 2014. Evaluation of two Phytobiotics, *Spirulina platensis* and *Origanum vulgare* extract on Growth, Serum antioxidant activities and Resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to pathogenic *Vibrio alginolyticus*, International Journal of Fisheries and Aquatic Studies.
- Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., 2009. Live *Spirulina (Arthrospira platensis)* as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. Aquac. Res. 40, 1037–1046.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02195.x>
- Abdelkhalek, N.K.M., Eissa, I.A.M., Ahmed, E., Kilany, O.E., El-Adl, M., Dawood, M.A.O., Hassan, A.M., Abdel-Daim, M.M., 2017. Protective role of dietary *Spirulina platensis* against diazinon-induced Oxidative damage in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 54, 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.07.002>
- Abdelkhalek, N.K.M., Ghazy, E.W., Abdel-Daim, M.M., 2015. Pharmacodynamic interaction of *Spirulina platensis* and deltamethrin in freshwater fish Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: impact on lipid peroxidation and oxidative stress. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 3023–3031. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3578-0>
- Adel, M., Yeganeh, S., Dadar, M., Sakai, M., Dawood, M.A.O., 2016. Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). Fish Shellfish Immunol. 56, 436–444. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.003>
- Barbieri, E., Bondioli, A.C.V., 2015. Acute toxicity of ammonia in Pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels. Aquac. Res. 46, 565–571. <https://doi.org/10.1111/are.12203>
- Barton, B.A., 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids 1.
- Becker, E.W., 2013. Microalgae for Aquaculture: Nutritional Aspects, in: Handbook of

- Microalgal Culture. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, UK, pp. 671–691.
<https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch36>
- Benli, A.Ç.K., Köksal, G., Özkul, A., 2008. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere* 72, 1355–1358. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.037>
- Cao, S.-P., Zou, T., Zhang, P.-Y., Han, D., Jin, J.-Y., Liu, H.-K., Yang, Y.-X., Zhu, X.-M., Xie, S.-Q., 2018. Effects of dietary fishmeal replacement with *Spirulina platensis* on the growth, feed utilization, digestion and physiological parameters in juvenile gibel carp (*Carassis auratus gibelio* var. CAS III). *Aquac. Res.* 49, 1320–1328.
<https://doi.org/10.1111/are.13590>
- Cohen, Z., 1997. The chemicals of Spirulina, in: *Spirulina Platensis Arthrospira*. CRC Press, pp. 193–222.
- Colla, L.M., Muccillo-Baisch, A.L., Vieira Costa, J.A., 2008. Spirulina platensis effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 51, 405–411.
<https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000200022>
- d'Apollonia, S., Anderson, P.D., 1980. Optimal Assay Conditions for Serum and Liver Glutamate Oxaloacetate Transaminase, Glutamate Pyruvate Transaminase, and Sorbitol Dehydrogenase from the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37, 163–169. <https://doi.org/10.1139/f80-021>
- El Golli-Bennour, E., Bacha, H., 2011. Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. *Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.06.002>
- Firat, Ö., Cogun, H.Y., Yüzereroğlu, T.A., Gök, G., Firat, Ö., Kargin, F., Kötemen, Y., 2011. A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol. Biochem.* 37, 657–666. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9466-3>
- Gabriel, N.N., Qiang, J., He, J., Ma, X.Y., Kpundeh, M.D., Xu, P., 2015. Dietary Aloe vera supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). *Fish Shellfish Immunol.* 44, 504–514. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.002>
- Halliwell, B., 2012. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr. Rev.* 70, 257–265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>

- Hoseini, S.M., Yousefi, M., Hoseinifar, S.H., Van Doan, H., 2019. Antioxidant, enzymatic and hematological responses of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with myrcene- or menthol-supplemented diets and exposed to ambient ammonia. *Aquaculture* 506, 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.048>
- Jaime-Ceballos, B., Civera Cerecedo, R., Villarreal, H., Galindo López, J., Pérez-Jar, L., 2007. Use of *Spirulina platensis* meal as feed attractant in diets for shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Hidrobiológica* 17, 113–117.
- Kader, M.A., Bulbul, M., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Nguyen, B.T., Komilus, C.F., 2012. Effect of complete replacement of fishmeal by dehulled soybean meal with crude attractants supplementation in diets for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 350–353, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.009>
- Kohen, R., Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* <https://doi.org/10.1080/01926230290166724>
- Liu, B., Xie, J., Ge, X., Xu, P., Wang, A., He, Y., Zhou, Q., Pan, L., Chen, R., 2010. Effects of anthraquinone extract from *Rheum officinale* Bail on the growth performance and physiological responses of *Macrobrachium rosenbergii* under high temperature stress. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.018>
- Mirghaed, A.T., Paknejad, H., Mirzargar, S.S., 2020. Hepatoprotective effects of dietary *Artemisia* (*Artemisia annua*) leaf extract on common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient ammonia. *Aquaculture* 527, 735443. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735443>
- Mustafa, M.G., Nakagawa, H., 1995. A review: Dietary benefits of algae as an additive in fish feed. *Isr. J. Aquac.* 47, 155–162.
- Nakagawa, H., Sato, M., Gatlin, D.M., 2007. Dietary Supplements for the Health and quality of cultured fish, *Dietary Supplements for the Health and Quality of Cultured Fish*. CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9781845931995.0000>
- Olvera-Novoa, M.A., Dominguez-Cen, L.J., Olivera-Castillo, L., Martinez-Palacios, C.A., 1998. Effect of the use of the microalga *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. *Aquac. Res.* 29, 709–715. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.29100709.x>
- Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., Schomaker, S., 2008. The current state of serum

- biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 245, 194–205.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.11.021>
- Rama, S., Manjabhat, S.N., 2014. Protective effect of shrimp carotenoids against ammonia stress in common carp, *Cyprinus carpio*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 107, 207–213.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.016>
- Ramakrishnan, C.M., Haniffa, M.A., Manohar, M., Dhanaraj, M., Arockiaraj, A.J., Seetharaman, S., Arunsingh, S. V, 2008. Effects of Probiotics and Spirulina on Survival and Growth of Juvenile Common Carp (*Cyprinus carpio*), *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*.
- Randall, D.J., Tsui, T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish, in: *Marine Pollution Bulletin*. Pergamon, pp. 17–23. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00227-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00227-8)
- Ravi, M., Lata, S., Syed, D., Solomon, A., Paul, F.D., 2010. Nutrition and Dietary Supplements Dovepress The beneficial effects of spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties.
- Silva-Neto, J.F., Nunes, A.J.P., Sabry-Neto, H., Sá, M.V.C., 2012. Spirulina meal has acted as a strong feeding attractant for *Litopenaeus vannamei* at a very low dietary inclusion level. *Aquac. Res.* 43, 430–437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02846.x>
- Taheri Mirghaed, A., Hoseini, S.M., Ghelichpour, M., 2018. Effects of dietary 1,8-cineole supplementation on physiological, immunological and antioxidant responses to crowding stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 81, 182–188.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.07.027>
- Teimouri, M., Yeganeh, S., Mianji, G.R., Najafi, M., Mahjoub, S., 2019. The effect of *Spirulina platensis* meal on antioxidant gene expression, total antioxidant capacity, and lipid peroxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 45, 977–986. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-0608-3>
- Velasquez, S.F., Chan, M.A., Abisado, R.G., Traifalgar, R.F.M., Tayamen, M.M., Maliwat, G.C.F., Ragaza, J.A., 2016. Dietary *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) replacement enhances performance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Appl. Phycol.* 28, 1023–1030. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0661-y>
- Wilson, R.P., 2002. Aminoacids and proteins. In: *Fish nutrition*, In: *Fish nutrition*.
<https://doi.org/10.1016/B978-012319652-1/50004-5>
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., Kuča, K., 2016. The antioxidant,

- immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. *Arch. Toxicol.* <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1744-5>
- Xing, X., Li, M., Yuan, L., Song, M., Ren, Q., Shi, G., Meng, F., Wang, R., 2016. The protective effects of taurine on acute ammonia toxicity in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Fish Shellfish Immunol.* 56, 517–522. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.005>
- Xu, W., Gao, Z., Qi, Z., Qiu, M., Peng, J.Q., Shao, R., 2014. Effect of dietary chlorella on the growth performance and physiological parameters of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* 14, 53–57. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_1_07
- Yeganeh, S., Teimouri, M., Amirkolaie, A.K., 2015. Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Res. Vet. Sci.* 101, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.06.002>
- Yilmaz, S., 2019. Effects of dietary blackberry syrup supplement on growth performance, antioxidant, and immunological responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Plesiomonas shigelloides*. *Fish Shellfish Immunol.* 84, 1125–1133. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.012>
- Yousefi, M., Vatnikov, Y.A., Kulikov, E.V., Plushikov, V.G., Drukovsky, S.G., Hoseinifar, S.H., Van Doan, H., 2020. The protective effects of dietary garlic on common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient ammonia toxicity. *Aquaculture* 526, 735400. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735400>
- Yu, W., Wen, G., Lin, H., Yang, Y., Huang, X., Zhou, C., Zhang, Z., Duan, Y., Huang, Z., Li, T., 2018. Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, hematological and serum biochemical parameters, hepatic antioxidant status, immune responses and disease resistance of Coral trout *Plectropomus leopardus* (Lacepede, 1802). *Fish Shellfish Immunol.* 74, 649–655. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.024>