



ALINE PEREIRA COLI

**RESPOSTAS METABÓLICAS E DE
CRESCIMENTO EM JUVENIS DE *Danio rerio*
ALIMENTADOS COM DIETAS
SUPLEMENTADAS COM *SPIRULINA PLATENSIS***

**LAVRAS – MG
2022**

ALINE PEREIRA COLI

RESPOSTAS METABÓLICAS E DE CRESCIMENTO EM JUVENIS DE *Danio rerio* ALIMENTADOS COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM *SPIRULINA PLATENSIS*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Fisiologia e Metabolismo Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador
Dr. William Franco Carneiro
Coorientador

**LAVRAS – MG
2022**

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

Coli, Aline Pereira.

Respostas metabólicas e de crescimento em juvenis de
alimentados com dietas suplementadas com / Aline Pereira Coli. -
2022.

55 p.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Coorientador(a): William Franco Carneiro.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Nutrição. 2. Microalga. 3. Zebrafish. I. Murgas, Luis David
Solis. II. Carneiro, William Franco. III. Título.

ALINE PEREIRA COLI

RESPOSTAS METABÓLICAS E DE CRESCIMENTO EM JUVENIS DE *Danio rerio* ALIMENTADOS COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM *SPIRULINA PLATENSIS*

METABOLIC AND GROWTH RESPONSES IN DANIO RERIO JUVENILES FED WITH DIETS SUPPLEMENTED WITH *SPIRULINA PLATENSIS*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Fisiologia e Metabolismo Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA 27 de maio de 2022.

Dr. Luis David Solis Murgas UFLA
Dr. Marcos Ferrante UFLA
Dr. Carlos Martinez Palácios UMSNH
Dr. William Franco Carneiro UFLA



Prof. Luis David Solis Murgas
Médico Veterinário CRMV 9182
Professor Titular - DMV - UFLA

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador
Dr. William Franco Carneiro
Coorientador

**LAVRAS – MG
2022**

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, pela vida e por sustentar minha fé.

Aos meus pais, Silvio e Valéria, meus maiores exemplos de virtudes humanas.

À minha irmã, Júlia, por todo companheirismo, amor e amizade de sempre.

A todos meus amigos e familiares que caminharam comigo e me apoiaram nessa conquista.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da Universidade Federal de Lavras e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo suporte para realização desse trabalho.

Ao meu orientador professor, Luis David Solis Murgas, por toda disponibilidade, ensino, benevolência, orientação, incentivo e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao meu coorientador, William Franco Carneiro, por todo conhecimento, dedicação, assistência, cordialidade, incentivo, disposição e convivência durante o mestrado.

A todos os membros do NEPAD por tornarem meu dia-a-dia mais alegre, em especial à Kiara e a Fatinha, pela amizade, companheirismo e ensino.

A todos os funcionários do DMV/UFLA pela disposição em ajudar.

Ao meu namorado, João Pedro, por toda torcida, compreensão e apoio durante esses anos.

À Iza e ao seu filho Pedro, por incentivarem na minha fé e me acolherem nos momentos em que mais precisei.

A todos os animais, que de alguma forma, contribuíram para meus estudos e deixaram marcado meu compromisso em respeitá-los.

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

RESUMO

O zebrafish (*Danio rerio*) é um importante modelo animal para as pesquisas biomédicas devido às suas várias vantagens, como a semelhança genética com mamíferos, curto intervalo de geração e custo baixo de estocagem. No entanto, há poucas pesquisas nutricionais com essa espécie e ainda não foram padronizadas dietas que otimizem seu uso em laboratórios. A partir disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar as respostas metabólicas e de crescimento em juvenis de *D. rerio* alimentados com suplementação dietética de *Spirulina platensis* em diferentes níveis durante 77 dias. Foram formuladas seis dietas isoproteicas, isocalóricas e isofosfóricas, com a inclusão de spirulina nos níveis de 0, 2, 4, 6, 8 e 10% (SP0, SP2, SP4, SP6, SP8 e SP10). Um total de 300 juvenis de zebrafish com 50 dias pós-fertilização, foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (dietas), cada grupo contendo cinco repetições com 10 animais por réplica. Ao final do experimento os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças detectadas pelo teste Tukey. Uma análise de regressão foi feita para os dados de peso final e taxa de crescimento específico e o nível de significância para comparação dos tratamentos foi 5%. Após 77 dias de alimentação, os animais alimentados com a dieta SP6 apresentaram valores significativamente maiores para peso final e taxa de crescimento específico quando comparados aos que foram alimentados com as dietas contendo os demais níveis de suplementação. O fator de condição foi significativamente maior nas dietas SP6 e SP8 em relação a SP0, já o ganho de peso foi maior ($P < 0,05$) nos níveis de 4 a 10% de suplementação em relação a SP0 e o comprimento furcal foi maior ($P < 0,05$) nos tratamentos SP4 e SP6 em relação a SP2. Não foram observadas diferenças significativas em relação a sobrevivência. As dietas SP4, SP6, SP8 e SP10 diminuíram os níveis de triglicérides, já os níveis de colesterol total não foram afetados. A atividade da lipase foi maior nos animais alimentados com as dietas SP6 e SP8 em relação ao controle e a amilase não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. A atividade da CAT foi maior ($P < 0,05$) nos peixes alimentados com as dietas SP8 em relação a dieta SP0. A atividade da SOD foi maior ($P < 0,05$) no grupo que consumiu a dieta SP10 em relação as dietas SP0 e SP2. A atividade da GST foi maior ($P < 0,05$) nos animais alimentados com as dietas SP6, SP8 e SP10 em relação ao grupo SP0. Não foram observadas diferenças significativas em relação ao leucograma e a avaliação da frequência nos quatro estádios de maturação dos ovócitos. Já o diâmetro médio dos ovócitos no estágio I foi maior ($P < 0,05$) no tratamento SP2 em relação ao SP10 e no estágio IV os tratamentos SP4 e SP8 apresentaram maiores diâmetros ($P < 0,05$) médios e o SP0 o menor. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a suplementação dietética de *Spirulina platensis* aumenta os parâmetros de crescimento, reduz os níveis de triglicérides, aumenta atividade da lipase, melhora o estresse oxidativo e aumenta o diâmetro médio dos ovócitos sem afetar a sobrevivência, os parâmetros imunológicos de juvenis de zebrafish.

Palavras-chave: Zebrafish. Nutrição. Aditivo alimentar. Microalga

ABSTRACT

Zebrafish (*Danio rerio*) is an important animal model for biomedical research, because its many advantages, such as genetic similarity to mammals, short generation interval and low storage cost. However, there is little nutritional research with this species and diets that optimize in laboratories have not yet been standardized. From this, the objective of this work was evaluated as metabolic and growth responses in *Danio rerio* juveniles fed with dietary supplementation of *Spirulina platensis* in different environments for 77 days. Six isoprotein, isocaloric and isophosphoric diets were formulated, with the inclusion of Spirulina at levels of 0, 2, 4, 6, 8 and 10% (SP0, SP2, SP4, SP6, SP8 e SP10). A total of 300 zebrafish juveniles 50 days post-fertilization were randomly assigned to six groups (diets), each group containing five replicates with 10 replicate animals. At the end, the data were selected for analysis of variance (ANOVA) and as models tested by the Tukey test. A regression analysis was performed for the growth rate data and the treatment level of the treatments. After 77 days of feeding, the animals fed the SP6 diet showed significantly higher values for final weight and specific growth rate when compared to those fed diets containing the other levels of supplementation. The condition factor was significantly higher in SP6 and SP8 diets compared to SP0, weight gain was higher ($P<0.05$) at 4 to 10% supplementation levels compared to SP0 and furcal length was greater ($P<0.05$) in SP4 and SP6 treatments in relation to SP2. No significant differences were observed regarding survival. The SP4, SP6, SP8 and SP10 diets decreased triglyceride levels, while total cholesterol levels were not affected. Lipase activity was higher in animals fed SP6 and SP8 diets compared to control and amylase did not show significant differences between treatments. CAT activity was higher ($P<0.05$) in fish fed SP8 diets compared to SP0 diet. SOD activity was higher ($P<0.05$) in the group that consumed the SP10 diet compared to the SP0 and SP2 diets. GST activity was higher ($P<0.05$) in animals fed SP6, SP8 and SP10 diets than in the SP0 group. No significant differences were observed in relation to the leukogram and the evaluation of the frequency in the four stages of maturation of the oocytes. The mean diameter of oocytes in stage I was higher ($P<0.05$) in the SP2 treatment compared to SP10 and in stage IV the SP4 and SP8 treatments had the highest mean diameters ($P<0.05$) and SP0 the smallest. From the results obtained, it is concluded that dietary supplementation of *Spirulina platensis* increases growth parameters, reduces triglyceride levels, increases lipase activity, improves oxidative stress and increases the mean diameter of oocytes without affecting survival, immunological parameters of zebrafish juveniles.

Keywords: Zebrafish. Nutrition. Food additive. Microalgae

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1- Ação associada das enzimas antioxidantes contra as espécies reativas de oxigênio. As siglas SOD, CAT, GST, GR, GPX e G6PDH correspondem, respectivamente, as enzimas: superóxido dismutase, catase, glutatona s transferase, glutatona reductase, glutatona peroxidase e glicose-6-fosfatodehidrogenase.....	19
Figura 2– Fator de condição de juvenis de zebrafish (<i>Danio rerio</i>) após alimentação com níveis crescentes de <i>Spirulina platensis</i> por 77 dias. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes usando análise de variância e o teste de Tukey ($p < 0,05$)	30
Figura 3– Comprimento furcal de juvenis de zebrafish (<i>Danio rerio</i>) após alimentação com níveis crescentes de <i>Spirulina platensis</i> por 77 dias. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes usando análise de variância e o teste de Tukey ($p < 0,05$)	30
Figura 4 – (A) Peso final e (B) taxa de crescimento específico de juvenis de zebrafish (<i>Danio rerio</i>) após alimentação com níveis crescentes de <i>Spirulina platensis</i> por 76 dias	31
Figura 5- Níveis de colesterol total (A) e triglicérides (B) de juvenis de zebrafish (<i>Danio rerio</i>) alimentados com dietas suplementadas em níveis crescentes de <i>Spirulina platensis</i> durante 77 dias	33
Figura 6– Atividade da amilase (A) e lipase (B) de intestino de juvenis de zebrafish (<i>Danio rerio</i>) após alimentação com níveis crescentes de <i>Spirulina platensis</i> por 77 dias. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes usando análise de variância e o teste de Tukey ($p < 0,05$)	34
Figura 7- Efeitos da suplementação de <i>Spirulina platensis</i> na atividade de catalase (A), superóxido dismutase (B) e glutatona s transferase (C) e MDA (D) em juvenis de zebrafish alimentados por 77 dias. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes usando análise de variância e o teste de Tukey ($p < 0,05$)	36
Figura 8- Efeitos da suplementação de <i>Spirulina platensis</i> na contagem diferencial de células de defesa em juvenis de zebrafish (<i>Danio rerio</i>) alimentados por 77 dias.	37
Figura 9- Efeitos da suplementação de <i>Spirulina platensis</i> na frequência (A) e diâmetro médio (B) dos estádio I, II, III e IV de maturação ovocitária em juvenis de Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) alimentados por 77 dias. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes usando análise de variância e o teste de Tukey ($p < 0,05$)	40
Figura 10- Classificação dos estádios ovocitários avaliados na imagem histológica	41
Tabela 1- Composição das rações com diferentes níveis de inclusão de <i>Spirulina Platensis</i>	24

Tabela 2- Parâmetros de crescimento de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) após a alimentação com níveis crescentes de *Spirulina platensis* na dieta por 77 dias 29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GST	Glutathione S-transferase
GR	Glutathione reductase
GPX	Glutathione peroxidase
G6PDH	Glicose-6-fosfato dehidrogenase
GSH	Glutathione
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animais
SP0	Nível de suplementação de Spirulina 0%
SP2	Nível de suplementação de Spirulina 2%
SP4	Nível de suplementação de Spirulina 4%
SP6	Nível de suplementação de Spirulina 6%
SP8	Nível de suplementação de Spirulina 8%
SP10	Nível de suplementação de Spirulina 10%
TCE	Taxa de crescimento específico
MDA	Malondialdeído
DZN	Diazinon
SDS	dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3.1 Zebrafish como modelo animal	13
3.2 Spirulina na alimentação de peixes	15
3.3 Impacto dos fatores nutricionais no crescimento.....	16
3.4 Nutrição e os parâmetros bioquímicos.....	17
3.5 Influência nutricional sobre a imunidade e estresse oxidativo de peixes.....	18
3.6 Impacto da nutrição dos peixes na maturação sexual	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Preceitos éticos	22
4.2 Desenho experimental e tratamentos	22
4.3 Crescimento	24
4.4 Análises bioquímicas	25
4.5 Avaliação de enzimas digestivas	25
4.6 Avaliação do estresse oxidativo.....	26
4.7 Preparação do extrato e atividade antioxidante da Spirulina.....	27
4.8 Contagem diferencial de células de defesa	28
4.9 Avaliação do desenvolvimento ovocitário	28
4.10 Análises estatísticas.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Crescimento	29
5.2 Parâmetros bioquímicos	33
5.3 Atividade das enzimas digestivas.....	34
5.4 Status antioxidante e leucograma	36
5.5 Desenvolvimento ovocitário	39
6. CONCLUSÃO	42
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
8 REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

Para a evolução da ciência, a experimentação animal tem relevante papel. O zebrafish (*Danio rerio*) é um importante modelo animal para pesquisas biomédicas devido ao seu baixo custo de manutenção, fácil manuseio, embrião transparente, curto intervalo de geração, alta taxa de fecundidade e similaridade genética com humanos (WATTS et al., 2016). A utilização dessa espécie possui destaque nas áreas da neurologia, embriologia e farmacogenética por ser possível acompanhar as fases de desenvolvimento e pela facilidade de manutenção em relação aos modelos mamíferos, como os roedores (RIVERO-WENDT et al., 2020).

Em condições laboratoriais, é essencial conhecer a composição das dietas utilizadas na alimentação dos peixes, uma vez que a mesma interfere nas respostas biológicas dos animais (SASSI, 2016). Efeitos indesejáveis na saúde e desempenho dos peixes podem ser causados por uma nutrição inadequada. Ademais, o excesso ou a falta de nutrientes podem induzir alterações fisiológicas e moleculares. Deste modo, assegurar que a fonte de alimentação seja equilibrada e desprovida de contaminação é essencial para a saúde animal e também para a obtenção de resultados confiáveis nas pesquisas (MARTINS et al., 2020).

Na literatura existem poucos estudos relacionados à nutrição do zebrafish, mesmo com seu crescente uso nas pesquisas. As necessidades nutricionais e protocolos alimentares ainda não foram padronizados para essa espécie. Assim, a falta de conhecimento sobre os requerimentos de um organismo modelo corresponde a um desafio nas pesquisas e impede a padronização de protocolos nutricionais (FOWLER et al., 2020). Logo, atender às exigências nutricionais e avaliar diferentes ingredientes pode melhorar a saúde e o estado fisiológico dos animais (FERNANDES; PERES; CARVALHO, 2016). A inclusão de aditivos nas dietas contribuem para aumentar a produtividade dos peixes (FARAG et al., 2021; NAIEL et al., 2021). As microalgas ganharam espaço na aquicultura por possuírem alto valor nutricional, sendo a *Spirulina* uma das espécies mais produzidas comercialmente (FARAG et al., 2016). No entanto, as influências benéficas dessa microalga para peixes são específicas para certas espécies e dependem da porcentagem utilizada nas dietas (FARAG et al., 2021). Por isso, é essencial que estudos com novos ingredientes sejam desenvolvidos para o *D. rerio* a fim de contribuir com o desenvolvimento de dietas que possam ser usadas em laboratórios,

permitindo assim a obtenção de resultados mais coesos que contribuam para o desenvolvimento científico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi avaliar as respostas metabólicas e de crescimento em juvenis de *D. rerio* alimentados com suplementação dietética de *Spirulina platensis* em diferentes níveis.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento através dos parâmetros de peso final, taxa de crescimento específico, ganho de peso, fator de condição e comprimento de juvenis de zebrafish alimentados com diferentes níveis de suplementação de *Spirulina platensis*;
- Avaliar as variáveis metabólicas (colesterol total e triglicerídeos) e a atividade das enzimas digestivas amilase e lipase nos diferentes níveis de inclusão do aditivo;
- Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutationa S-transferase) e da peroxidação lipídica;
- Avaliar a contagem diferencial de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos;
- Avaliar o desenvolvimento ovocitário das fêmeas de zebrafish durante a fase de desenvolvimento pré-púbere através da frequência e diâmetro médio dos oócitos em diferentes estágios de maturação.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Zebrafish como modelo animal

O zebrafish (*D. rerio*) é um peixe teleósteo tropical de água doce, nativo da Ásia e pertence à família Cyprinidae. A espécie mede em torno de 4 a 5 cm quando adulto e tem o padrão de cor distinta alternando listras horizontais claras e escuras (SPENCE et al., 2008). Também possui dimorfismo sexual, os machos são mais afilados e dourados e as fêmeas mais prateadas e arredondadas, principalmente na região ventral (SUWA e YAMASHITA, 2007). É um peixe encontrado em regiões alagadiças de águas rasas, paradas ou de baixa movimentação, com ocorrência de variações de pH e temperatura. Assim, a espécie é considerada extremamente resistente às variações ambientais (LÓPEZ-OLMEDA e SÁNCHEZ- VÁZQUEZ, 2011).

As pesquisas biomédicas dependem do uso de modelos animais para desenvolver e testar novas terapias e para compreender a patogenia das doenças humanas nos níveis celulares e moleculares. O *D. rerio* é um excelente modelo para pesquisa em várias áreas, como a farmacologia, neurologia e embriologia (LIESCHKE e CURRIE, 2007). Essa espécie possui várias vantagens, como fácil manuseio, rápido desenvolvimento com curto intervalo de geração (aproximadamente 3 meses) e transparência óptica dos embriões e larvas (LAMASON et al., 2005). Também possui possibilidade de alta estocagem pelo tamanho pequeno, custo de utilização inferior ao de camundongos (LIESCHKE e CURRIE, 2007), grande número de ovos por fêmea em uma única desova (cerca de 100 ovos), genoma inteiramente sequenciado e alta homologia genética com humanos (aproximadamente 70%) (HOWE et al., 2013).

Em ambiente natural, o zebrafish possui hábito alimentar onívoro oportunista, se alimentando de zooplâncton, insetos e fitoplâncton (SPENCE e SMITH, 2006). No entanto, mesmo com o crescente uso desse modelo animal, as necessidades nutricionais dessa espécie não estão completamente definidas (CARVALHO et al., 2021). Assim, as dietas são formuladas de acordo com os requerimentos nutricionais de outros ciprinídeos tropicais onívoros, como a carpa comum (*Cyprinus carpio*). Dados sobre a carpa estão disponíveis e podem ser usados como padrão razoável quando falta informação específica sobre o zebrafish (DAMMSKI et al., 2011).

Alguns autores estimaram as exigências proteicas para juvenis de zebrafish (FERNANDES; PERES; CARVALHO, 2016; SASSI, 2016). Atualmente, nenhum intervalo ideal de lipídeos foi determinado para o *D. rerio*. No entanto, sabe-se que

os peixes de água doce, como o zebrafish requerem uma dieta com maior nível de ácidos graxos n-6 em relação a n-3 (FOWLER et al., 2020). As exigências para fósforo em nessa espécie foram estudadas, sendo observado que o melhor nível desse mineral em dietas foi de 1,55% (COSTA, 2015). De acordo com o NRC (2011), uma proporção ideal de cálcio e fosforo em torno de 2:1 comumente produz um crescimento adequado boas taxas de sobrevivência na maioria das espécies aquáticas.

Nos últimos anos a nutrição é enfatizada como um pilar essencial para as pesquisas (FOWLER et al., 2020), pois permite aos pesquisadores desenvolver e utilizar padrões nutricionais elevados para os modelos animais. Assim, avanços na nutrição do zebrafish devem continuar para contribuir com a comunidade acadêmica (WATTS; POWELL; D'ABRAMO, 2012).

3.2 Spirulina na alimentação de peixes

As microalgas possuem níveis médios a altos de proteína bruta, variando entre 28% e 71% da matéria seca e com bom perfil de aminoácidos (BECKER, 2007; TIBALDI et al., 2015). Também são fontes de ácidos graxos essenciais, vitaminas, minerais e pigmentos (WALKER e BERLINSKY, 2011). Assim, devido ao alto teor nutricional, são uma alternativa promissora para potencializar o valor nutritivo das rações para a aquicultura (LUPATSCH, 2009; VIZCAÍNO et al., 2014).

Dentre as microalgas largamente estudadas e produzidas em escala comercial nas diversas regiões do mundo, destaca-se a *Spirulina sp.*, uma cianobactéria que pertence ao filo Cyanobacteria e ao gênero *Arthrospira*, sendo as espécies *Arthrospira maxima* e *Arthrospira platensis* as mais cultivadas. No entanto, são conhecidas como *Spirulina maxima* e *Spirulina platensis*, pois eram consideradas membros da espécie *Spirulina sp.*, o que justifica o nome comumente utilizado (SCHMID; BOLD; WYNNE, 1985). Essas duas espécies são as mais utilizadas como alimento devido ao elevado teor de nutrientes e benefícios para a saúde humana e animal (FARAG et al., 2016; TOMASELLI; PALANDRI; TREDICI, 1996).

A *Spirulina* se destaca pela composição de micro e macronutrientes, sendo um alto teor de proteína (55-70% por peso seco), ácidos graxos poli-insaturados,

contendo ácido gamalinolênico, ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico, ácidodecosahexaenóico, ácido araquidônico e ácido estearidônico (SJORS e ALESSVERO, 2010; ZHANG et al., 2020). Também é rica em vitaminas (vitamina C, vitamina D, vitamina E, cianocobalamina, piridoxina, nicotinamida, riboflavina e tiamina), minerais (ferro, cálcio, cobre, cromo, magnésio, manganês, fósforo, potássio, sódio e zinco) e pigmentos, como carotenos, ficocianinae clorofila (SJORS e ALESSVERO, 2010; SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

A utilização de *Spirulina sp.* dietética gerou bons resultados em diversas espécies. Observou-se efeitos imunoestimuladores no sistema imunológico inato da carpa comum (*C. carpio*) (WATANUKI et al., 2006), em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) houve aumentono crescimento (VELASQUEZ et al., 2016), o espadinha (*Xiphophorus helleri*) apresentou aumento no desempenho reprodutivo e no crescimento (VASUDEVAN et al., 2006), o ciclídeo acei de cauda amarela (*Pseudotropheus acei*) e zebrafish obtiveram melhores parâmetros reprodutivos (GEFFROY e SIMON, 2013; GÜROY et al., 2012). A adição de pequenas quantidades de Spirulina, sendo de 1 a 10%, demonstra ser uma possibilidade para aumentar o valor nutricional das dietas para peixes (ANAYA-ROSAS et al., 2019).

3.3 Impacto dos fatores nutricionais no crescimento

As dietas possuem efeito sobre o crescimento adequado dos peixes, e por isso, devem atender às necessidades nutricionais de cada espécie. Alimentar os animais com dietas desequilibradas e que não atendem às exigências alimentares podem causar deficiência nutricional ou toxicidade em casos de níveis elevados de algum nutriente (OLIVA-TELES, 2012; TRICHET, 2010). Assim, ao avaliar os potenciais benefícios da suplementação dietética é essencial garantir que os peixes sejam alimentados com uma dieta balanceada (OLIVA- TELES, 2012)

As microalgas são eficazes para estimular o crescimento de peixes (HASSAAN et al., 2021). A Spirulina melhora a ingestão de ração e a digestibilidade dos nutrientes, havendo evidências no aumento do crescimento de peixes (ROOHANI et al., 2019). Isso é provavelmente devido ao alto teor de minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais, ácidos graxos linoleico e linolênico encontrado nesse ingrediente (CAO et al., 2018a, 2018b; MUSTAFA; UMINO;

NAKAGAWA, 1994). Além disso, outro fator que melhora o crescimento das espécies é a fina parede celular da *S. platensis*, o que facilita a digestão (GATLIN, 2007).

A secreção de enzimas no trato gastrointestinal, que tem capacidade de hidrolisar os polímeros dos alimentos, corresponde a capacidade digestiva (STECH et al., 2009). Deste modo, os níveis das enzimas dependem dos nutrientes presentes. A atividade de enzimas digestivas intestinais afeta a digestão de nutrientes em peixes (ADEOYE et al., 2016; HASSAAN et al., 2021). Além disso, a morfologia intestinal e os hábitos alimentares desempenham um papel importante na ação dessas enzimas (HASSAAN et al., 2021).

Foi relatado que a *S. platensis* melhora o equilíbrio microbiano intestinal e as atividades das enzimas digestivas, o que aumenta o crescimento das espécies aquáticas (TEIMOURI; AMIRKOLAIE; YEGANEH, 2013). Por isso, o estudo das enzimas digestivas é um passo essencial para a compreensão do mecanismo de digestão e maior conhecimento sobre as necessidades nutricionais (PAKRAVAN et al., 2017).

3.4 Nutrição e os parâmetros bioquímicos

A avaliação dos parâmetros bioquímicos em peixes podem refletir o estado de saúde ao animal e proporcionar maior clareza do estado metabólico dos animais diante de situações relacionadas à nutrição, fisiologia e desequilíbrios de forma geral (GUILHERME, 2021; WAGNER e CONGLETON, 2004). Assim, parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo energético avaliados em tecidos podem ser bons indicadores da resposta do animal a um determinado alimento (PRETTO et al., 2014).

A suplementação dietética de microalgas pode influenciar as condições fisiológicas dos peixes, incluindo o metabolismo lipídico (MUSTAFA e NAKAGAWA, 1995). Na corrente sanguínea são transportados o colesterol e os triglicerídeos pelas lipoproteínas. Os triglicerídeos são os principais lipídeos do tecido adiposo, sendo importantes para a reserva energética. Já o colesterol possui importância na síntese de hormônios esteroides, componentes de membranas celulares e constituintes de sais biliares (LABARRÈRE et al., 2013).

No metabolismo animal os lipídeos podem advirem da ingestão de alimentos e da síntese do próprio organismo. A suplementação de *S. platensis* diminui o conteúdo lipídico dos peixes, o que pode ser atribuído ao aumento do colesterol HDL, de modo que mais colesterol dos tecidos seria transportado para o fígado para ser decomposto em ácidos biliares (XIA et al., 2021). O efeito hipolipidêmico da Spirulina ocorre pela inibição da absorção de colesterol no intestino e reabsorção de ácidos biliares ou pela inibição da atividade da lipase pancreática através da ficocianina (HAN et al., 2006; NAGAOKA et al., 2005). Altos níveis de triglicérides e colesterol podem alterar de maneira significativa o risco de problemas metabólicos (COLLA; MUCCILLO-BAISCH; COSTA, 2008)

Foram observadas menores concentrações de triglicérides e colesterol total em Zebrafish quando alimentados com inclusão de 50 g/kg de *Chlorella sp.* na dieta (CARNEIRO et al., 2020). A inclusão de *Chlorella vulgaris* na dieta de linguado japonês (*P. olivaceus*) reduzir o nível sérico de colesterol (RAHIMNEJAD et al., 2017). Em dourada (*Pagrus major*) alimentadas com Spirulina sp. foi observada a redução de lipídeos totais (NAKAGAWA et al., 2000).

Antioxidantes naturais como a Spirulina podem prevenir a hipercolesterolemia, pois os compostos antioxidantes diminuem os níveis de lipídios séricos, assim, o efeito hipolipidêmico dessa microalga e de seus extratos foi demonstrado em vários modelos animais (COLLA; MUCCILLO-BAISCH; COSTA, 2008; DENG e CHOW, 2010). Além disso, também foi observado que o ácido α -linolênico, ácido linoleico e β -caroteno contidos na *S. platensis* podem diminuir os níveis de colesterol e triglicérides nos animais (COLLA; MUCCILLO-BAISCH; COSTA, 2008; XIANG et al., 2002).

3.5 Influência nutricional sobre a imunidade e estresse oxidativo de peixes

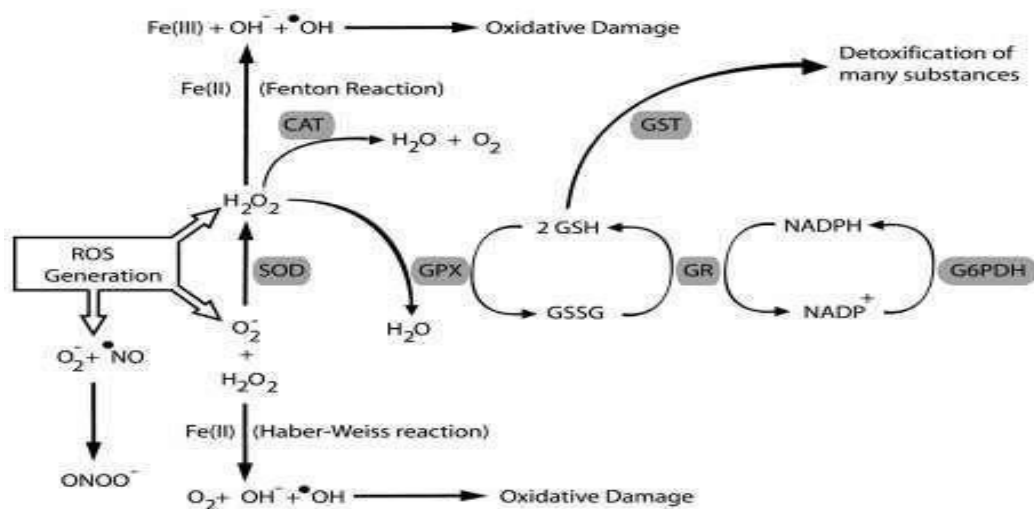
Nutrientes contidos nos alimentos que compõem a dieta, assim como alguns aditivos alimentares podem estimular o sistema imunológico dos peixes, por isso as dietas devem ser formuladas não somente com critérios produtivos, mas também considerando a capacidade de promover a higidez dos peixes (KIRON, 2012). As investigações das influências nutricionais na capacidade dos peixes de resistir aos estressores ambientais e adquirir uma resposta imune faz parte da pesquisa com

nutrição (JOBILING, 2016).

Os imunostimulantes são substâncias biológicas, químicas ou sintéticas que tem capacidade de aumentar a resistência do animal a doenças infecciosas, atuando no sistema imune através do aumento da atividade das células de defesa (BRICKNELL e DALMO, 2005). As algas possuem moléculas bioativas com propriedades imunostimulantes e antioxidantes (CIAN et al., 2015). A *S. platensis* está associada a imunidade e a propriedades antioxidantes, sendo que os componentes bioativos como vitamine E, carotenoides, aloficocianina, xantofilas, ficobilina e ficocianina são responsáveis pelos efeitos protetores contra a peroxidação lipídica e de imunostimulação (KHALIL; REDA; AWAD, 2017; MIYAZAWA et al., 2019; STAHL e SIES, 2003).

As espécies reativas de oxigênio são produzidas naturalmente durante o metabolismo em um equilíbrio dinâmico controlado pelo sistema antioxidante (EL-ARABY et al., 2022). No entanto, o estresse oxidativo é um desequilíbrio da homeostase das reações redox e resulta no aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (FORMELLA et al., 2018), que podem resultar em um dano oxidativo às células e peroxidação lipídica (XU e PAN, 2013). Assim, todos os organismos aeróbicos possuem um sistema de defesa antioxidante composto por enzimas antioxidantes que reflete na capacidade de metabolizar os radicais livres e proteger os tecidos do estresse oxidativo, conforme descrito na Figura 1 (FONTAGNÉ-DICHARRY et al., 2018).

Figura 1- Ação associada das enzimas antioxidantes contra as espécies reativas de oxigênio. As siglas SOD, CAT, GST, GR, GPX e G6PDH correspondem, respectivamente, as enzimas: superóxido dismutase, catalase, glutathiona s transferase, glutathiona redutase, glutathiona peroxidase e glicose-6 - fosfato desidrogenase.



Fonte: Hermes-Lima (2004)

As enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona s transferase (GST) influenciam no processo contra os danos oxidativos. A SOD realiza a dismutação de O_2 altamente reativo em H_2O_2 menos reativo e está entre os principais mecanismos de defesa antioxidante contra o estresse oxidativo (FRIDAVICH, 1995). A CAT é capaz de decompor H_2O_2 em O_2 e H_2O (YIN et al., 2014). O aumento da atividade da SOD é acompanhado pelo aumento de CAT e/ou GPX para que não ocorram danos celulares (WARNER, 1994). Também pode haver aumento da GSH que atua como antioxidante e como cofator de GPX e da GST (HERMES-LIMA, 2004). A GST é importante na desintoxicação celular como mediador enzimático da conjugação da glutatona (GSH) contra uma ampla gama de compostos deletérios (MIHALJEVIĆ et al., 2020).

Os leucócitos observados na circulação dos peixes são os linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. A função dessas células é a defesa do organismo contra corpos estranhos que penetram nos tecidos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Em muitas espécies animais, a dieta pode influenciar os parâmetros imunológicos, como o número de leucócitos (SADO e BICUDO, 2012).

O processo oxidativo possui relevante papel na fagocitose, em que os leucócitos fagocíticos através de receptores detectam os agentes patogênicos e por meio da oxidase NADPH produzem rapidamente a redução de oxigênio, formando radicais livres de superóxido que exerce atividade tóxica para os microrganismos (INOBUCHI et al., 2003; TADEU e LIMA, 2015). Assim, os imunoestimulantes nas dietas podem influenciar nas atividades fagocitárias e na produção de radicais oxidativos (SAKAI, 1999).

3.6 Impacto da nutrição dos peixes na maturação sexual

O controle da reprodução é feito pela ação combinada entre os sistemas nervoso e endócrino do organismo (BALDISSEROTTO, 2002). Os hormônios gonadotróficos liberados pela hipófise irão para a circulação sanguínea dirigindo-se até as gônadas, que são estimuladas para a produção de esteroides sexuais, os quais são responsáveis pela maturação dos gametas (ERICK e PARRA, 2007).

Os ovócitos nos ovários apresentam variação no tamanho no início da

vitelogenese e ao final da maturação possuem o mesmo volume (BALDISSEROTTO, 2002). Com os estímulos hormonais, o fígado promove a síntese e exportação de vitelogenina, uma molécula que se acumula no ovócito em desenvolvimento, é constituída de várias classes de compostos acumuladores de proteína, carboidratos, lipídeos, grupos fosfato e sais minerais (MOMMSEN e WALSH, 1988; WALLACE, 1985). A deposição de vitelogenina no saco vitelínico e sua produção é essencial para o desenvolvimento do ovócito e para a sobrevivência embrionária e larval dos peixes (KHAN; JAFRI; CHADHA, 2005; MOMMSEN e WALSH, 1988). Junto ao processo de vitelogenese alterações morfológicas ocorrem no desenvolvimento dos ovócitos (GANECO; NAKAGHI; URBINATI, 2001; PINDER e GOZLAN, 2004; VAZZOLER, 1996).

No período de maturação gonadal, os peixes necessitam de macro e micronutrientes para transferirem aos ovócitos (CEJAS et al., 2004). Assim, os lipídeos e os ácidos graxos são transportados pelo sangue com auxílio das lipoproteínas específicas (SARGENT, 1995). Os ácidos graxos são mobilizados a partir de reservas lipídicas no processo de oogênese, principalmente de origem hepática durante a síntese de vitelogenina (ADAMS, 1999). Ingredientes com bom perfil lipídico, principalmente ácidos poli-insaturados podem influenciar a fisiologia reprodutiva dos peixes, a partir de respostas dos hormônios esteroides que atuam no crescimento e na maturação gonadal (ZHANG et al., 2013).

Maior oferta de alimentos promove crescimento e tamanho corporal maiores, obtendo-se maturação sexual precoce e maior fecundidade nas espécies (VOLKOFF e LONDON, 2018). Lipídios, proteínas, ácidos graxos, vitaminas E e C e carotenoides são os principais nutrientes que influenciam os parâmetros reprodutivos dos teleósteos (IZQUIERDO; FERNÁNDEZ- PALACIOS; TACON, 2001). Foi constatado que as dietas com maiores níveis de proteínas e ácidos graxos poli-insaturados favoreceram o ganho de peso e a produção de larvas saudáveis de *D. rerio* (KOLB; HILDEBRANDT; LAWRENCE, 2018).

A qualidade dos gametas também é influenciada pela fonte lipídica na dieta. Machos de zebrafish alimentados com artêmia (*Artemia sp*) bioencapsulada com azeite de oliva tiveram maior densidade e motilidade espermática e as fêmeas demonstram maior abundância folicular durante a gametogênese e aumento na fecundidade total (SAMAEE; MANTEGHI; ESTÉVEZ, 2019). O tamanho das

larvas pós-eclosão e a taxa de sobrevivência dos reprodutores de zebrafish também são positivamente influenciados pela suplementação de ácidos graxos (NOWOSAD; KUCHARCZYK; TARGOŃSKA, 2017).

Ao avaliar a relação entre a dieta e a reprodução do *D. rerio*, é essencial observar a influência no crescimento, metabolismo e na maturação sexual, pois esses parâmetros são fundamentais para garantir uma boa desova nos peixes (KUZUHARA et al., 2019; ZHU et al., 2015). Assim, a comunidade científica é beneficiada com a inclusão de novas informações relacionadas a nutrição e saúde do zebrafish. Isso porque o maior foco no rigor e na reprodutibilidade na pesquisa de modelos animais é imprescindível para as pesquisas biomédicas, sendo possível alcançar padrões bem desenvolvidos na nutrição dos animais, o que aumenta a utilidade funcional no desenvolvimento de estudos (WATTS et al., 2016).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preceitos éticos

Os procedimentos experimentais foram realizados seguindo as diretrizes preconizadas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) que regulam a experimentação animal sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animais (CEUA) - UFLA Protocolo 108/18.

4.2 Desenho experimental e tratamentos

Foram utilizados 300 juvenis de zebrafish da ala de peixes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras, onde o experimento foi conduzido. Antes do período experimental os animais foram mantidos em aquários plásticos de 50 litros com recirculação de água e presença de filtro biológico e físico, sendo 100 animais por caixa. Diariamente, a temperatura, a amônia e o pH foram monitorados, e as caixas foram limpas através de sifonagem para garantir um ambiente adequado aos animais. Os peixes tiveram oferta de duas alimentações ao dia com ração floclada comercial contendo 45% de proteína bruta e 5% de gordura (Alcon basic, Alcon Pet®, SC, BR) até início do experimento.

Após a obtenção do peso individual médio inicial de $0,1134 \pm 10\%$ mg, os animais foram transferidos para o sistema experimental composto por 30 aquários de policarbonato de 3 L (11,5 cm x 34,5 cm x 15,5 cm), conectado a uma Rack específica para zebrafish (Hidrus Rack, modelo ZEB-60, Alesco, SP, BRA), que possui controle automatizado de temperatura, pH e condutividade. A água dos aquários fluía por gravidade para um tanque de filtragem com três filtros de polipropileno para filtrar partículas de 100 μm e três filtros de feltro para reter partículas de 50 μm . Logo após, a água fluía através de um filtro biológico contendo *bioballs* e anéis de cerâmica e posteriormente era bombeada para uma câmara de luz ultravioleta antes de retornar aos aquários. A água de abastecimento foi filtrada através de um sistema de osmose reversa e então mantida em um reservatório de 50 L.

Os parâmetros de temperatura, pH e condutividade da água foram medidos diariamente, apresentando médias de 27,8 °C, 7,8 e 0,45ms, respectivamente. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos sob ciclo de luz artificial de 14 horas de luz e 10 horas de escuro (WESTERFIELD, 2007). Um delineamento inteiramente casualizado foi utilizado, com seis tratamentos e cinco repetições, sendo dez peixes por repetição, totalizando 300 animais.

Seis dietas isoproteicas, isoenergéticas e isofosfóricas com 37% de proteína bruta, 1,55% de fósforo e 4.250 Kcal/kg foram formuladas utilizando o software de formulação de ração SuperCrac 6.1 (TD Software, Viçosa, MG). Foi feita inclusão de *S. platensis* nos níveis 0, 2, 4, 6, 8 e 10%, conforme descrito na Tabela 1. A formulação das dietas foi preparada de acordo com estudos que demonstraram os valores de exigência de proteína (FERNANDES; PERES; CARVALHO, 2016), de fósforo (COSTA, 2015) e de acordo com exigências para ciprinídeos (NRC, 2011).

Tabela 1- Composição das dietas com diferentes níveis de inclusão de *Spirulina Platensis*.

Ingredientes	Denominação das dietas (g/kg de inclusão de <i>S. platensis</i>)					
	SP0	SP2	SP4	SP6	SP8	SP10
Amido de milho	362	359	356,1	353,3	354,7	356,1
Albumina	343	326	308,9	291,9	274,6	257,3
Farinha de peixe	100	100	100	100	100	100
Gelatina	80	80	80	80	80	80
Óleo de soja	50	50	50	50	50	50
Spirulina platensis	0	20	40	60	80	100
Fosfato bicálcico	50	50	50	49,8	45,7	41,6
Premix	10	10	10	10	10	10
Sal	5	5	5	5	5	5
Total	100	100	100	100	100	100
Composição (%)						
Matéria seca	90,7	91,4	92	91,3	91	92,5
Proteína bruta	36,9	37,1	37,1	36,9	36,8	37,1
Extrato etéreo	3,0	4,5	3,5	4,6	5,4	5,6
Cinzas	7,7	7,4	7,4	8,1	7,3	7,4

Fonte: Do autor (2022)

Todos os ingredientes foram obtidos de uma fonte comercial local. O preparo das dietas foi feito a partir da pesagem em balança de precisão e mistura dos ingredientes até atingir homogeneização. Posteriormente, cada dieta foi peletizada através de um moedor de carne disponível do setor de piscicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras. Após a peletização, foi realizada a secagem dos *pellets* em estufa de circulação de ar forçada a 55° C por 12 horas. Em seguida, as dietas foram trituradas para obtenção de uma granulometria correspondente a abertura da boca dos juvenis e armazenadas a -20 °C até o uso.

Os juvenis foram alimentados durante 77 dias. A alimentação foi ofertada três vezes ao dia (9h, 13h e 17h) até a saciedade aparente dos animais. Posteriormente, foi feita a análise proximal de cada dieta no Laboratório de Pesquisa Animal – DZO, UFLA, seguindo as recomendações da AOAC (2016) para matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo e cinzas, conforme descrito na Tabela 1.

4.3 Crescimento

Após o período de oferta das dietas experimentais, todos os peixes foram

eutanasiados com benzocaína (250 mg/L) (ROSS et al., 2008). Posteriormente a essa etapa, os animais foram secos com papel toalha, pesados individualmente em uma balança digital de precisão e medidos com um paquímetro. A partir disso, o peso final, o comprimento furcal, o ganho de peso ((peso médio final – peso médio inicial)/peso inicial), o fator de condição de Fulton ((peso final/comprimento³) *100) e a taxa decréscimo específico (100 (Ln peso médio inicial (mg) – Ln peso médio final (mg)/ período experimental) foram determinados.

4.4 Análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas de triglicérides e colesterol total dois animais de cada repetição, em jejum de 12 horas, foram eutanasiados por benzocaína (250 mg/L) (ROSS et al., 2008). Os peixes inteiros foram armazenados em tubos criogênicos, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em ultra freezer a -80 °C até a etapa de homogeneização.

A homogeneização do corpo inteiro foi realizada com solução tampão fosfato a 4°C em uma proporção de 5 mL de tampão por 1 g de amostra. O homogenato foi centrifugado por 30 minutos a 14.000 rpm a 4° C conforme Sancho et al. (2009). O sobrenadante foi coletado para realização dos procedimentos de ensaio utilizando kits comerciais (Bioclin, MG) seguindo as recomendações do fabricante.

A absorbância dos triglicérides foi medida a 505 nm e a do colesterol total a 500 nm. As análises foram feitas em triplicata e as leituras das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Biotek Epoch, Biotek, EUA).

4.5 Avaliação de enzimas digestivas

Para determinação da atividade das enzimas digestivas amilase e lipase, dois animais de cada repetição, em jejum de 12 horas, foram coletados e eutanasiados em benzocaína (250 mg/L) (ROSS e ROSS, 2008). A dissecação foi realizada em placa de gelo usando alfinetes estéreis e bisturis para remoção do intestino inteiro, que foi utilizado para determinação das atividades de enzimas (GUPTA e MULLINS, 2010). Depois das coletas, as amostras foram armazenadas em tubos criogênicos de 2 mL, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e

armazenados em ultra freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até as análises posteriores.

A homogeneização dos intestinos foi realizada com solução tampão Tris-HCL a 4°C em uma proporção de 4 mL de tampão para cada 1 g de tecido. O homogenato foi centrifugado por 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise de amilase e lipase. A atividade específica das enzimas digestivas foi determinada usando kits comerciais Bioclin seguindo as recomendações do fabricante.

As concentrações de proteína total nas amostras foram determinadas espectrofotometricamente a 595 nm, de acordo com o método de Bradford (1976), usando albumina de soro bovino como padrão. A atividade específica da amilase foi determinada a 660 nm a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a lipase foi medida a 410 nm a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando kits comerciais. Todas as análises foram feitas em triplicata e as leituras em espectrofotômetro leitor de microplacas (Tecan, Infinite 200 Pro, Suíça).

4.6 Avaliação do estresse oxidativo

Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, dois animais de cada repetição foram eutanasiados por benzocaína (250 mg/L) (ROSS e ROSS, 2008). Os peixes inteiros foram armazenados em tubos criogênicos, congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em ultra freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até as análises posteriores.

A homogeneização do corpo inteiro foi realizada com solução tampão fosfato a 4°C em proporção de 5 mL de tampão para cada 1 g de tecido. O homogenato foi centrifugado por 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi coletado e dividido em alíquotas para medição da atividade da catalase (CAT), da glutathione S transferase (GST), superóxido dismutase (SOD) e peroxidação lipídica.

A atividade da CAT foi determinada em 240 nm a cada 15 segundos por um período de 3 minutos, em que ocorre o decréscimo de absorvância pela degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, conforme o descrito Aebi (1984). Os resultados foram expressos em μmol de peróxido de hidrogênio degradado por minuto por mg de proteína. Já a atividade da SOD foi medida em 560 nm de acordo com a capacidade da enzima de inibir a redução do *nitro blue tetrazolium* (NBT) por radicais superóxido e expressa em U SOD mg^{-1} proteína (BEAUCHAMP e BIOCHEMISTRY; 1971).

A GST foi medida conforme Habig e Jakoby (1981), em que a glutathione reduzida e 1- cloro-2,4- dinitrobenzeno (CDNB) foram adicionados a microplacas. A atividade dessa enzima foi medida por meio da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno que foi estimada pela variação da absorbância a 340 nm a cada 20 segundos durante 5 minutos. A peroxidação lipídica foi medida utilizando kit comercial, seguindo as recomendações do fabricante (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA).

As concentrações de proteína total nas amostras foram determinadas conforme descrito anteriormente. Todas as análises foram feitas em triplicata e as leituras em espectrofotômetro com leitor de microplacas (Tecan, Infinite 200 Pro, Suíça).

4.7 Preparação do extrato e atividade antioxidante da Spirulina

Para obtenção do extrato foram pesados 2 gramas de *S. platensis* e adicionado 20 ml de etanol 92,8%. A amostra foi agitada no agitador vórtex (EEQ9033 edutec) por aproximadamente 1 minuto e, posteriormente, em agitador mecânico (MOD 109 Nova ética) por 30 minutos. Em seguida, a amostra foi transferida para o banho ultrassônico (Ultracleaner 1600A) por 30 minutos. O extrato foi filtrado com papel filtro e acondicionados em vidro âmbar congelado a -20° até o momento da análise.

A atividade antioxidante total foi determinada pela captura do radical livre ABTS seguindo o protocolo proposto por Lurrari et al. (1997) com adaptações (RUFINO et al., 2007). A partir do extrato obtido, três diluições diferentes em triplicata foram preparadas, 20 µL de cada diluição foi transferido para tubos de ensaio com 2 mL do radical ABTS, sendo homogeneizado em agitador vórtex. Após essa etapa, 300 µL das amostras foram pipetadas em placa de 96 poços e realizada a leitura no leitor de microplacas (EZ Read 2000) a 734 nm após seis minutos da mistura dos compostos. Os resultados foram expressos em µM de trolox/g do material. A determinação da atividade antioxidante foi realizada em triplicata.

4.8 Contagem diferencial de células de defesa

A contagem diferencial de células de defesa foi feita através de lâminas com esfregaços de sangue de 3 animais por repetição fixadas com metanol absoluto por 1 minuto, secas por 24 horas, coradas com panótico (CASTRO et al., 2018) a fim de identificar as diferentes células a partir de microscópio óptico. Os tipos celulares que foram observados são: neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

4.9 Avaliação do desenvolvimento ovocitário

Para a avaliação histológica do desenvolvimento ovocitário, 3 fêmeas de zebrafish de cada repetição foram eutanasiadas por benzocaína (250 mg/L) (ROSS e ROSS, 2008). Após a eutanásia os animais foram dissecados em placa de gelo usando alfinetes estéreis e bisturis para remoção das gônadas, que foram armazenadas em cassetes histológicos em formalina tamponada 10% por 48 horas para fixação e, em seguida, colocadas em álcool 70% até o processamento.

As gônadas em cassetes histológicos foram desidratadas e diafanizadas a partir do seguinte procedimento histotécnico: banho 1 e 2 em álcool 70°, banho 2, banho 3 em álcool 80° e banho 4 em álcool 85°, banho 5 em álcool 90°, banho 6 em álcool 95°, banho 7 e 8 em álcool IPA, sendo 20 minutos cada, banho 9 e 10 em xilol por 30 minutos e, em seguida, passagem pela parafina por 80 minutos. Após esses procedimentos, as amostras passaram para o processo de inclusão em blocos de parafina em estação de inclusão de parafina aquecida (HistoCore, Arcadia H, Germany).

Após a etapa de processamento, foram realizados cortes seriados longitudinalmente em micrótomo (Lupetec, MRP2015, Brazil). A coloração utilizada foi a Hematoxilina-Eosina (HE). Todo o procedimento histológico padrão e a coloração foram feitos no setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

Através da avaliação histológica foram identificadas as fases de maturação dos oócitos de acordo com os tamanhos e estádios de desenvolvimento, sendo crescimento primário (estádio I), oócitos com crescimento citoplasmático e vitelino (estádio II), oócitos com crescimento vitelogênico (estádio III), oócitos maduro

(estádio IV)((YÖN); AYTEKIN; YÜCE, 2008).

Para medição microscópica do diâmetro médio e da frequência de cada fase de maturação dos oócitos em cada fase de desenvolvimento ((YÖN); AYTEKIN; YÜCE, 2008; CAMPOY-LÓPEZ et al., 2020) foi utilizado um microscópio acoplado a uma câmera com sistema de captura (Motic, USA; Moticom 3+, USA) a partir do software Motic Images Plus 3.0.

4.10 Análises estatísticas

Ao final do experimento, após obtenção dos dados e verificação das premissas estatísticas de normalidade e homogeneidade das variâncias, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas entre os tratamentos foram detectadas pelo teste de Tukey. Uma análise de regressão polinomial foi feita para os dados de peso final e taxa de crescimento específico. O nível de significância para comparação dos tratamentos foi de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Minitab® versão 18.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento

Após 77 dias de experimentação, os animais alimentados com o tratamento SP6 apresentaram valores significativamente maiores para peso final e taxa de crescimento específico quando comparados aos peixes alimentados com as dietas contendo os demais níveis de suplementação de *S. platensis*. Já o ganho de peso foi maior nos animais com a dieta contendo de 4 a 10% de Spirulina em relação ao tratamento controle. Não foram observadas diferenças significativas em relação a sobrevivência médias dos animais (Tabela 2).

Tabela 2- Parâmetros de crescimento de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) após a alimentação com níveis crescentes de *Spirulina platensis* na dieta por 77 dias.

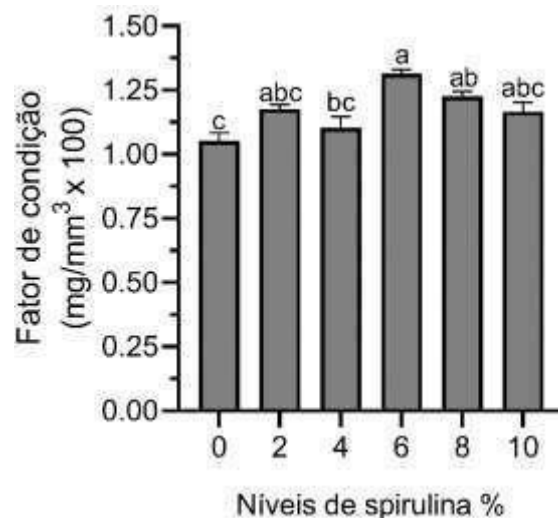
Tratamentos	Peso (g)	Ganho de peso (%)	TCE ¹	Sobrevivência(%)
S0	0,21±0,01 ^c	117,32±7,90 ^c	0,84±0,07 ^c	98±2,00
S2	0,25±0,01 ^{bc}	125,08±4,45 ^{bc}	1,08±0,03 ^b	88±5,83
S4	0,27±0,01 ^b	141,30±7,58 ^b	1,17±0,06 ^b	92±3,74
S6	0,32±0,01 ^a	188,20±10,20 ^a	1,41±0,05 ^a	92±4,9
S8	0,27±0,01 ^b	131,19±4,85 ^b	1,15±0,05 ^b	92±3,74
S10	0,28±0,00 ^b	137,02±5,78 ^{ab}	1,16±0,06 ^b	90±3,16

Dados são expressos como média ± erro padrão da média. Médias na mesma coluna com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes usando análise de variância e o teste de Tukey ($p < 0,05$). ¹TCE = taxa de crescimento específico.

Fonte: Do autor (2022).

O fator de condição apresentou valor significativamente maior nos peixes alimentados com a dieta contendo 6% Spirulina quando comparados aos outros juvenis alimentados com as dietas controle e com 4% de suplementação de *S. platensis* apesar dos tratamentos com 2, 8 e 10% de inclusão não diferirem do SP6 e SP4 (Figura 2).

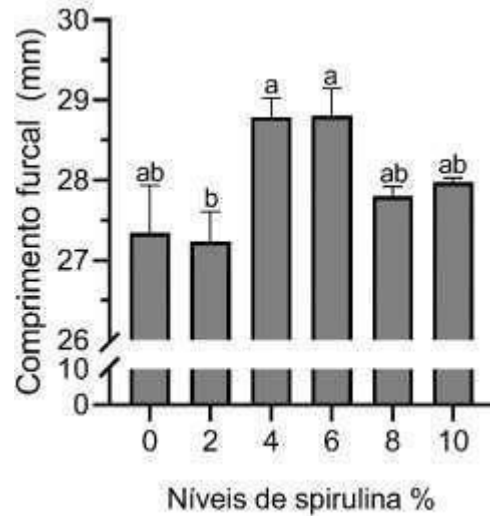
Figura 2– Fator de condição de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) após alimentação com níveis crescentes de *Spirulina platensis* por 77 dias. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes usando análise de variância e o teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Do autor (2022).

O comprimento furcal apresentou valores significativamente maiores nos animais alimentados com a dieta controle, 4% e 6% de Spirulina em relação ao grupo SP2. Já os tratamentos SP0, SP8 e SP10 não apresentaram diferenças entre eles e em relação a SP2, SP4 e SP6 (Figura 3).

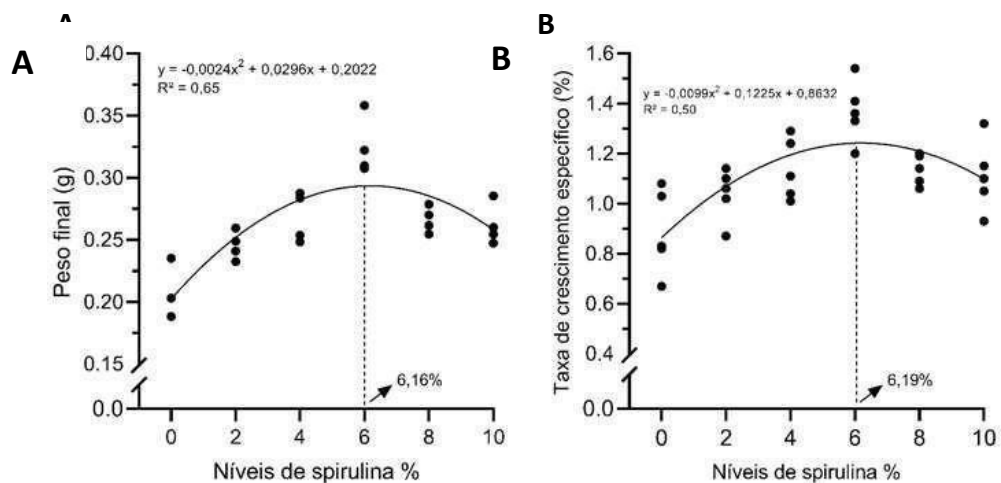
Figura 3– Comprimento furcal de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) após alimentação com níveis crescentes de *Spirulina platensis* por 77 dias. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes usando análise de variância e o teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Do autor (2022).

Um efeito quadrático foi observado para peso final e para taxa de crescimento específico, com um aumento nessas variáveis até 6,16% e 6,19% de inclusão de Spirulina, respectivamente (Figura 4).

Figura 4 – (A) Peso final e (B) taxa de crescimento específico de juvenis de zebrafish (*Daniorerio*) após alimentação com níveis crescentes de *Spirulina platensis* por 77 dias.



Fonte: Do autor (2022).

Um dos critérios mais importantes para medir a resposta dos peixes às dietas é o crescimento, podendo ser medido como ganho em peso ou como taxas de crescimento, como a taxa de crescimento específico (GLENCROSS; BOOTH; ALLAN, 2007). Além disso, o fator de condição, que representa uma relação peso e comprimento, pode alterar conforme a nutrição dos peixes (DA ROCHA et al., 2005). Os resultados obtidos demonstraram que a adição de *S. platensis* na dieta melhora o crescimento de juvenis de zebrafish. No entanto, os maiores níveis de suplementação não tiveram efeitos crescentes no peso final e na taxa de crescimento específico conforme a Figura 4.

A *S. platensis* é uma boa fonte de proteína para a alimentação animal e favorece o crescimento por conter grandes quantidades de ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais (IBRAHEM; MOHAMED; IBRAHIM, 2013). Também foi observado que esse ingrediente melhora a microbiota intestinal, a atividade das enzimas digestivas e, portanto, a quebra de componentes indigeríveis, o que favorece o desenvolvimento do animal (DAWOOD; KOSHIO, 2016). Assim, um elevado crescimento foi relatado em outras espécies de peixes alimentados com dietas contendo Spirulina (ADEL et al., 2016; MAHMOUD et al., 2018; YU et al., 2018).

Efeitos significativos no crescimento com a inclusão de *S. platensis* nas dietas foram observados, de forma semelhante aos resultados obtidos no presente estudo, em juvenis de carpa gibel (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III) alimentados com dietas nos níveis 3,38% e 6,76% de spirulina (CAO et al., 2018a) e em juvenis de truta marrom (*Salmo trutta caspius*) alimentados com dietas com inclusão de 6 e 8% de *S. platensis* (ROOHANI et al., 2019). A inclusão de 2,5% a 10% de Spirulina na dieta de juvenis de gourami azul (*Trichopodus trichopterus*) aumentou os parâmetros de crescimento, enquanto a inclusão até o nível de 20% diminuiu o desempenho de crescimento desses peixes (KHANZADEH; ESMAEILI FEREDOUNI; SEIFI BERENJESTANAKI, 2016). O nível de 5% de Spirulina na dieta mostrou efeitos positivos no desempenho de crescimento da garoupa gigante (*Epinephelus lanceolatus*) e nos níveis de 15 e 30% de inclusão não foi observado aumento no desempenho (MAN et al., 2020).

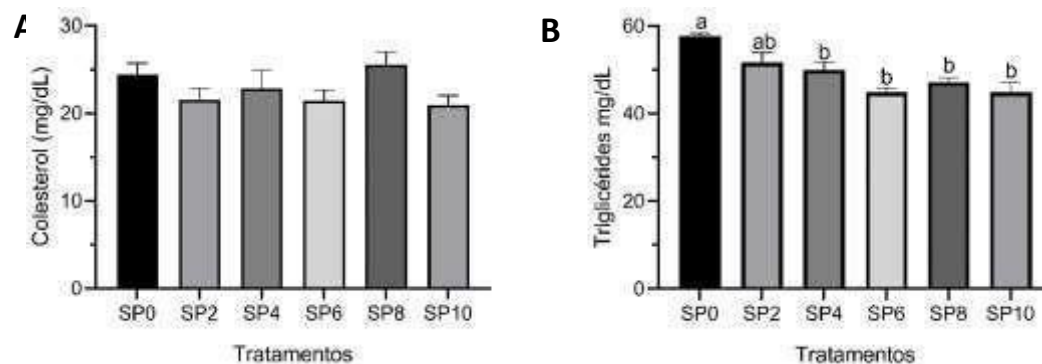
Roohani et al. (2019) relataram que é provável que essa microalga seja mais adequada para peixes carnívoros, ocasionando aumento no crescimento. Além disso, a adição excessiva de algas na dieta pode desequilibrar a composição de

aminoácidos e aumentar a dureza da ração, dificultando a digestão, e assim, há alterações nas funções fisiológicas e metabólicas normais dos peixes, o que resulta em menores índices de desempenho e crescimento (JIANG et al., 2022; KHANZADEH; ESMAEILI FERREIDOUNI; SEIFI BERENJESTANAKI, 2016; LIANG et al., 2018). Foi demonstrado que o excesso de *S. platensis* na dieta pode inibir o crescimento em juvenis de *Megalobrama amblycephala* nos níveis de 6% e 9,5% de inclusão (JIANG et al., 2022) e em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no nível de 12% de suplementação (SIRINGI; TUROOP; NJONGE, 2021).

5.2 Parâmetros bioquímicos

A inclusão de *S. platensis* das dietas na concentração de 4% a 10% diminuiu os níveis de triglicérides em juvenis de zebrafish em relação ao tratamento controle. Já os níveis de colesterol total não foram afetados pela suplementação dietética de Spirulina (Figura 5).

Figura 5- Níveis de colesterol total (A) e triglicérides (B) de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) alimentados com dietas suplementadas em níveis crescentes de *Spirulina platensis* durante 77 dias. N=2 animais por repetição.



Fonte: Do autor (2022).

Foi observado a influência da Spirulina dietética em diferentes espécies de peixes de forma semelhante aos resultados obtidos nesse trabalho. Em oscar (*Astronotus ocellatus*) a Spirulina dietética reduziu os níveis de colesterol total e triglicérides (MOHAMMADIAZARM et al., 2021). Em juvenis de *O. niloticus* a inclusão de *S. platensis* na dieta diminuiu os níveis de triglicérides plasmáticos (VELASQUEZ et al., 2016). Já em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) os níveis

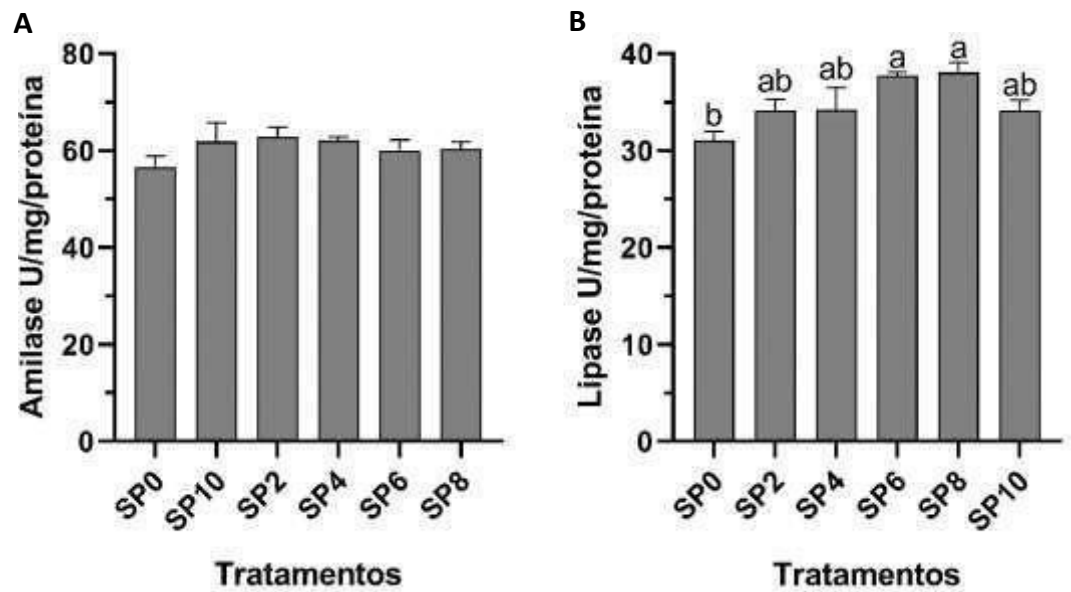
de colesterol e dos triglicérides não tiveram diferenças significativas, mas suas tendências à diminuição mostram o efeito hipocolesterolêmico da Spirulina (YEGANEH; TEIMOURI; AMIRKOLAIE, 2015). A quantidade de triglicérides diminuiu significativamente a medida que o nível de suplementação de *S. platensis* aumentou na dieta de bagre africano (*Clarias gariepinus*) (RAJI et al., 2018).

A *Spirulina platensis* pode afetar vários índices bioquímicos em peixes, já que possui compostos que diminuem os níveis séricos de lipídios e proporcionam a redução dos níveis de colesterol (YEGANEH; TEIMOURI; AMIRKOLAIE, 2015). No entanto, os componentes ativos responsáveis pelos efeitos hipolipidêmicos da Spirulina não são completamente compreendidos (SERBAN et al., 2016). É observado que proteína ficocianina dessa microalga reduz as concentrações de lipídios através da eliminação de radicais livres, inibindo a peroxidação lipídica e a expressão do NADPH oxidase, que é um cofator do metabolismo de gordura (UPASANI e BALARAMAN, 2003).

5.3 Atividade das enzimas digestivas

No presente estudo a atividade da lipase foi maior nos níveis 6 e 8% de inclusão de Spirulina em relação ao tratamento controle apesar dos tratamentos com 2, 4 e 10% não diferirem. Já a atividade da amilase não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 6).

Figura 6– Atividade da amilase (A) e lipase (B) de intestino de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) após alimentação com níveis crescentes de *Spirulina platensis* por 77 dias. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes usando análise de variância e o teste de Tukey ($p < 0,05$). N= 2 animais por repetição.



Fonte: Do autor (2022).

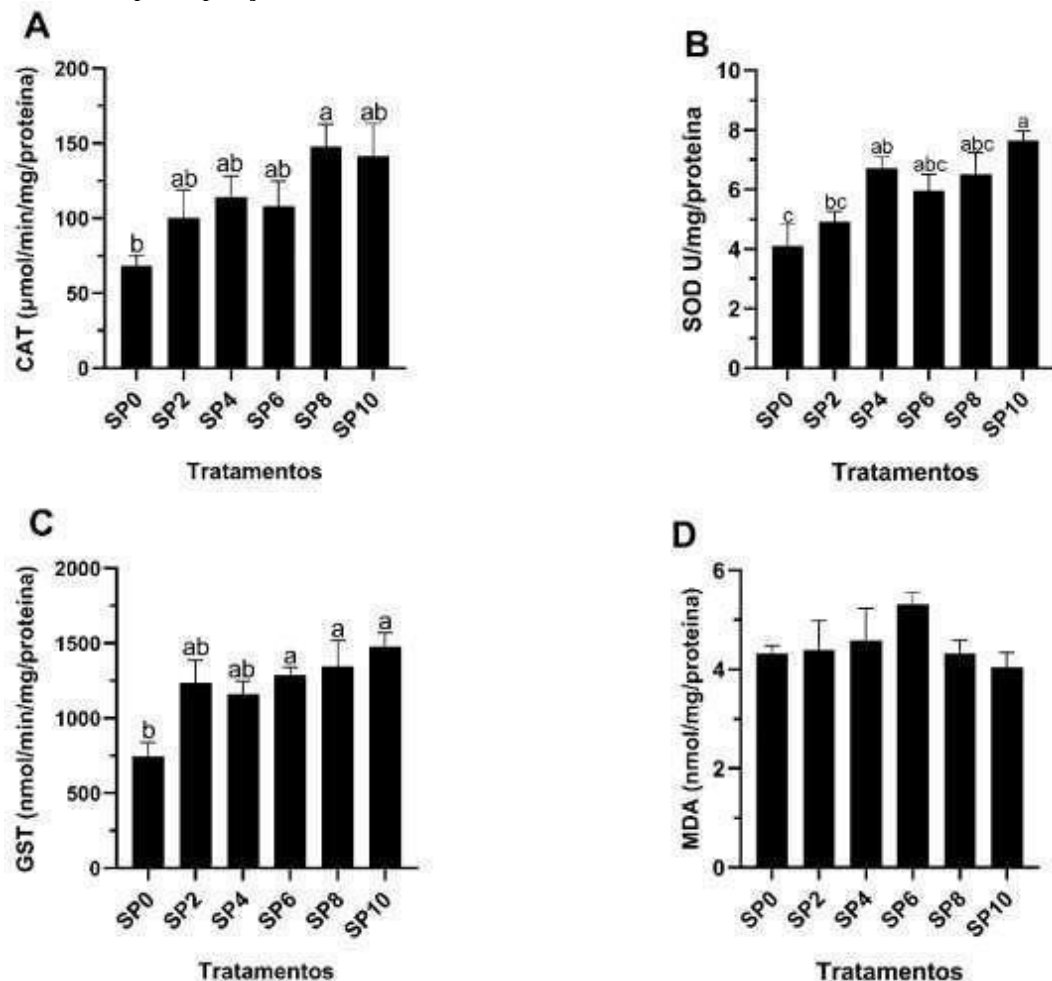
Elevar a atividade das enzimas digestivas é uma maneira eficaz de melhorar a digestão dos nutrientes, pois no intestino várias enzimas digestivas desempenham um papel relevante na digestão de nutrientes (REN et al., 2021). Mesmo em baixas concentrações as microalgas podem ativar a secreção de enzimas digestivas e, com isso, estimular o crescimento dos peixes (ANAND et al., 2013; BRITO et al., 2004). Além disso, foi afirmado que a *S. platensis* estimula a microbiota intestinal dos peixes, aumentando a atividade das enzimas digestivas, e assim a digestão melhora e mais nutrientes são absorvidos da dieta (JAMES et al., 2006; RAJI et al., 2018).

Resultados semelhantes aos obtidos foram relatados em outras espécies. Em tilápias do Nilo (*O. niloticus*) as atividades de lipase e amilase foram maiores nos animais alimentados com dietas contendo β -caroteno e ficocianina extraídos da Spirulina (HASSAAN et al., 2021) nessa mesma espécie o nível de suplementação dietética de 0,5% dessa microalga também aumentou significativamente essas enzimas (ELABD et al., 2020). Em juvenis de esturção (*Huso huso*) a atividade da lipase foi maior conforme os níveis de suplementação de *S. platensis*, sendo o nível de 10% a maior atividade detectada, já na atividade da amilase não houve diferenças significativas em relação aos níveis de inclusão com o tratamento controle (ADEL et al., 2016). A suplementação de Spirulina também aumentou a atividade da lipase em gurami-gigante (*Osphronemus goramy*) (SIMANJUNTAK et al., 2022).

5.4 Status antioxidante e leucograma

A atividade das enzimas antioxidantes dos juvenis de zebrafish alimentados com diferentes níveis de *S. platensis* é demonstrado na Figura 6. A atividade da CAT foi significativamente maior nos peixes alimentados com a dieta SP8, quando comparado aos peixes que receberam a dieta SP0 (Figura 7A). A atividade da SOD foi significativamente maior no grupo alimentado com a dieta SP10 em relação aos grupos alimentados com as dietas SP0 e SP2 (Figura 7B). A atividade da enzima GST foi significativamente maior nos grupos alimentados com as dietas SP6, SP8 e SP10, quando comparado aos peixes do grupo SP0 (Figura 7C). Já o nível de malondialdeído (MDA) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, conforme é demonstrado na Figura 7D.

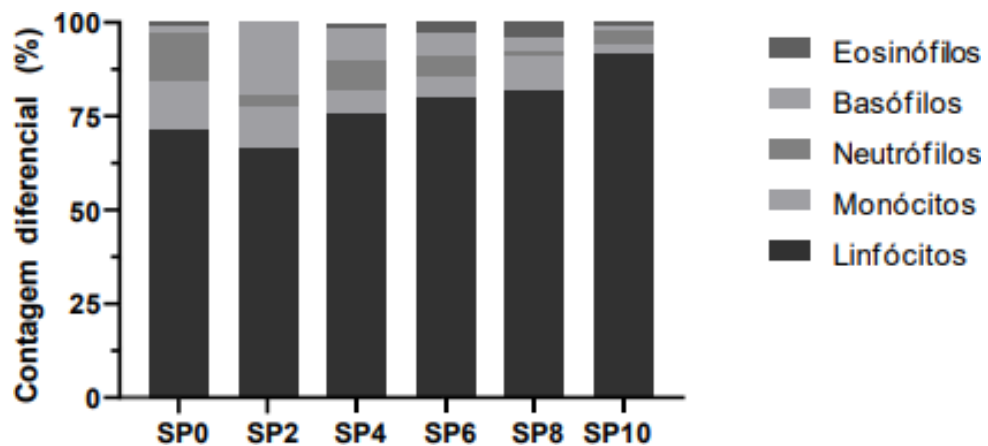
Figura 7- Efeitos da suplementação de *Spirulina platensis* na atividade de catalase (A), superóxido dismutase (B), glutatona s transferase (C) e MDA (D) em juvenis de zebrafish alimentados por 77 dias. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes usando análise de variância e o teste de Tukey ($p < 0,05$). N= 2 animais por repetição.



Fonte: Do autor (2022).

A contagem diferencial de células de defesa (eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monócitos e linfócitos) não apresentou diferenças significativas entre os níveis crescentes de suplementação de Spirulina (Figura 8).

Figura 8- Efeitos da suplementação de *Spirulina platensis* na contagem diferencial de células de defesa em juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) alimentados por 77 dias. N= 3 animais por repetição.



Fonte: Do autor (2022).

O desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e as defesas antioxidantes determinam o grau de estresse oxidativo (FINKEL e HOLBROOK, 2000). De acordo com Kohen e Nyska (2002) as enzimas antioxidantes podem ser usadas como biomarcadores para o estresse oxidativo. As enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione S transferase protegem o organismo contra o estresse oxidativo de forma sinérgica (YAN et al., 2016). O nível de malondialdeído (MDA) é produto da peroxidação lipídica e acelera o dano às células e aos tecidos, assim é usado para avaliar o grau de peroxidação lipídica e estresse oxidativo em peixes (HALLIWELL, 2012; LIU et al., 2010; LUSHCHAK, 2011).

No presente estudo, suplementação de *S. platensis* no nível de 8% proporcionou aumento da atividade da CAT, no nível de 10% da SOD e nos níveis de 6 a 10% da GST em relação aos animais que consumiram a dieta controle, o que sugere uma ativação do sistema antioxidante diminuindo os danos oxidativos (WU et al., 2016). Esse ingrediente está associada presença de compostos bioativos que possuem ação antioxidante (ABDELKHALEK et al., 2017). Além disso, a

suplementação dietética de Spirulina não apresentou diferença significativa quando comparada com o grupo controle para o MDA, o que demonstra que as dietas não produziram estresse nos peixes (RADHAKRISHNAN et al., 2014).

De forma semelhante aos resultados obtidos, foi relatado um aumento nas enzimas antioxidantes com a suplementação de Spirulina em tilápia do Nilo (*O. niloticus*), sendo observado um efeito protetor contra a toxicidade subaguda de diazinon (DZN) (ABDELKHALEK et al., 2017) e no bagre africano (*Clarias gariepinus*) para aliviar os efeitos tóxicos do dodecil sulfato de sódio (SDS) (SAYED e AUTHMAN, 2018). Hassan et al. (2021) observaram que a inclusão de β - caroteno e ficocianina extraídos da *S. platensis* na dieta de tilápia do Nilo, tiveram efeitos sobre os biomarcadores de estresse oxidativo pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Isso demonstra que a suplementação dietética com Spirulina corresponde a uma estratégia promissora para proteger as células da peroxidação lipídica e danos causados pelo estresse oxidativo (ABDEL-DAIM; ABUZEAD; HALAWA, 2013). No entanto, há estudos que relataram que a suplementação dietética de *S. platensis* reduziu a atividade de enzimas antioxidantes em tilápia do Nilo (*O. niloticus*) (ABDEL-LATIF; KHALIL, 2014), kinguio (*C. auratus*) (SHAOLIN et al., 2015) e truta coral (*Plectropomus leopardos*) (YU et al., 2018). Esses resultados sugerem que o efeito contra o estresse oxidativo pode ser exercido devido a prevenção da peroxidação lipídica, além da dependência do mecanismo de toxicidade de substâncias tóxicas que os organismos podem ser expostos (PÉREZ-ALVAREZ et al., 2021).

O efeito protetor da Spirulina contra o estresse oxidativo pode ser atribuído diretamente pela eliminação de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica ou indiretamente através do aumento da atividade das enzimas antioxidantes e a eliminação enzimática de radicais livres (BACHA et al., 2021; PÉREZ-ALVAREZ et al., 2021; TOUGHAN et al., 2018). Estudos em animais mostraram que essa microalga protege contra o estresse oxidativo prevenindo danos celulares pela inibição da peroxidação lipídica, eliminando radicais livres e/ou aumentando a atividade de enzimas antioxidantes em razão de seus compostos bioativos (WU et al., 2016). Utilizando o método ABTS foi observado que o extrato fenólico da Spirulina apresenta boa atividade antioxidante (MACHADO et al., 2021). Neste estudo foi avaliada a atividade antioxidante da *S. platensis*, sendo obtido o valor de $3350,91 \pm 257,41 \mu\text{M}$ de trolox/g, o que pode ter

proporcionado o aumento da atividade das enzimas antioxidantes nos juvenis de zebrafish.

A capacidade imunoestimulante da Spirulina está relacionada a ficocianina, que contribui para o aumento das células de defesa (YEGANEH; TEIMOURI; AMIRKOLAIE, 2015). Não só a alimentação afeta os parâmetros sanguíneos dos peixes, o estado fisiológico e as condições ambientais também são relevantes (HOSEINIFAR et al., 2011). Portanto, resultados diferentes podem ser encontrados devido as condições experimentais. Os leucócitos desempenham um papel importante na imunidade inespecífica ou inata e a sua contagem pode ser considerada um indicador do estado de saúde dos peixes (ROBERTS, 2001).

Na tentativa de recuperar a homeostase em desequilíbrio, o aumento de leucócitos é observado no início do estresse em peixes e o decréscimo na contagem dessas células pode ser atribuído ao enfraquecimento do sistema imunológico (SOUSA et al., 2014). Assim, os resultados encontrados nesse trabalho sugerem que a suplementação dietética de *S. platensis* não afetou a saúde dos peixes.

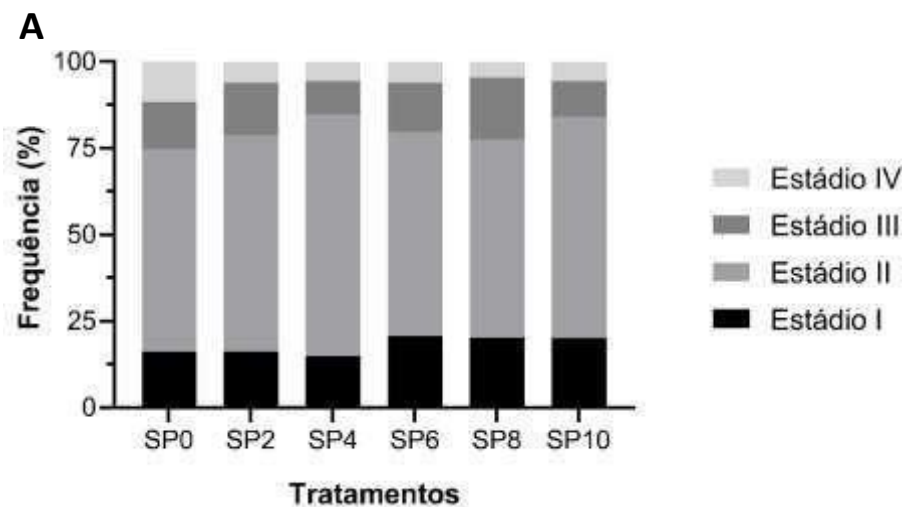
Diversos estudos testaram o efeito da Spirulina na alimentação em peixes sujeitos a desafios. Cao et al., 2018a observaram aumento da atividade fagocitária dos leucócitos com a inclusão crescente de Spirulina na dieta 12 horas após o desafio bacteriano por injeção intraperitoneal de *Aeromonas hydrophila* por 7 dias em juvenis de *Carpa gibel* (*C. auratus gibelio* var. Cas III). Tilápias (*O. niloticus*) alimentadas com 5 a 10 g de Spirulina por kg com infecção por *A. hydrophila* apresentaram maior resistência (ABDEL-TAWWAB e AHMAD, 2009). Em carpas (*C. carpio*) com a mesma infecção houve diminuição do número de bactérias no fígado e no rim quando alimentadas com *Arthorspira platensis* (WATANUKI et al., 2006). Isso demonstra que resultados com diferenças significativas pela suplementação dietética de microalga podem ser encontrados quando os peixes são submetidos a desafios, assim o próximo passo da avaliação da inclusão da *S. platensis* em zebrafish sobre os parâmetros de imunidade seria a análise dos efeitos antes e após desafios.

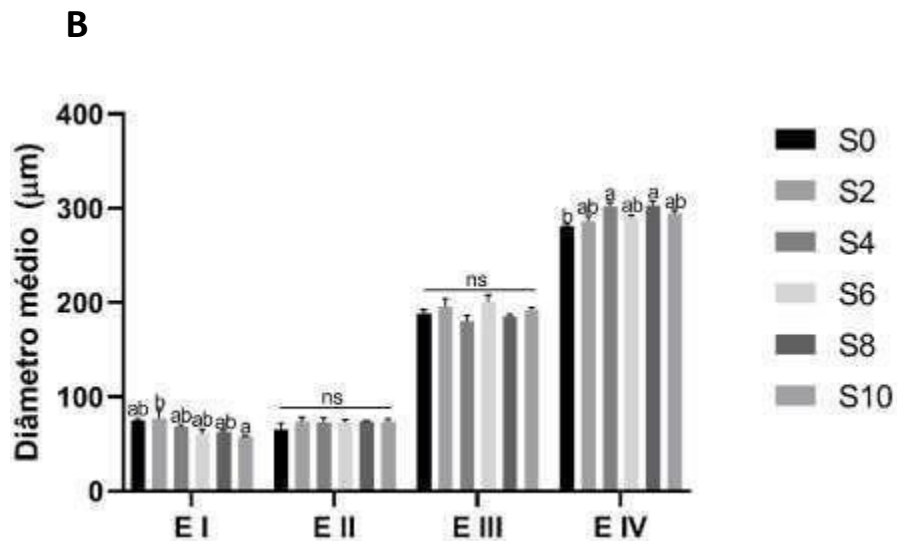
5.5 Desenvolvimento ovocitário

Não foram observadas diferenças significativas na frequência avaliada nos quatro estádios de maturação dos oócitos de acordo com a suplementação dietética

de níveis crescentes de *S. platensis*. Já com relação ao diâmetro médio dos ovócitos no estágio I de maturação foram observadas diferenças significativas, sendo que tratamento SP2 apresentou maior diâmetro médio quando comparado ao tratamento SP10. Também houve diferenças significativas no estágio IV, em que o tratamento SP0 apresentou menor diâmetro médio e os tratamentos SP4 e SP8 apresentaram os maiores diâmetros (Figura 9), conforme as classificações demonstradas na Figura 10.

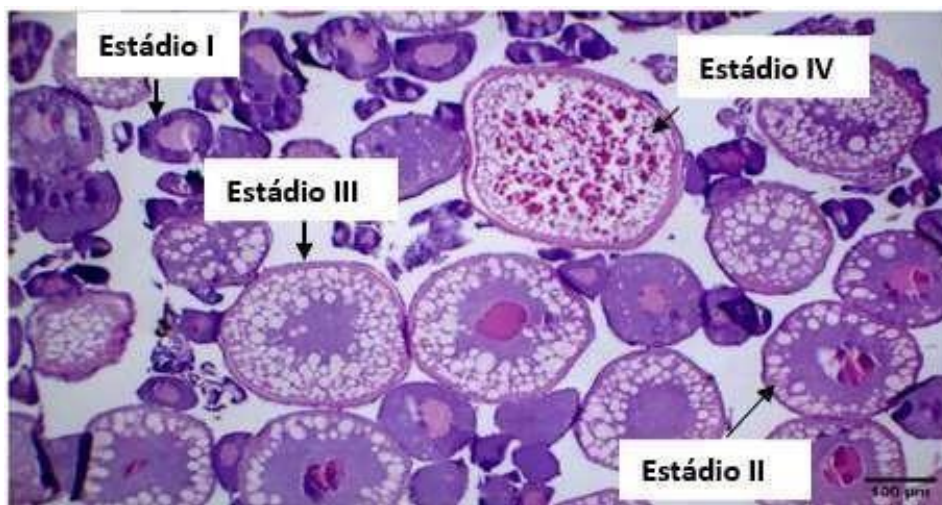
Figura 9- Efeitos da suplementação de *Spirulina platensis* na frequência (A) e diâmetro médio (B) dos estádios I, II, III e IV de maturação ovocitária em juvenis de Zebrafish (*Danio rerio*) alimentados por 77 dias. Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes usando análise de variância e o teste de Tukey ($p < 0,05$). N= 3 animais por repetição.





Fonte: Do autor (2022).

Figura 10- Classificação dos estádios ovocitários avaliados na imagem histológica.



Fonte: Do autor (2022).

A alimentação é relevante para a maturação gonadal e o conhecimento dos níveis adequados de nutrientes para as espécies acarreta em maiores ganhos em desempenho reprodutivo (SILVA, 2018). A nutrição adequada para peixes pode influenciar a reprodução, o desenvolvimento gonadal, o número e a qualidade de ovócitos (NAVARRO et al., 2006). Nesse estudo a quantidade de ovócitos nos diferentes estádios de maturação não foi afetada negativamente pela inclusão dietética de *S. platensis*, o que sugere que as dietas foram adequadas para os juvenis.

As fêmeas de zebrafish requerem uma alta quantidade de lipídeos para produzir oócitos, logo, os ácidos graxos encontrados nos alimentos são necessários

(KOLB; HILDEBRANDT; LAWRENCE, 2018). Os maiores diâmetros dos oócitos em desenvolvimento indicam melhor síntese e deposição de vitelogenina (DEWI et al., 2018). A deposição de nutrientes nos oócitos em desenvolvimento afeta a qualidade do ovo, o que afeta a viabilidade da prole e o desenvolvimento normal até a fase juvenil (KJØRSVIK; HOEHNE-REITAN; REITAN, 2003). O alto teor de proteína, ácidos graxos e carotenoides das microalgas geram respostas positivas na reprodução. Em zebrafish o uso de 2% de *Spirulina* resultou em fêmeas com maturidade sexual em relação ao grupo controle e aos com menores níveis de suplementação a partir de análises histológicas das gônadas (RAJASEKAR et al., 2019). Em bagres asiáticos (*Clarias sp.*) a *S. platensis* nas dietas nos níveis 1 e 2% teve efeitos significativos no diâmetro dos ovócitos em relação do tratamento sem adição de *Spirulina* (NAINGGOLAN et al., 2014). Esses resultados junto aos obtidos no presente trabalho sugerem que os níveis 4 e 8% em relação ao controle e o nível 2% em relação ao 10% podem aumentar a síntese e deposição de vitelogenina, aumentando assim o diâmetro médio nos ovócitos nos estádios IV e I, respectivamente, em fêmeas juvenis de zebrafish.

Outros parâmetros reprodutivos já foram avaliados pela suplementação de *Spirulina* nas dietas. A inclusão de 10% dessa microalga nas dietas de fêmeas de zebrafish foi responsável por maiores taxas de fertilização e sucesso de incubação dos ovos (HEDAYATIRAD et al., 2020). Na mesma espécie, o uso de 2% dessa microalga resultou em maiores taxas de desova, porcentagem de eclosão e de sobrevivência larval pós 48 horas (RAJASEKAR et al., 2019). Deste modo, sugere-se que a avaliação de mais parâmetros reprodutivos é essencial para maior compreensão da relação da suplementação dietética de *Spirulina sp.* no desenvolvimento ovocitário e os demais parâmetros reprodutivos.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a suplementação dietética de *Spirulina platensis* pode aumentar significativamente os parâmetros de crescimento, reduzir os níveis de triglicérides, aumentar a atividade da lipase, aumentar o diâmetro médio dos ovócitos e potencializar a atividade antioxidante sem afetar os parâmetros imunológicos e a sobrevivência do zebrafish. Assim, a *S.*

platensis pode ser utilizada como um aditivo adequado e sustentável na alimentação de juvenis de *Danio rerio*.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da demanda pela espécie *Danio rerio* para fins científicos fundamenta a importância da realização de pesquisas para o desenvolvimento de dietas adequadas à sua criação, melhorando o cultivo nos laboratórios e, com isso, otimizando seu uso como modelo animal. Os dados obtidos sugerem que mais estudos devem ser feitos para maior compreensão dos efeitos da *Spirulina platensis* como aditivo dietético nas respostas reprodutivas e imunológicas do zebrafish.

8 REFERÊNCIAS

(YÖN), N. D. K.; AYTEKIN, Y.; YÜCE, AND R. Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). **SciELO Brasil**, v. 51, n. 3, p. 513–522, 2008.

ABDEL-DAIM, M. M.; ABUZEAD, S. M. M.; HALAWA, S. M. Protective Role of *Spirulina platensis* against Acute Deltamethrin-Induced Toxicity in Rats. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. e72991, 9 set. 2013.

ABDEL-LATIF, H. M. R.; KHALIL, R. H. 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**, v. 250, n. 5, p. 250–255, 2014.

ABDEL-TAWWAB, M.; AHMAD, M. 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, 1 jun. 2009.

ABDELKHALEK, N. K. M. et al. Protective role of dietary *Spirulina platensis* against diazinon-induced Oxidative damage in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 54, p. 99–104, 1 set. 2017.

ADAMS, S. M. Ecological Role of Lipids in the Health and Success of Fish Populations. **Lipids in Freshwater Ecosystems**, p. 132–160, 1999.

ADEL, M. et al. 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 and Shellfish Immunology**, v. 56, p. 436–444, 1 set. 2016.

ADEOYE, A. A. et al. Supplementation of formulated diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*) with selected exogenous enzymes: Overall performance and effects on intestinal histology and microbiota. **Animal Feed Science and Technology**, v. 215, p. 133–143, 1 maio 2016.

AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1 jan. 1984.

ANAND, P. S. S. et al. Effect of dietary supplementation of periphyton on growth performance and digestive enzyme activities in *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 392–395, p. 59–68, 10 maio 2013.

ANAYA-ROSAS, R. E. et al. Effects of a co-culture of marine algae and shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on the growth, survival and immune response of shrimp infected with *Vibrio parahaemolyticus* and white spot virus (WSSV). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 87, p. 136–143, 1 abr. 2019.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Maryland, **Official Methods of Analysis**. AOAC International. 20^a ed. USA, 3100 p, 2016.

BACHA, O. et al. Protective effect of the *Spirulina platensis* against toxicity induced by Diuron exposure in *Mytilus galloprovincialis*. <https://doi.org/10.1080/15226514.2021.1975640>, 2021.

BALDISSEROTTO, B. Fisiología de peixes aplicada a piscicultura. 2002.

BEAUCHAMP, C.; BIOCHEMISTRY, I. F.-A.; 1971, UNDEFINED. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Elsevier*, v. 44, p. 276–287, 1971.

BECKER, E. W. **Micro-algae as a source of protein** *Biotechnology Advances* Elsevier, , 1 mar. 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRICKNELL, I.; DALMO, R. A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 19, n. 5 SPEC. ISS., p. 457–472, 1 nov. 2005.

BRITO, R. et al. Effect of artificial and natural diets on energy allocation in *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) and *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) early postlarvae. *Aquaculture*, v. 237, n. 1–4, p. 517–531, 2 ago. 2004.

CAMPOY-LÓPEZ, P. et al. Effects of ethinylestradiol (EE2) and an organophosphorus flame retardant (TCPP) on gonadal maturation in the sea urchin, *Paracentrotus lividus*. *mdpi.com*, 2020.

CAO, S. et al. Replacement of fishmeal by spirulina *Arthrospira platensis* affects growth, immune related-gene expression in gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III), and its challenge against *Aeromonas hydrophila* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 79, p. 265–273, 1 ago. 2018a.

CAO, S. P. et al. Effects of dietary fishmeal replacement with *Spirulina platensis* on the growth, feed utilization, digestion and physiological parameters in juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). *Aquaculture Research*, v. 49, n. 3, p. 1320–1328, 1 mar. 2018b.

CARNEIRO, W. F. et al. Replacing fish meal by *Chlorella* sp. meal: Effects on zebrafish growth, reproductive performance, biochemical parameters and digestive enzymes. *Aquaculture*, v. 528, p. 735612, 15 nov. 2020.

CASTRO, T. F. D. 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, 1 set. 2018.

CEJAS, J. R. et al. Lipid and fatty acid composition of muscle and liver from wild and captive mature female broodstocks of white seabream, *Diplodus sargus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 138, n. 1, p. 91–102, 1 maio 2004.

CIAN, R. E. et al. **Proteins and carbohydrates from red seaweeds: Evidence for beneficial effects on gut function and microbiota** *Marine Drugs* MDPI AG, , 1 ago. 2015. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/marinedrugs>. Acesso em: 3 jun. 2021

COLLA, L. M.; MUCCILLO-BAISCH, A.; COSTA, J. A. Spirulina platensis effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. **SciELO Brasil**, v. 51, n. 2, p. 405–411, 2008.

COSTA, J. M. **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA Aleph**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista (UNESP), 27 nov.2015. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/136058>>. Acesso em: 30 maio. 2021.

DA ROCHA, B. et al. Uso do fator de condição alométrico e de Fulton na comparação de carpa (*Cyprinus carpio*), considerando os sexos e idade. **redalyc.org**, 2005.

DAMMSKI, A. P. et al. **Zebrafish - Manual de criação em biotério Zebrafish**. 2011.

DAWOOD, M. A. O.; KOSHIO, S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. **Aquaculture**, v. 454, p. 243–251, 1 mar. 2016.

DENG, R.; CHOW, T. J. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae Spirulina. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 28, n. 4, p. e33–e45, 1 ago. 2010.

DEWI, C. D. et al. Improved vitellogenesis, gonad development and egg diameter in catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) supplemented with turmeric (*Curcuma longa*) powder. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 2, p. 651–658, 1 fev. 2018.

EL-ARABY, D. A. et al. Dietary Spirulina platensis phycocyanin improves growth, tissue histoarchitecture, and immune responses, with modulating immunoexpression of CD3 and CD20 in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 546, p. 737413, 15 jan. 2022.

ELABD, H. et al. Nano spirulina dietary supplementation augments growth, antioxidative and immunological reactions, digestion, and protection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, against *Aeromonas veronii* and some physical stressors. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 2143–2155, 1 dez. 2020.

ERICK, J.; PARRA, G. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA RESPOSTAS REPRODUTIVAS DE FÊMEAS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) ALIMENTADAS COM DIFERENTES FONTES PROTÉICAS E LIPÍDICAS TESE DE DOUTORADO**. 2007.

FARAG, M. R. et al. Nutritional and healthical aspects of Spirulina (*Arthrospira*) for poultry, animals and human. **International Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 36–51, 2016.

FARAG, M. R. et al. Neurobehavioral, physiological and inflammatory impairments in response to bifenthrin intoxication in *Oreochromis niloticus* fish: Role of dietary supplementation with *Petroselinum crispum* essential oil. **Aquatic Toxicology**, v. 231, p. 105715, 1 fev. 2021.

FERNANDES, H.; PERES, H.; CARVALHO, A. P. Dietary protein requirement during Juvenile Growth of Zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 13, n. 6, p. 548–555, 1 dez. 2016.

- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **nature.com**, v. 408, p. 239–247, 2000.
- FONTAGNÉ-DICHARRY, S. et al. Effects of dietary oxidized fish oil supplementation on oxidative stress and antioxidant defense system in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 74, p. 43–51, 1 mar. 2018.
- FORMELLA, I. et al. Real-time visualization of oxidative stress-mediated neurodegeneration of individual spinal motor neurons in vivo. **Redox Biology**, v. 19, p. 226–234, 1 out. 2018.
- FOWLER, L. A. et al. Zebrafish nutrition-moving forward. In: **The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications**. [s.l.] Elsevier, 2020.p. 379–401.
- FRIDAVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 97–112, 1995.
- GANECO, L.; NAKAGHI, L.; URBINATI, B. I. Morphological analysis of oocyte development of piracanjuba *Brycon orbignyanus* during the reproductive cycle. **pesquisa.bvsalud.org**, 2001.
- GEFFROY, B.; SIMON, O. Effects of a *Spirulina platensis*-based diet on zebrafish female reproductive performance and larval survival rate. **Cybium**, v. 37, n. 1–2, p. 31–38, 2013.
- GLENCROSS, B. D.; BOOTH, M.; ALLAN, G. L. **A feed is only as good as its ingredients - A review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds** Aquaculture Nutrition John Wiley & Sons, Ltd, 1 fev. 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2095.2007.00450.x>>Acesso em: 30 maio. 2021
- GUILHERME, H. DE O. Comportamento alimentar, desempenho e bioquímica sanguínea de *Colossoma macropomum* em diferentes esquemas de alimentação. 2021.
- GUPTA, T.; MULLINS, M. C. Dissection of organs from the adult zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, n. 37, p. 1717, 2010.
- GÜROY, B. 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.
- HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for Differentiation of Glutathione S-Transferases. **Methods in Enzymology**, v. 77, n. C, p. 398–405, 1 jan. 1981.
- HALLIWELL, B. Freeradicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257–265, 1 maio 2012.
- HAN, L. et al. [Isolation of pancreatic lipase activity-inhibitory component of *spirulina platensis* and it reduce postprandial triacylglycerolemia]. **Yakugaku Zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 126, n. 1, p. 43–49, 1 jan. 2006.
- HASSAAN, M. S. et al. Comparative study on the effect of dietary β -carotene and

phycocyanin extracted from *Spirulina platensis* on immune-oxidative stress biomarkers, genes expression and intestinal enzymes, serum biochemical in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 108, p. 63–72, 1 jan. 2021.

HEDAYATIRAD, M. et al. Transgenerational disrupting impacts of atrazine in zebrafish: Beneficial effects of dietary spirulina. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 230, p. 108685, 1 abr. 2020.

HOSEINIFAR, S. H. et al. The study of some haematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga (*Huso huso*) fed oligofructose. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 91–96, 24 mar. 2011.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 25 abr. 2013.

IBRAHEM, M. D.; MOHAMED, M. F.; IBRAHIM, M. A. The Role of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) in Growth and Immunity of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Its Resistance to Bacterial Infection. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 6, 2013.

INOBUCHI, T. et al. Protein Kinase C–Dependent Increase in Reactive Oxygen Species (ROS) Production in Vascular Tissues of Diabetes: Role of Vascular NAD(P)H Oxidase. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. suppl 3, p. S227–S232, 1 ago. 2003.

IZQUIERDO, M. S.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A. G. J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. In: **Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture**. Elsevier, 2001. p. 25–42.

JAMES, R. et al. Effect of dietary spirulina level on growth, fertility, coloration and leucocyte count in red swordtail, *Xiphophorus helleri*. **ija.scholasticahq.com**, v. 58, n. 2, p. 97–104, 2006.

JIANG, W. et al. *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* as a protein source could improve growth, feed utilisation and digestion and physiological status in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Aquaculture Reports**, v. 22, p. 100932, 1 fev. 2022.

JOBLING, M. Fish nutrition research: past, present and future. **Aquaculture International**, v.24, n. 3, p. 767–786, 1 jun. 2016.

KHALIL, S. R.; REDA, R. M.; AWAD, A. Efficacy of *Spirulina platensis* diet supplements on disease resistance and immune-related gene expression in *Cyprinus carpio* L. exposed to herbicide atrazine. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 67, p. 119–128, 1 ago. 2017.

KHAN, M. A.; JAFRI, A. K.; CHADHA, N. K. Effects of varying dietary protein levels on growth, reproductive performance, body and egg composition of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). **Aquaculture Nutrition**, v. 11, n. 1, p. 11–17, 1 fev. 2005.

KHANZADEH, M.; ESMAEILI FEREDOUNI, A.; SEIFI BERENJESTANAKI, S. Effects of partial replacement of fish meal with *Spirulina platensis* meal in practical diets on growth, survival, body composition, and reproductive performance of three-spot gourami (*Trichopodus trichopterus*) (Pallas, 1770).

Aquaculture International, v. 24, n. 1, p. 69–84, 1 fev. 2016.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1–2, p. 111–133, 20 abr. 2012.

KJØRSVIK, E.; HOEHNE-REITAN, K.; REITAN, K. I. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture**, v. 227, n. 1–4, p. 9–20, 10 nov. 2003.

KOHEN, R.; NYSKA, A. **Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification** *Toxicologic Pathology* Sage Publications Sage CA: Los Angeles, CA, nov. 2002.

KOLB, A.; HILDEBRANDT, F.; LAWRENCE, C. Effects of Diet and Social Housing on Reproductive Success in Adult Zebrafish, *Danio rerio*. **Zebrafish**, v. 15, n. 5, p. 445–453, 1 out. 2018.

KUZUHARA, H. et al. Food availability before aestivation governs growth and winter reproductive potential in the capital breeding fish, *Ammodytes japonicus*. **PLoS ONE**, v. 14, n.3, 1 mar. 2019.

LABARRÈRE, C. R. et al. Perfil bioquímico do híbrido de Surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum* X *P. corruscans*) criado em diferentes densidades. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, n. 3, p. 251–258, maio 2013.

LAMASON, R. L. et al. Genetics: SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. **Science**, v. 310, n. 5755, p. 1782–1786, 16 dez. 2005.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1390–1393, 1997.

LIANG, H. et al. Dietary leucine modulates growth performance, Nrf2 antioxidant signaling pathway and immune response of juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 73, p. 57–65, 1 fev. 2018.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. **Animal models of human disease: Zebrafish swim into view** *Nature Reviews Genetics* Nature Publishing Group, , maio 2007. Disponível em: <www.nature.com/reviews/genetics>. Acesso em: 16 maio. 2021

LIU, B. et al. Effects of anthraquinone extract from *Rheum officinale* Bail on the growth performance and physiological responses of *Macrobrachium rosenbergii* under high temperature stress. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 1, p. 49–57, 1 jul. 2010.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. **Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*)** *Journal of Thermal Biology* Pergamon, , 1 mar. 2011.

LUPATSCH, I. Quantifying nutritional requirements in aquaculture: The factorial approach. In: **New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental Management**. Elsevier Inc., 2009. p. 417–439.

- LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 17 jan. 2011.
- MACHADO, A. R. et al. Antioxidant capacity of phenolic acids extracted from the biomass from *Spirulina* sp.LEB-18 / Capacidade antioxidante de ácidos fenólicos extraídos da biomassa de *Spirulina* sp.LEB-18. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 25956–25970, 15 mar. 2021.
- MAHMOUD, M. M. A. et al. *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) supplementation improves growth performance, feed utilization, immune response, and relieves oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Pseudomonas fluorescens*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 72, p. 291–300, 1 jan. 2018.
- MAN, Y. B. et al. Growth and intestinal microbiota of Sabah giant grouper reared on food waste-based pellets supplemented with spirulina as a growth promoter and alternative protein source. **Aquaculture Reports**, v. 18, p. 100553, 1 nov. 2020.
- MARTINS, G. et al. Microdiet Formulation with Phospholipid Modulate Zebrafish Skeletal Development and Reproduction. **Zebrafish**, v. 17, n. 1, p. 27–37, 1 fev. 2020.
- MIHALJEVIĆ, I. et al. Interaction of organotin compounds with three major glutathione S- transferases in zebrafish. **Toxicology in Vitro**, v. 62, p. 104713, 1 fev. 2020.
- MIYAZAWA, T. et al. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. **IUBMB Life**, v. 71, n. 4, p.430–441, 1 abr. 2019.
- MOHAMMADIAZARM, H. et al. Effects of spirulina powder (*Spirulina platensis*) as a dietary additive on Oscar fish, *Astronotus ocellatus*: Assessing growth performance, body composition, digestive enzyme activity, immune-biochemical parameters, blood indices and total pigmentation. **Aquaculture Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 252–260, 1 fev. 2021.
- MOMMSEN, T. P.; WALSH, P. J. 5 Vitellogenesis and Oocyte Assembly. **Fish Physiology**, v. 11, n. PA, p. 347–406, 1 jan. 1988.
- MUSTAFA; NAKAGAWA. A review: dietary benefits of algae as an additive in fish feed. **ci.nii.ac.jp**, 1995.
- MUSTAFA, M. G.; UMINO, T.; NAKAGAWA, H. The effect of *Spirulina* feeding on muscleprotein deposition in red sea bream, *Pagrus major*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 10, n. 2–3, p. 141–145, 1 out. 1994.
- NAGAOKA, S. et al. A Novel Protein C-Phycocyanin Plays a Crucial Role in the Hypocholesterolemic Action of *Spirulina platensis* Concentrate in Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 10, p. 2425–2430, 1 out. 2005.
- NAIEL, M. A. E. et al. Beneficial impacts and health benefits of macroalgae phenolic molecules on fish production. **Aquaculture**, v. 534, p. 736186, 15 mar. 2021.
- NAINGGOLAN, A. et al. Ovarian Maturation in Asian Catfish (*Clarias* sp.) by Combination Oodev and Nutrition Addition *Spirulina* plantesis. **International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR) International Journal of Sciences: Basic and Applied Research**, v. 15, n. 1, p. 564–583, 2014.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL et al. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. National academies press, 2011.

NAVARRO, R. D. et al. Níveis de energia digestível na dieta de piauçu (*Leporinus macrocephalus*) no desenvolvimento testicular em estágio pós-larval. 2006.

NOWOSAD, J.; KUCHARCZYK, D.; TARGOŃSKA, K. Enrichment of Zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822) Diet with Polyunsaturated Fatty Acids Improves Fecundity and Larvae Quality. **Zebrafish**, v. 14, n. 4, p. 364–370, 1 ago. 2017.

OLIVA-TELES, A. Nutrition and health of aquaculture fish. **Journal of Fish Diseases**, v. 35, n. 2, p. 83–108, 1 fev. 2012.

PAKRAVAN, S. et al. Partial and total replacement of fish meal by marine microalga *Spirulina platensis* in the diet of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Growth, digestive enzyme activities, fatty acid composition and responses to ammonia and hypoxia stress. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 11, p. 5576–5586, 1 nov. 2017.

PÉREZ-ALVAREZ, I. et al. Protective effects of *Spirulina* (*Arthrospira maxima*) against toxicity induced by cadmium in *Xenopus laevis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 248, p. 109099, 1 out. 2021.

PINDER, A. C.; GOZLAN, R. E. Early ontogeny of sunbleak. **Journal of Fish Biology**, v. 64, n. 3, p. 762–775, 1 mar. 2004.

PRETTO, A. et al. Farelo de crambe nas formas in natura ou reduzida em antinutrientes na dietado jundiá. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 692–698, 2014.

RADHAKRISHNAN, S. et al. Replacement of fishmeal with *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Azolla pinnata* on non-enzymatic and enzymatic antioxidant activities of *Macrobrachium rosenbergii*. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 67, n. 2, p. 25–33, 1 mar. 2014.

RAHIMNEJAD, S. et al. Effects of Dietary Inclusion of *Chlorella vulgaris* on Growth, Blood Biochemical Parameters, and Antioxidant Enzyme Activity in Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 1, p. 103–112, 1 fev. 2017.

RAJASEKAR, P. et al. Isolation and structural characterization of sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis* and its bioactive potential: In vitro antioxidant, antibacterial activity and Zebrafish growth and reproductive performance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 809–821, 1 dez. 2019.

RAJI, A. A. et al. Fishmeal replacement with *Spirulina Platensis* and *Chlorella vulgaris* in African catfish (*Clarias gariepinus*) diet: Effect on antioxidant enzyme activities and haematological parameters. **Research in Veterinary Science**, v. 119, p. 67–75, 1 ago. 2018.

RANZANI-PAIVA, M. J. T. et al. **Métodos para análise hematológica em peixes**. EDUEM, 2013.

REN, H. TAO et al. Combined effect of *Spirulina* and ferrous fumarate on growth parameters, pigmentation, digestive enzyme activity, antioxidant enzyme activity

and fatty acids composition of Yellow River carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture Reports**, v. 21, p. 100776, 1 nov. 2021.

RIVERO-WENDT, L. C. G. et al. Zebrafish: Recomendações de Manutenção em Laboratório.

UNICIÊNCIAS, v. 24, n. 2, p. 141–145, 23 fev. 2020.

ROBERTS, R. J. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. **cabdirect.org**, 2001.

ROOHANI, A. M. et al. Effect of spirulina *Spirulina platensis* as a complementary ingredient to reduce dietary fish meal on the growth performance, whole-body composition, fatty acid and amino acid profiles, and pigmentation of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) juvenil. **Aquaculture Nutrition**, v. 25, n. 3, p. 633–645, 1 jun. 2019.

ROSS, L. G.; ROSS, B. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. p. 222, 2008.

RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia Científica: **Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS⁺**. Fortaleza: Embrapa, 2007a. 4 p. (Embrapa. Comunicado Técnico, 128).

SADO, Y. R.; BICUDO, DE A. Á. J. Prevenção de doenças em peixes tem nutrição como fator determinante. **esalq.usp.br**, 2012.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n. 1–2, p.63–92, 1 mar. 1999.

SAMAEE, S. M.; MANTEGHI, N.; ESTÉVEZ, A. Zebrafish as a model to screen the potential of fatty acids in reproduction. **Zebrafish**, v. 16, n. 1, p. 47–64, 1 fev. 2019.

SANCHO, David et al. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. **Nature**, v. 458, n. 7240, p. 899–903, 2009.

SARGENT, J. Origins and function of egg lipids: Nutritional implication.

ci.nii.ac.jp, 1995. SASSI, G. E. **Exigências proteicas de juvenis de**

Zebrafish (Danio rerio). Disponível em:

<<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/141478>>. Acesso em: 22 mar. 2022.

SAYED, A. E. D. H.; AUTHMAN, M. M. N. The protective role of *Spirulina platensis* to alleviate the Sodium dodecyl sulfate toxic effects in the catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 163, p. 136–144, 15 nov. 2018.

SCHMID, R.; BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. Introduction to the Algae: Structure and Reproduction. **Taxon**, v. 34, n. 3, p. 554, ago. 1985.

SERBAN, M. C. et al. A systematic review and meta-analysis of the impact of *Spirulina* supplementation on plasma lipid concentrations. **Clinical Nutrition**, v. 35, n. 4, p. 842–851, 1 ago. 2016.

SILVA, T. B. DA. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA TAYNARA BRUNING DA SILVA TECNOLOGIA DE BIOFLOCOS (BFT) NO DESEMPENHO DE PEIXES ORNAMENTAIS. 2018.

SIMANJUNTAK, S. B. I. et al. Lipase Activity, Hematological and Blood

Biochemistry of *Osphronemus gouramy* Fed with Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris*. **Molekul**, v. 17, n. 1, p. 85–97, 13 mar. 2022.

SIRINGI, J. O.; TUROOP, L.; NJONGE, F. Growth and biochemical response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to spirulina (*Arthrospira platensis*) enhanced aquaponic system. **Aquaculture**, v. 544, p. 737134, 15 nov. 2021.

SJORS, V. I.; ALESSVERO, F. **Algae based biofuels, Applications and coproducts**. Disponível em: <https://scholar.google.com.br/scholar?hl=ptBR&as_sdt=0%2C5&q=SJORS%2C+V.+I.%3B+ALESSVERO%2C+F.+Algae+based+biofuels%2C+Applications+and+coproducts+Environment+and+natural+resources+management+working+paper+Environment+Climate+Change.+Bioenergy+Monitor>. Acesso em: 14 maio. 2021.

SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S. **Spirulina – From growth to nutritional product: A review** **Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, 1 nov. 2017.

SOUSA, M. C. et al. Morfologia das células sanguíneas de Mandi (*Pimelodus maculatus*, Lacépède, 1803). **faef.revista.inf.br**, 2014.

SPENCE, R. et al. **The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*** **Biological Reviews** John Wiley & Sons, Ltd, , 1 fev. 2008. Disponível em: <www.sanger.ac.uk>. Acesso em: 15 maio. 2021

SPENCE, R.; SMITH, C. Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance. **Behavioral Ecology**, v. 17, n. 5, p. 779–783, 1 set. 2006.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v.24, n. 6, p. 345–351, 1 dez. 2003.

STECH, M. R. et al. **Fatores Que Afetam a Produção De Enzimas Digestivas Em Peixes EO Uso De Enzimas Exógenas Como Ferramentas Em Nutrição De Peixes** **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**. [s.l.: s.n.].

SUWA, K.; YAMASHITA, M. Regulatory mechanisms of oocyte maturation and ovulation. In: **The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications**. [s.l.] Springer Netherlands, 2007. p. 323–347.

TADEU, B.; LIMA, M. Adição de óleo de *Citrus sinensis* na dieta de tilápia-do-Nilo: desempenho produtivo, perfil hematológico e atividade respiratória de leucócitos. 2015.

TEIMOURI, M.; AMIRKOLAIE, A. K.; YEGANEH, S. The effect 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, 1 jun. 2013.

TIBALDI, E. et al. Growth performance and quality traits of European sea bass (*D. labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried *Isochrysis* sp. (T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. **Aquaculture**, v. 440, p. 60–68, 1 abr. 2015.

TOMASELLI, L.; PALANDRI, R. M.; TREDICI, M. R. On the correct use of the *Spirulina* designation. **Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie**,

Supplement Volumes, v. 83, p.539–548, 19 dez. 1996.

TOUGHAN, H. et al. Effect of dietary supplementation with *Spirulina platensis* on Atrazine- induced oxidative stress- mediated hepatic damage and inflammation in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, p. 135–142, 1 mar. 2018.

TRICHET, V. V. Nutrition and immunity: an update. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 3, p. 356–372, 1 fev. 2010.

UPASANI, C. D.; BALARAMAN, R. Protective effect of *Spirulina* on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 4, p. 330–334, 1 abr. 2003.

VASUDEVAN, I. et al. Effect of dietary spirulina level on growth, fertility, coloration and leucocyte count in red swordtail, *Xiphophorus helleri*. **Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh**, v. 58, p. 20433, 2006.

VAZZOLER, E. A. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. **sidalc.net**, 1996.

VELASQUEZ, S. F. et al. Dietary *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) replacement enhances performance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 2, p. 1023–1030, 2016.

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, 20 jul. 2014.

VOLKOFF, H.; LONDON, S. Nutrition and reproduction in fish. **Encyclopedia of Reproduction**, p. 743–748, 2018.

WAGNER, T.; CONGLETON, J. L. Blood chemistry correlates of nutritional condition, tissue damage, and stress in migrating juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). <https://doi.org/10.1139/f04-050>, v. 61, n. 7, p. 1066–1074, jul. 2004.

WALKER, A. B.; BERLINSKY, D. 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, 1 jan. 2011.

WALLACE, R. A. Vitellogenesis and Oocyte Growth in Nonmammalian Vertebrates. **Developmental biology (New York, N.Y. : 1985)**, v. 1, p. 127–177, 1985.

WARNER, H. R. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, n. 3, p. 249–258, 1 set. 1994.

WATANUKI, H. et al. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, v. 258, n. 1–4, p. 157–163, 31 ago. 2006.

WATTS, S. A. et al. The Vital Relationship between Nutrition and Health in Zebrafish. **Zebrafish**, v. 13, p. S72–S76, 1 jul. 2016.

WATTS, S. A.; POWELL, M.; D'ABRAMO, L. R. Fundamental approaches to the study of zebrafish nutrition. **ILAR Journal**, v. 53, n. 2, p. 144–160, 1 jun. 2012.

WESTERFIELD, M. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 5th Edition. **University of Oregon Press, Eugene (Book)**, 2007.

WU, Q. et al. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. **Archives of Toxicology** **2016** **90:8**, v. 90, n. 8, p. 1817–1840, 3 jun.2016.

XIA, Y. et al. Arthrospira platensis additive enhances the growth performance and antioxidant response in hybrid yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*♀ × *Pelteobagrus vachelli*♂). **Aquaculture Reports**, v. 20, p. 100721, 1 jul. 2021.

XIANG, Y. et al. The analysis of the effect of reducing triglyceride level in serum of hyperlipidemia model rats by feeding Spirulina maxima. **europepmc.org**, 2002.

XU, W. J.; PAN, L. Q. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. **Aquaculture**, v. 412–413, p. 117–124, 1 nov. 2013.

YAN, S. H. et al. Thiamethoxam induces oxidative stress and antioxidant response in zebrafish (*Danio rerio*) livers. **Environmental Toxicology**, v. 31, n. 12, p. 2006–2015, 1 dez. 2016.

YEGANEH, S.; TEIMOURI, M.; AMIRKOLAIE, A. K. 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, 1 ago. 2015.

YIN, G. et al. Dietary administration of laminarin improves the growth performance and immune responses in *Epinephelus coioides*. **Elsevier**, 2014.

YU, W. et al. 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 and Shellfish Immunology**, v. 74, p. 649–655, 1 mar. 2018.

ZHANG, F. et al. **Application of Spirulina in aquaculture: a review on wastewater treatment and fish growth** **Reviews in Aquaculture** Wiley-Blackwell, 1 maio 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/raq.12341>>. Acesso em: 14 maio. 2021

ZHANG, M. Z. et al. Effects of fish oil on ovarian development in spotted scat (*Scatophagus argus*). **Animal Reproduction Science**, v. 141, n. 1–2, p. 90–97, 1 set. 2013.

ZHU, Z. et al. Effects of ration levels on growth and reproduction from larvae to first-time spawning in the female *Gambusia affinis*. **mdpi.com**, v. 16, p. 5604–5617, 2015.