

*Efeito da suplementação da dieta com Gracilaria gracilis na
performance do crescimento, resposta imune e stress oxidativo de
Sparus aurata*

Emma Aline Fernandes Oliveira Gomes

[2020]

*Efeito da suplementação da dieta com Gracilaria gracilis na
performance do crescimento, resposta imune e stress oxidativo de
Sparus aurata*

Emma Aline Fernandes Oliveira Gomes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Especialista Teresa Baptista e
coorientação da Doutora Clélia Afonso

[2020]

Título: Efeito da suplementação da dieta com *Gracilaria gracilis* na performance do crescimento, resposta imune e stress oxidativo de *Sparus aurata*

Copyright © Emma Aline Fernandes Oliveira Gomes

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2020

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Muitas pessoas me apoiaram e ajudaram na realização da dissertação de mestrado, queria expressar a minha imensa gratidão, especialmente:

- Aos meus pais Marco Gomes, Dilma Fernandes e Adelaide Fernandes, que tiveram sempre comigo desde o primeiro dia (mesmo longe), acreditaram em mim e me deram muita força em todos os momentos.
- Às minhas orientadoras, a Especialista Teresa Baptista e a Doutora Clélia Afonso pela oportunidade, por todo o apoio e empenho demonstrado;
- Ao meu grande amigo, Hortêncio Lima por sempre ter acreditado em mim e ter sido o meu maior encorajador e minha inspiração, me dando forças nos momentos mais difíceis;
- Aos Mestres Ricardo Passos, Pedro Pires e Damiana Pires por toda a ajuda, paciência que tiveram comigo e por tudo o que me ensinaram;
- À Eloisa Silva um especial obrigado, mais que uma tia, uma segunda mãe que me ajudou sempre em tudo o que pôde nesta minha trajetória assim como a minha querida tia Hírdina Santos;
- A ti, Hélio Pires, por todo o amor e companheirismo neste período. Tiveste sempre presente e acreditaste sempre em mim;
- As minhas amigas Mirta Fonseca, Dircilene Fortes, Larisa Monteiro, Larissa Rodrigues, Evelyn Oliveira e Anira Assunção, que mesmo longe fizeram-se sempre presentes animando os meus dias.

Resumo:

Com o elevado crescimento do setor de aquacultura, o interesse no estudo da performance do crescimento de peixes e no fortalecimento do sistema imunológico, tem aumentado. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de *Gracilaria gracilis* à ração de dourada, assim como avaliar o seu potencial de defesa num *challenge* bacteriano. Foram analisados os parâmetros de crescimento, parâmetros hematológicos, a performance imunológica (lisozima e peroxidase), as enzimas antioxidantes do *stress* oxidativo, parâmetros metabólicos plasmáticos e foi feita uma avaliação de alterações morfológicas dos intestinos. A dieta suplementada com 5% de *G. gracilis* moída, promoveu o crescimento, protegeu contra infecção por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* e influenciou positivamente o perfil hematológico. Para além disso, não provocou alterações na morfologia do intestino, assim como não comprometeu a atividade das enzimas antioxidantes do *stress* oxidativo. Os peixes alimentados com a dieta suplementada com 5% de *G. gracilis* moída apresentaram contagem elevada de trombócitos, o que pode justificar a alta proteção contra a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, conferindo 95% de sobrevivência. A resposta imune não foi comprometida, tendo a dieta de extrato de alga a 0,15% apresentado uma maior concentração de lisozima. Em conclusão, a suplementação com alga moída foi capaz de melhorar a saúde dos peixes conferindo maior resistência bacteriana e melhor crescimento, o que permite considerar a *G. gracilis* um bom suplemento dietético para a aquacultura sustentável.

Palavras chave: Macroalgas; Aquacultura; Nutrição de peixes; Metabolismo de peixe; *stress* oxidativo

Abstract

With the rising growth of the aquaculture sector, the interest in studying the performance of fish growth and in strengthening the immune system, has been increasing. This study aimed to evaluate the immunostimulatory effect of *Gracilaria gracilis* in gilthead seabream feed, as well as to evaluate its defense potential in a bacterial challenge. Growth parameters were analyzed, and analytical tests were performed to determine hematological parameters, immunological performance (lysozyme and peroxidase), antioxidant enzymes from oxidative stress, plasma metabolic parameters and evaluation of morphologic alterations on the intestines. The diet supplemented with milled *G. gracilis* at 5%, improved growth, protected against infection by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and positively influenced the hematological profile. In addition, it did not cause changes in the intestine's morphology, nor did it compromise the activity of oxidative stress antioxidant enzymes. The 5% diet of milled *G. gracilis* showed high numbers of thrombocytes, which may justify the high protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, ensuring 95% survival. The immune response was not compromised, and the 0.15% seaweed extract diet showed a higher concentration of lysozyme. In conclusion, supplementation with milled algae was able to improve the health of the fish, providing greater bacterial resistance and better growth, which allows *G. gracilis* to be considered a good dietary supplement for sustainable aquaculture.

Keywords: Macroalgae; Aquaculture; Fish nutrition; Fish metabolism; oxidative stress

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice	xi
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xv
1- Introdução	1
1.1- Macroalgas	2
1.2- Uso de algas como imunoestimulantes em rações de peixe	3
1.3- Sistema Imune	5
1.4- <i>Stress</i> Oxidativo	6
1.5- Hematologia	7
1.6- Objetivo	9
2- Material e Métodos	9
2.1- Declaração de ética	9
2.2- Dieta experimental	9
2.3- Desenho experimental	10
2.3.1- <i>Challenge</i> com a <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	11
2.4- Cálculos do crescimento	12
2.5- Analítica.....	12
2.5.1- Hematologia	12
2.5.2- Parâmetros imunológicos	13
2.5.3- Parâmetros de <i>stress</i> oxidativo	14
2.5.4- Parâmetros metabólicos	17
2.5.5- Análise histológica	17
2.6- Análise estatística	18
3- Resultados	19
3.1- Performance do crescimento	19
3.2- Hematologia	19

3.3- Parâmetros imunológicos	20
3.4- Parâmetros de <i>stress</i> oxidativo	20
3.5- Parâmetros metabólicos	23
3.6- Histologia	23
3.7- <i>Challenge</i> com <i>Phdp</i>	24
4- Discussão e conclusão	27
Referências Bibliográficas	35

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema representativo dos tanques referentes a cada tratamento	11
Figura 2 – Parâmetros imunológicos em douradas alimentadas com dietas diferentes por 52 dias (média ± DP), n = 7 para atividade da peroxidase (A), n = 6 para a lisozima (B). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).....	20
Figura 3 – Parâmetros de <i>stress</i> oxidativo em douradas alimentadas com dietas diferentes por 52 dias (média ± DP), n = 8 para atividades de Catalase, GST e TG (A, D e E, respectivamente), n = 9 para LPO (B) e n = 7 para a atividade da SOD (C). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).....	21
Figura 4 - Mortalidade observada no <i>Challenge</i> com <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> em douradas durante 14 dias, alimentadas com diferentes dietas (média ± DP, n = 3). Diferenças estatisticamente significantes identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).....	25

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição proximal das rações (média ± DP).....	10
Tabela 2 – Parâmetros de crescimento das douradas alimentadas com as diferentes dietas durante 52 dias, (média ± DP). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).....	19
Tabela 3 – Resultados hematológicos de douradas alimentadas com dietas diferentes. Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).....	20
Tabela 4 – Parâmetros metabólicos das douradas alimentadas com as diferentes dietas. Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$), e os resultados sem letras não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.....	23
Tabela 5 - Alterações estruturais e morfológicas no intestino de douradas alimentadas com diferentes dietas. As alterações foram classificadas em: comprimento das vilosidades intestinais – comprido ou curto; posição do núcleo - basal ou apical; largura da lâmina própria e submucosa - fina ou espessa; ausente (-); leve (+); moderado (++); grave (+++); e a percentagem de indivíduos em que se observaram essas alterações.....	24

1- Introdução

A população mundial tem vindo a crescer num ritmo muito acelerado, e segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura prevê-se que será necessário assegurar a produção alimentar para 9 mil milhões de pessoas em 2050. Acompanhando esta tendência, o fornecimento global de pescado para consumo humano tem aumentado, permitindo um consumo crescente *per capita* (de 9,9 kg em 1960 para 20,5 kg em 2018) (FAO, 2020). Com as capturas de pescado estáveis desde 1980, é a aquacultura que tem respondido à crescente procura mundial, tendo atingido em 2018, uma produção de 82,1 milhões de toneladas associadas a um valor de cerca de 222 mil milhões de euros. A aquacultura tem sido desde o início, um sector em expansão, tendo desde 2014, contribuído mais do que a pesca para o fornecimento de peixe para o consumo humano. Este facto representa um importante avanço no sentido de controlar a pressão sobre os stocks naturais, e garantir um abastecimento de pescado mais sustentável (FAO, 2020). A aquacultura tem crescido a uma taxa média anual de 5,6%, nos últimos 10 anos, produzindo atualmente cerca de 52% do peixe consumido em todo o mundo, e as estimativas apontam que em 2030 a aquacultura contribua com 60% do pescado para consumo humano e a sua produção supere a pesca (54%) (FAO, 2020). Apesar deste crescimento, a aquacultura apresenta alguns impedimentos quanto ao seu potencial desenvolvimento. As doenças infecciosas são a maior e mais frequente causa de perda económica significativa e podem ser causadas pela presença de diferentes patógenos. Para controlar estas doenças, são utilizados agentes antimicrobianos (Plant & Lapatra, 2011). Os antibióticos têm sido rotineiramente administrados, mas apresentam impactos negativos no meio ambiente e na saúde, o que inclui o desenvolvimento de estirpes bacterianas multirresistentes, a presença de resíduos nos tecidos comestíveis e a supressão do sistema imunológico (Bricknell & Dalmo, 2005; Tu *et al.*, 2008). Por estas razões, foram criados regulamentos rigorosos para controlar o uso de antibióticos na Europa, Estados Unidos e noutros países. Além disso o número de moléculas cuja utilização é autorizada em peixes, tem diminuído drasticamente o que desencadeou o desenvolvimento de estratégias alternativas para aumentar a resistência dos peixes a doenças (Gatlin, 2002).

1.1- Macroalgas

O ambiente marinho, devido à sua incrível biodiversidade, é um recurso natural rico em muitos compostos biologicamente ativos (Molinski *et al.*, 2009; Lordan *et al.*, 2011). Muitos organismos marinhos vivem em habitats complexos, expostos a condições extremas e, ao se adaptarem a novos ambientes produzem uma grande variedade de metabolitos primários e secundários que não podem ser encontrados noutros organismos (Lordan *et al.*, 2011). Os compostos bioativos marinhos podem ser originários de uma vasta gama de organismos, incluindo plantas marinhas, macro e microalgas ou microrganismos, todos contendo o seu conjunto exclusivo de biomoléculas (Rasmussen & Morrissey, 2007). Em particular, as macroalgas produzem muitos compostos biologicamente ativos, que incluem, entre outros, carotenoides, terpenóides, clorofilas, ficobilinas, ácidos gordos polinsaturados, polissacarídeos, vitaminas, esteróis, tocoferóis e ficocianinas (Michalak & Chojnacka, 2015; Peixoto *et al.*, 2016a, b, c; Wan *et al.*, 2018). Muitos destes compostos bioativos produzidos pelas macroalgas são conhecidos por serem potencialmente úteis na área da saúde e nutrição (Kadam & Prabhasankar, 2010). As algas representam 30,1% da biomassa e 9,7% do valor da produção global da aquacultura, estimada em 32,4 milhões de toneladas em 2018 (FAO, 2020).

Gracilaria gracillis é uma macroalga vermelha (*Rhodophyta*) muito abundante em estuários ou baías, frequentemente encontradas na zona subtidal com menos de 1 metro de profundidade, ligadas a rochas ou flutuando livremente, em ambientes com fluxo de água reduzido podendo viver em ambientes ricos em amónia ou nitratos (Lyra *et al.*, 2016). São eurihalinas, o que significa que podem tolerar uma ampla gama de salinidades, que varia entre 10 e 40 ppt, embora cresçam melhor a uma salinidade entre 25 e 33 ppt e toleram uma ampla gama de temperatura sendo a ótima entre 20 e 28°C (Torres *et al.*, 2019). A *Gracilaria* é notável pela sua importância económica como agarófita, devido ao seu conteúdo elevado de ficocolóides, sendo a principal fonte de ágar α -(1,4)-3,6-anhydro-l-galactose e β -(1,3)-d-galactose e também como alimento para seres humanos e animais marinhos. É considerada uma fonte de compostos bioativos, possuindo vários componentes interessantes, como lípidos, proteínas, hidratos de carbono, ficobiliproteínas, fenóis e fitoquímicos biologicamente ativos (Francavilla *et al.*, 2013). Estas algas também produzem metabolitos bioativos importantes com atividade antibiótica, como ácido acrílico e eicosanóides, precursores das prostaglandinas. Estas moléculas relevantes, que resultam da oxidação de ácidos

gordos polinsaturados (PUFA) originárias do ácido araquidônico e dos ácidos eicosapentaenólicos, são essenciais para contrariar processos de inflamação (De Almeida *et al.*, 2011).

1.2- Uso de algas como imunostimulantes em rações de peixes

Um imunostimulante pode ser definido como, um composto de origem natural que modula o sistema imunológico, aumentando a resistência do hospedeiro contra doenças infecciosas (Zhang *et al.*, 2013). Atuam melhorando os mecanismos de defesa não específicos, que podem ocorrer antes de qualquer exposição a um patógeno, aumentando a sobrevivência. Os imunostimulantes podem ser agrupados de acordo com sua origem: bacteriana (por exemplo, glucanos), derivados de algas, ou de origem animal (por exemplo, quitosano) e hormonas (citocinas e outros) (Caipang & Lazado, 2015).

O desenvolvimento no setor de aquicultura nas últimas décadas aumentou o interesse no estudo da performance do crescimento de peixes e no fortalecimento do sistema imunológico, através da manipulação da dieta (Banerjee & Ray, 2017). Isto levou à procura de métodos alternativos de prevenção de doenças recorrendo a compostos imunostimulantes, probióticos, prebióticos e simbióticos, como aditivos na dieta (Faggio *et al.*, 2015). A administração de suplementos alimentares funcionais tem sido a abordagem alternativa ao uso de produtos quimioterápicos, sendo considerado o método mais ecológico de prevenção das doenças nos peixes. Existem várias fontes de compostos imunostimulantes comprovadamente eficazes na prevenção de doenças de peixes, nomeadamente aqueles que são extraídos de algas marinhas (Wan *et al.*, 2018). Adicionalmente, alguns extratos de algas marinhas possuem atividade antiviral e antibacteriana, mostrando resultados encorajadores na suplementação de ração para peixes, especialmente quando provenientes de algas vermelhas (Sahu *et al.*, 2008; Rizzo *et al.*, 2017; Hoseinifar *et al.*, 2018). Além disso, em instalações de produção intensiva, os peixes são expostos continuamente a várias práticas zootécnicas como manuseamento, confinamento, captura e transporte, que são potenciais causadores de *stress* (Iversen *et al.*, 2005; Shabani *et al.*, 2016) daí a importância do uso de dietas funcionais que visem um melhor rendimento da produção (Li *et al.*, 2008; Wassef *et al.*, 2013), a modulação do metabolismo dos peixes (Peixoto *et al.*, 2016a), da imunidade (Ibrahim *et al.*, 2010) e o reforço das defesas antioxidantes (Xu *et al.*, 2011).

A compreensão dos efeitos da suplementação de algas marinhas é particularmente importante na aquicultura, porque os protocolos de produção geralmente induzem condições de *stress* que afetam as respostas do sistema imunológico (Scapigliati *et al.*, 2002). A longo prazo, esta situação pode comprometer o desempenho do crescimento (Leal *et al.*, 2011) o bem-estar animal e, finalmente, causar uma redução nas receitas. Já há estudos que sugerem que a ração suplementada com algas marinhas pode diminuir a resposta ao *stress* e melhorar a resistência a doenças (Samad, 2013; Araújo *et al.*, 2016) e a qualidade da carne dos peixes (Valente *et al.*, 2015).

As doenças causadas por infecções bacterianas são a mais importante e frequente causa de morte em peixes marinhos (Cruz *et al.*, 2012; Rodger, 2016). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*) é um patógeno bacteriano, bem conhecido em aquicultura, sendo responsável por surtos de doença e importantes perdas económicas (Romalde 2002; Andreoni & Magnani, 2014). A pasteurelose causada por *Phdp* continua a ser a septicémia mais importante nas explorações aquícolas no mediterrâneo causando mortalidade muito elevada (Romalde, 2002; Rodger, 2016). A suplementação com 5% de *Ulva* spp. demonstrou aumentar a resistência à infeção por *Phdp* em pargos (Sato, 1987) e também a suplementação com *Ulva* spp. e extratos de *Chondrus crispus* demonstraram aumentar a estimulação do sistema imunológico nos fagócitos do pregado e do salmão do Atlântico (Castro *et al.*, 2004). Vários estudos comprovaram que a adição de pequenas quantidades (2,5 - 10%) de algas às dietas de peixes resultaram em efeitos positivos, incluindo aumento de crescimento, eficiência na utilização da ração, condição fisiológica, resistência a doenças, melhor resposta ao *stress* (Emre *et al.*, 2013; Norambuena *et al.*, 2015), alteração da microbiota intestinal e melhor retenção proteica durante o período de inverno (Norambuena *et al.*, 2015). Além da imunocompetência, foi relatada uma correlação positiva entre o conteúdo fenólico das algas e a capacidade antioxidante através da inibição da peroxidação lipídica (Heo *et al.*, 2005). Extratos de algas marinhas vermelhas e castanhas podem também ser utilizadas em tratamentos terapêuticos e profiláticos eficazes contra *Pseudomonas* spp. (Thanigaivel *et al.*, 2015) e a suplementação dietética de *Gracilaria* spp. levou a melhores respostas antioxidantes e do sistema inato em robalo (Peixoto *et al.*, 2016c).

As algas vermelhas, como as do género *Gracilaria* spp., tendem a ter um elevado teor de proteínas (de 10 a 50%), facto muito importante para o crescimento dos peixes (Makkar *et al.*, 2016). Queiroz *et al.* (2014) testaram o uso de *Gracilaria* spp., *Ulva* spp. e *Fucus* spp. em dois níveis

diferentes de suplementação (2,5% e 7,5%) e com uma dieta suplementada em mistura a 7,5% (2,5% de cada alga), e concluíram que, embora a performance do crescimento não tenha sofrido alteração, as respostas imunológica e antioxidante de *S. aurata* foram substancialmente melhoradas.

1.3- Sistema Imune

O rápido desenvolvimento da aquacultura aumentou a frequência de surtos de doenças, estando bem documentado que a ocorrência de patologias depende do equilíbrio entre hospedeiro, patógeno e ambiente, três fatores com interação contínua (Roberts, 2012). O sistema de defesa de peixes é muito semelhante ao descrito em mamíferos, como em outros vertebrados. O sistema imunológico inato de peixes é filogeneticamente mais antigo que o sistema adaptativo e fornece a primeira linha de defesa (Hirano, 2018).

A resposta imune é desencadeada sempre que há uma infecção bacteriana, o que resulta no aumento de células fagocíticas para o local da infecção que produzem substâncias como a lisozima, o sistema complemento e compostos antiproteases que ajudam a combater a infecção (Ellis, 2001; Machado *et al.*, 2015). Portanto, a atividade da lisozima, peroxidase e complemento podem ser usadas para monitorizar a saúde dos peixes (Peixoto *et al.*, 2016c).

A lisozima é uma enzima importante na defesa inata e está presente em invertebrados e vertebrados, é sintetizada no fígado e em locais extra-hepáticos em peixes, envolvida na hidrólise (e lise) das ligações glicosídicas ligadas a β - (1,4) dos peptidoglicanos da parede celular bacteriana (Saurab & Sahoo, 2008). Embora primariamente associada à defesa contra bactérias Gram-positivas, a lisozima também está envolvida na defesa contra bactérias Gram-negativas, parasitas e vírus podendo ser encontradas em muitos locais, como muco, plasma e tecido linfóide e são principalmente associadas e sintetizadas por macrófagos, neutrófilos e monócitos (Carbone & Faggio, 2016). Estudos demonstraram que a atividade da lisozima plasmática pode ser influenciada por vários fatores, como o *stress*, temperatura, tipo de alimentação, entre outros (Torrecillas *et al.*, 2007).

A peroxidase é uma enzima principalmente produzida pelos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, ou seja, após a ativação, os neutrófilos libertam peróxido de hidrogénio e mieloperoxidase, uma

glicoproteína lisossômica contendo um grupo heme. A mieloperoxidase catalisa as reações do íon cloreto e o peróxido de hidrogênio para formar o ácido hipocloroso, danificando os microrganismos invasores (Klebanoff, 1968; Nayak, 2010). As peroxidases libertadas pelos grânulos citoplasmáticos dos fagócitos, participam nas respostas oxidativas contra patógenos. Sabe-se que os níveis de peróxido sérico aumentam em resposta à infecção (Alvarez-Pellitero, 2008). Portanto, a quantidade de peroxidases libertadas no sangue é frequentemente usada como um indicador do estado imunológico.

1.4- Stress Oxidativo

Uma consequência de toda a vida aeróbia é a produção de espécies potencialmente prejudiciais e parcialmente reduzidas em espécies reativas de oxigênio (ROS), que ocorrem como resultado do metabolismo normal do oxigênio. Estima-se que cerca de 1 a 3% do O₂ consumido em sistemas animais seja convertido em ROS, gerado por processos físicos, químicos e metabólicos (Dong *et al.*, 2017). Estes convertem O₂ em espécies reativas de oxigênio, como superóxido, radicais hidroxilo e peróxido de hidrogênio não radical. Embora os ROS forneçam ao organismo proteção inata humoral contra patógenos, na atividade da peroxidase, distúrbios no estado redox normal das células podem causar um efeito tóxico, danificando as componentes celulares, incluindo proteínas, lipídios e DNA. Além disso, o *stress* oxidativo grave pode desencadear apoptose, enquanto danos oxidativos extremos prolongados podem causar necrose dos tecidos (Schieber & Chandel, 2014).

Os níveis de dano oxidativo e os parâmetros do metabolismo energético estão entre os biomarcadores mais usados para determinar o estado de saúde dos peixes. Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) são bons indicadores de sobreprodução de ROS e danos oxidativos induzidos nas células (Biller & Takahashi, 2018). Estudos anteriores sugeriram que o *stress* oxidativo em peixes de aquacultura pode estar correlacionado com vários tipos de condições stressantes, como composição da alimentação, jejum, densidade, hipoxia, condições térmicas agudas e doenças infecciosas (Vinagre *et al.*, 2012). Um dos órgãos mais importantes e que tem sido o foco de estudos toxicológicos é o fígado, que demonstrou ser muito sensível à presença de oxidantes (Ameur *et al.*, 2012). Portanto, é aceite que a monitorização das atividades de enzimas antioxidantes no fígado possa permitir uma boa avaliação do estado antioxidante do organismo.

Os sistemas antioxidantes podem ser divididos em duas categorias: enzimático, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidases; e eliminadores de radicais livres, como carotenoides, peptídeos, aminoácidos e compostos fenólicos. Estes sistemas são capazes de prevenir danos à membrana celular, inativação enzimática e alterações de ácidos nucleicos causadas por ROS (Cannizzo *et al.*, 2011).

1.5- Hematologia

Os parâmetros hematológicos são uma ferramenta importante para avaliar as alterações fisiológicas e patológicas (Gabriel *et al.*, 2011), podendo ser mais rápida, prática e barata como método para identificar patologias em peixes (Satake *et al.*, 2009). A avaliação hematológica de rotina dos peixes inclui a determinação da contagem total de eritrócitos (RBC), hematócrito (PCV), concentração de hemoglobina (Hb), índices de eritrócitos, contagem total de leucócitos (WBC) e contagem diferencial de células sanguíneas: neutrófilos, monócitos, trombócitos e linfócitos (Campbell, 2004).

O hematócrito é a percentagem do volume do sangue (células + plasma) ocupado pelas células sanguíneas (Ranzani-Paiva *et al.*, 2013). Muitas vezes usa-se o hematócrito em vez da contagem dos glóbulos vermelhos, como indicação diagnóstica, em casos em que se suspeita de alteração do número de glóbulos vermelhos em circulação, uma vez que o hematócrito expressa a concentração de eritrócitos (Fazio, 2018).

O volume corpuscular médio (MCV), a hemoglobina corpuscular média (MCH) e a concentração de hemoglobina média (MCHC) podem ser calculados e derivam do hematócrito, da hemoglobina, e da contagem de eritrócitos, de acordo com Tavares-Dias & Moraes (2004). De acordo com Houston (1990), MCV está relacionado com a dinâmica cardíaca e com o fluxo sanguíneo e a MCH demonstra o estado da função respiratória.

Os eritrócitos dos peixes, assim como os mamíferos, contêm hemoglobina e, portanto, são ativos no transporte de oxigênio para todos os tecidos e órgãos do corpo (Clauss *et al.*, 2008). Tal como nos mamíferos, há evidências de que níveis e formas anormais de eritrócitos estão associados a patologias.

O estudo dos leucócitos, as células defensivas do corpo, é importante para avaliar o estado de saúde dos peixes. Os seus níveis têm implicações nas respostas imunes e na capacidade do animal de combater a infecção. Segundo alguns autores (Luskova, 1997; Modrá, *et al.*, 1998; Fazio *et al.*, 2015), os níveis de leucócitos dependem de vários fatores, como temperatura da água, *stress* ambiental, idade e sexo.

Os trombócitos de peixes são uma parte importante do processo de coagulação, convertendo protrombina em trombina. Fink *et al.* (2015) sugeriram que os trombócitos também participam na função imune e apresentam atividade fagocítica. Ao contrário dos trombócitos de mamíferos, os trombócitos dos peixes são células completas (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Os linfócitos, segundo Hirano *et al.* (2013), são células predominantemente arredondadas, de tamanho variado, com o citoplasma basofílico e sem granulações visíveis. O núcleo possui forma arredondada, cromatina densa, sendo elevada a sua relação com o citoplasma. Os linfócitos, em geral, apresentam projeções citoplasmáticas, o que facilita diferenciá-los dos trombócitos nas extensões sanguíneas.

Os monócitos possuem o citoplasma com grande quantidade de mitocôndrias e vacúolos, algum retículo endoplasmático e complexo de Golgi, sendo consideradas verdadeiras células em trânsito no sangue periférico, como cita Tharall *et al.* (2012). Eles atuam na reação inflamatória e resposta imunológica nas quais ocorre a fagocitose, sendo de extrema importância aos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Os neutrófilos nos peixes teleósteos são arredondados e seu citoplasma possui granulações acidófilas muito finas. O núcleo apresenta forma de bastonete, com a cromatina nuclear pouco compactada e sem nucléolo visível; podem aderir às células endoteliais e transmigrar para os focos inflamatórios atraídos por quimiotaxia, de acordo com Tavares-Dias & Moraes (2004). São os mais abundantes em circulação e são os principais defensores do sistema imunológico inato. Essas células fagocíticas ingerem bactérias em fagossomas (Segal, 2005).

1.6- Objetivo

O presente estudo, está inserido no projeto MAR2020 n° 16-02-01-FMP-0084 “SEAWEEEDFEEDS- Macroalgas e bem-estar animal, suplementação de rações para peixes marinhos”. O estudo tem como objetivo suplementar uma ração para douradas (*Sparus aurata*) com *Gracilaria gracilis*, para avaliar a performance do crescimento, o efeito imunoestimulador, avaliar o *stress* oxidativo, assim como potencial de defesa contra infecção por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

2- Materiais e Métodos

2.1 Declaração de ética

O presente estudo foi realizado sob a supervisão de um especialista credenciado, em ciência de animais de laboratório, pela Autoridade Veterinária Portuguesa (seguindo as recomendações da categoria C da FELASA), de acordo com as diretrizes sobre proteção de animais utilizados para fins científicos pela Diretiva Europeia 2010/63/UE e ao abrigo de uma autorização de projeto 0421/000/000/2019.

2.2 Dieta experimental

A alga *G. gracilis*, foi recolhida na Lagoa de Óbidos (39°24'01.0"N 9°13'11.0"W) e levada para as instalações do CETEMARES (MARE - Politécnico de Leiria, Peniche, Portugal), onde foi feita a remoção de lama, outras algas e impurezas, e então foi submetida a três procedimentos visando a obtenção de alga moída, extrato de algas e ficocolóides. A alga moída foi obtida seguindo a metodologia descrita em Passos *et al.* (2020), em que a alga foi seca na estufa a 25°C durante 48h, e triturada. A alga moída foi armazenada a -20°C, até à sua utilização. O extrato de alga foi obtido de acordo com a metodologia descrita em Passos *et al.* (2020), em que as algas foram trituradas e foi adicionado a etanol absoluto na proporção de (1:10) (m:v), procedendo-se assim a uma extração etanólica. O líquido foi filtrado através de um filtro de papel Whatman n°4 foi recolhido e evaporado em evaporador rotativo (150 rpm, 40°C). Os extratos foram conservados a -20°C, até à sua utilização. Para a obtenção dos ficocolóides, seguiu-se com a metodologia descrita em Pereira *et al.* (2009) com modificações, em que a biomassa foi seca ao sol, e depois em estufa durante 24h a 25°C. As algas foram trituradas até ficarem em pó, de seguida foram reidratadas com água

destilada (1: 1,5) (m:v) e aquecidas em banho-maria a 80°C por 4h. A solução quente foi filtrada em duas etapas sequenciais: 4 camadas de gaze e filtro de fibra de vidro, utilizando uma bomba de vácuo. O filtrado resultante foi congelado por 2h, descongelado à temperatura ambiente, o excesso de água foi descartado e repetiu-se o ciclo por duas vezes. O ficocolóide precipitado foi imerso em igual volume de etanol a 96% por 24 h e a maior parte da fração aquosa foi removida. O precipitado foi seco na estufa a 60°C durante 12-18h.

Uma empresa especializada (SPAROS, Portugal) preparou as dietas utilizadas neste ensaio, a alga moída, o extrato de alga e os ficocolóides adicionando-os à ração standard de dourada. Para os extratos foram utilizadas, duas concentrações (0,15% e 0,35%), assim como duas concentrações de alga moída (2,5% e 5%) e uma concentração de ficocolóides (0,2%) (Tabela 1).

Tabela 1- Composição proximal das rações (média ± DP).

Composição proximal	Cinzas (%)	Energia (kJ/g) / (% DM)	Gordura (% DM)	Proteína (% DM)
5% Alga moída	8,16 ± 0,21	21,78 ± 0,06	13,55 ± 0,15	53,48 ± 0,16
2,5% Alga moída	7,85 ± 0,04	21,77 ± 0,00	13,61 ± 0,01	52,70 ± 0,04
0,35% Extrato de alga	7,58 ± 0,00	21,91 ± 0,00	13,63 ± 0,12	52,39 ± 0,06
0,15% Extrato de alga	7,48 ± 0,02	21,85 ± 0,00	13,93 ± 0,03	52,25 ± 0,10
0,2% Ficocolóide	7,56 ± 0,01	21,80 ± 0,02	13,73 ± 0,05	52,02 ± 0,05
Controlo	7,42 ± 0,04	21,91 ± 0,01	13,93 ± 0,03	52,21 ± 0,16

2.3- Desenho experimental

Os juvenis de dourada (*S. aurata*), com peso médio inicial de 6,50 ± 1,14 g (média ± DP), foram adquiridas numa aquacultura comercial (Atlantik Fish, Portugal) e transportadas para o edifício CETEMARES (Peniche, Portugal). No total foram pesados 756 peixes individualmente (42 peixes por aquário) e distribuídos aleatoriamente em 18 aquários de 60 L, (divididos em 6 sistemas de recirculação independentes) com uma densidade de 4,56 ± 0,11 kg.m⁻³, onde permaneceram uma semana para se ambientarem às novas condições. Uma dieta experimental foi atribuída a cada

sistema, com 3 aquários (réplicas) para cada tratamento (Figura 1). Todos os peixes foram alimentados à mão, até à aparente saciedade, duas vezes por dia (9h e 16h), durante 52 dias. A temperatura ($17,7 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$), pH ($7,9 \pm 0,2$), salinidade ($32 \pm 0,3$), oxigénio dissolvido ($7,24 \pm 0,26 \text{ mg.L}^{-1}$) foram monitorizados diariamente.

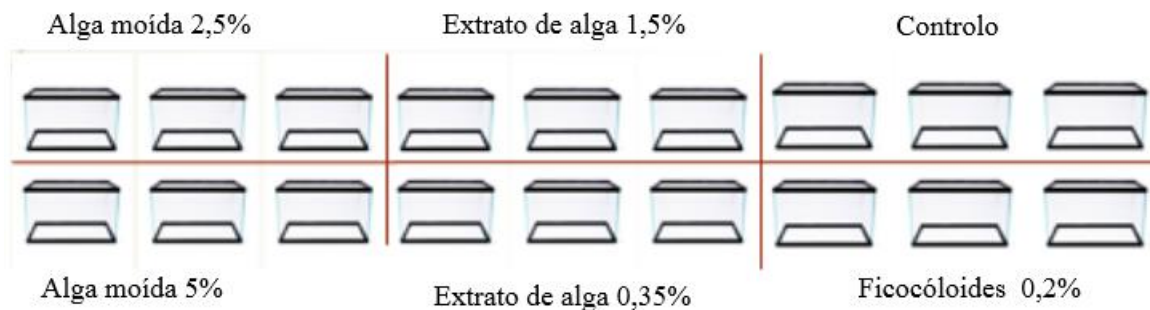


Figura 1- Esquema representativo dos tanques referentes a cada tratamento.

Após o ensaio da alimentação, prosseguiu-se com a amostragem, tendo os peixes ficado 24h em jejum e de seguida foram anestesiados, com uma dose de $0,5 \text{ mL.L}^{-1}$ de 2-fenoxietanol. Todos os peixes foram pesados individualmente, tendo sido retirado sangue a três peixes, de cada aquário (com seringas previamente heparinizadas) para a determinação do hematócrito, hemoglobina, realização do esfregaço, contagens de leucócitos e eritrócitos. O restante sangue foi transferido para microtubos contendo $20\mu\text{L}$ de heparina que foram centrifugados a $10000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C de forma a obter o plasma, para a realização dos parâmetros imunes. As amostras foram conservadas a -80°C até à realização das determinações analíticas. De seguida removeu-se o fígado de três peixes, para determinação dos parâmetros de *stress* oxidativo (foram conservados a -80°C), assim como uma pequena porção do intestino para análise histológica. Estas amostras, foram conservadas em formol tamponado durante 24 horas sendo depois transferidas para álcool a 70%, até serem processadas. Outros três peixes também foram sacrificados para amostragem de fígado e recolha de sangue para obtenção de plasma para avaliação dos parâmetros metabólicos, as amostras foram conservadas a -80°C , até à sua utilização.

2.3.1- Challenge com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

Para o ensaio de infecção, foram utilizados 14 peixes, de cada aquário. Destes, 7 peixes foram injetados com 100 µL de uma suspensão de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* a uma concentração de 10⁵ UFC.g⁻¹ de peixe e os outros 7 peixes, foram injetados com o mesmo volume de *phosphate-buffered saline* (PBS). As 3 réplicas de cada tratamento foram divididas em dois aquários de 60L (controlo e infetados) com 3 divisões cada, com sistema individual de recirculação. O ensaio durou 14 dias, os peixes foram alimentados à mão até à aparente saciedade, e a temperatura (21,1 ± 0,8°C), pH (8,1±0,3), salinidade (31,3±0,3), oxigénio dissolvido (6,48±0,31 mg.L⁻¹) foram monitorizados e registados diariamente assim como a mortalidade.

2.4- Cálculos de performance do crescimento

O desempenho do crescimento foi determinado com base no ganho de peso, índice de crescimento diário (DGI), consumo voluntário de ração (VFI) expresso em BW. dia⁻¹ e taxa de conversão alimentar (FCR). O peso inicial e final de cada peixe em cada aquário foi utilizado para os cálculos de desempenho do crescimento:

$$WG (\%) = (W_f - W_i) \times 100 / W_i$$

Onde WG, W_f (g) e W_i (g) são o ganho de peso, peso final e peso inicial respetivamente.

$$ABW (\text{Peso Corporal Médio}) = (W_f + W_i) \div 2$$

$$VFI (\text{Consumo Voluntário de ração}) = \left(\frac{\text{consumo de ração} / ABW}{t} \right) \times 100$$

Onde t significa tempo, em dias.

$$DGI (\text{Índice de crescimento diário}) = \frac{W_f^{\frac{1}{3}} - W_i^{\frac{1}{3}}}{t} \times 100$$

$$FCR (\text{Taxa de conversão alimentar}) = \frac{\text{consumo de ração}}{WG (g)}$$

2.5- Analítica

2.5.1- Hematologia

A hemoglobina foi quantificada utilizando o método colorimétrico de Drabkin (Spinreact, ref.:1001230). Num microtubo foram colocados 500 μ L de reagente de Drabkin diluído 1 vez com 2 μ L do sangue a analisar, posteriormente foram adicionados em triplicados 100 μ L desse preparado, numa placa de 96 poços para leitura da absorvância a um comprimento de onda de 540nm.

Para a determinação do hematócrito, com o tubo microhemático, com umas das extremidades imersas no sangue, a entrada do sangue nos mesmos, fez-se por capilaridade, até à marca do tubo, que de seguida é vedada com plasticina. Depois, foram centrifugados, a 10000 rpm por 10 minutos. O volume corpuscular médio (MCV), a hemoglobina corpuscular média (MCH) e a concentração média de hemoglobina corpuscular (MCHC) foram calculados de acordo com Machado *et al.* (2015).

Na avaliação da concentração total de leucócitos e eritrócitos no sangue foram realizadas diluições de 1:20 e 1:200, respetivamente. As diluições foram feitas em PBS com heparina a 30 unidades mL⁻¹, sendo as contagens feitas numa câmara de Neubauer.

No esfregaço de sangue, as lâminas foram secas ao ar e depois fixadas com uma solução de formol-etanol (90% de etanol absoluto a 10% de 37% de formaldeído) durante um minuto (Kaplou, 1965). A atividade da peroxidase avaliada como descrito por Afonso *et al.* (1998) para permitir a deteção de neutrófilos. As lâminas foram examinadas numa amplificação de 1000 \times e pelo menos 200 leucócitos foram contados e classificados como trombócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos. Para cada tipo de célula, foram calculadas a percentagem relativa e o valor absoluto ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$).

2.5.2- Parâmetros imunológicos

Atividade da Lisozima

A atividade da lisozima foi determinada seguindo o método turbidimétrico modificado por Costas *et al* (2011). A análise foi realizada utilizando uma solução de *Micrococcus lysodeikticus* (0,5 mg. mL⁻¹, tampão fosfato de sódio 0,05 M; pH 6,2). Numa microplaca, foram adicionados 15 μ L plasma e 250 μ L da suspensão bacteriana. A reação ocorreu a 25° C e a absorvância foi medida a um comprimento de onda de 450 nm após 0,5 e 9,5 min num leitor de microplacas (Synergy HT,

Biotek, EUA). A curva padrão foi realizada usando lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha (Sigma, EUA) diluída em série em tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 6,2). A lisozima presente na amostra foi calculada usando a curva padrão.

Atividade da Peroxidase

A atividade da peroxidase foi medida seguindo o procedimento descrito por Quade & Roth (1997). Resumidamente, 15 μL de plasma foi diluído em 135 μL de PBS e de seguida foi adicionado 50 μL de 20 mM de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina dicloridrato hidratado (TMB; Sigma, EUA) e 50 μL de 5 mM de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). A reação foi parada após 2 min, adicionando ácido sulfúrico 2M (H_2SO_4) e a absorvância medida a 450 nm. A atividade da peroxidase (U mL^{-1} de plasma) foi determinada definindo que 1 unidade de peroxidase produz uma alteração na absorvância de 1 DO (densidade ótica).

2.5.3- Parâmetros de *stress* oxidativo

Preparação das amostras

As amostras de fígado foram homogeneizadas com 10 volumes de água ultrapura, tendo sido sempre mantidas em gelo. De seguida para a avaliação da peroxidação lipídica (LPO) foram separadas alíquotas de 200 μL de amostra, contendo 4 μL de hidroxitolueno butilado (BHT) em 4% em metanol. Para os restantes testes, um volume de homogeneizado de tecido foi misturado com um volume de tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH 7,4) e centrifugado a 10000 x g a 4° C, durante 20 minutos. Depois de centrifugados, os sobrenadantes foram divididos em alíquotas para as diferentes análises e foram conservadas a -80°C até à realização dos respetivos testes.

Quantificação de proteína

O teor proteico foi quantificado com o kit de ensaio de proteína BCS (Thermo Scientific, referência 23225), de acordo com as instruções do fabricante. Os padrões foram preparados com albumina do soro bovino (BSA) e água destilada, a quatro concentrações diferentes (0; 0,5; 1; 2 mg. mL^{-1}), pipetando 10 μL de cada padrão para uma microplaca, em quintuplicado. De seguida as amostras foram diluídas (1:10) e pipetaram-se 10 μL para a microplaca em duplicado, e foram adicionados

aos padrões e às amostras 200 µL de solução de reação. Por fim a microplaca foi levada a incubar na estufa a 37°C por 30 minutos e ao fim deste tempo leu-se a absorvância no leitor de microplacas EPOCH 2 (BioTek; Winooski, USA) a 550 e 630nm.

Peroxidação lipídica (LPO)

A LPO foi medida seguindo o princípio de que, sob *stress* oxidativo no ambiente celular, hidroperóxidos lipídicos instáveis derivados de ácidos gordos polinsaturados se decompõem. Isso resulta na formação de malondialdeído (MDA), que pode ser quantificado através de sua reação controlada com ácido tiobarbitúrico (TBA) sob altas temperaturas e condições ácidas (Bird & Draper, 1984). Resumidamente, 100 µL de ácido tricloroacético frio a 100% foram adicionados a cada amostra e foram agitados no vortéx, em seguida 1 ml de ácido 2-tiobarbitúrico 0,73% e solução de Tris-HCl (60 mM, pH 7,4; e DTPA 0,1 mM) foram adicionados a cada amostra e ao branco e foram agitados no vortéx novamente. Depois disso, os microtubos foram incubados 1 hora a 100°C na estufa e centrifugados por 5 minutos a 15000 × g. Por fim, o sobrenadante foi transferido para uma microplaca (200 µL), em triplicado. A absorvância foi medida a 535 nm e a LPO foi expressa como nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) formadas por g de fígado.

Catalase

A atividade da catalase foi medida após o consumo do substrato (H₂O₂) observado por uma diminuição na absorvância a 240 nm, conforme descrito por Clairborne (1985), e adaptado para microplaca. Numa microplaca adequada para Ultra Violeta (UV), foram adicionados 10 µL de amostra diluída até 0,7 mg mL⁻¹ de proteína, juntamente com 140 µL de K-fosfato 0,05 M, pH 7 e 150 µL de 30% de H₂O₂. A absorvância foi lida a um comprimento de onda de 240 nm por 2 minutos (1 leitura a cada 15 segundos) no leitor de microplacas EPOCH 2 (BioTek; Winooski, USA). A atividade da catalase foi expressa em U/ mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de H₂O₂ a 240 nm de 40 M cm⁻¹.

Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com Almeida *et al* (2010), utilizando o método do citocromo C, com xantina/xantina oxidase como fonte de radicais superóxidos. A solução de reação continha 50 mM de tampão K-fosfato (pH 7,8; e 1 mM de Na-EDTA), 0,7 mM de xantina, 0,03 mM de citocromo. Numa microplaca foram adicionados 10 µL de amostra diluídas até 0,3 mg.mL⁻¹ de proteína, juntamente com 180 µL da solução de reação e 10 µL de xantina oxidase. A absorvância foi lida no leitor de microplacas EPOCH 2 (BioTek; Winooski, USA) a um comprimento de onda de 550nm com repetidas leituras de 20 em 20 segundos durante 3 minutos. A atividade da SOD foi expressa em U mg⁻¹ de proteína, em que 1 U representa a quantidade de enzima capaz de inibir 50% da redução do citocromo C.

Glutathione-S - Transferase (GST)

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada seguindo o método de Habig *et al.*, (1974) adaptado a microplaca por Frasco & Guilhermino (2002). Para o protocolo da GST foram preparadas, uma solução de CNDB (1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno), uma solução tampão K-fosfato 0,2 M pH 6,5 e uma solução de GSH (L- Glutathione reduzida). Numa microplaca foram adicionados 50 µL de amostra diluída até 0,7 mgmL⁻¹ de proteína. De seguida foi preparada a solução de reação, misturando o tampão K-fosfato 0,2M (pH 6,5), a solução de CNDB e a solução de GSH. Foram adicionados 250 µL desta solução de reação na microplaca. A absorvância foi lida no leitor de microplacas EPOCH 2 (BioTek; Winooski, USA), a um comprimento de onda de 340nm e procederam-se a leituras consecutivas de 20 em 20 segundos durante 5 minutos.

Glutathione Total (TG)

A glutathione total (TG) foi determinada como a taxa de formação de TNB²⁻ com um coeficiente de extinção do cromóforo DTNB (5-5'- dithiobis- 2-ácido nitrobenzóico) formado de $14,1 \times 10^3$ M. cm⁻¹ (Baker *et al.*, 1990; Rodrigues *et al.*, 2017). Resumidamente, foi preparada uma solução de GSH, uma solução de NADPH, uma solução de DNTB e por fim uma solução de glutathione reductase (GR). Numa microplaca foram adicionados 50 µL de amostra diluída até 0,7 mg mL⁻¹ de proteína. De seguida foi preparada a solução de reação, misturando o tampão K-fosfato 0,2M (pH 6,5), a solução de NADPH, DNTB e a solução de GR. Foram adicionados 250 µL desta solução

de reação para a microplaca. A absorvância foi lida no leitor de microplacas EPOCH 2 (BioTek; Winooski, USA), a um comprimento de onda de 340nm durante 3 minutos.

2.5.4- Parâmetros metabólicos

Para medir os metabólitos plasmáticos, as amostras foram descongeladas e foram utilizadas alíquotas de plasma para glicose (referência. 201001190, Spinreact), colesterol (referência. 201001090, Spinreact), triglicérides (referência. 201001311, Spinreact) e lípidos totais (referência. 201001270, Spinreact). Cada parâmetro foi medido aplicando kits comerciais da Spinreact (Girona, Espanha), de acordo com as instruções do fabricante.

2.5.5- Análise histológica

As amostras do intestino dos peixes foram colocadas num processador de tecidos (Leica-TP 1020) onde sofreram um processo de desidratação com uma série de passagens em álcool, em concentrações crescentes, para remoção da água dos tecidos. De seguida os tecidos passaram por xilol para remoção do álcool presente de forma a facilitar a inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram realizados no micrótomo (Sakura® Accu-Cut® SRM™ 200), com uma espessura entre de 5-7 µm. As lâminas com os cortes foram colocadas na estufa (Binder) a 35°C durante pelo menos 48 horas. Após este tempo as lâminas estavam preparadas para a coloração, de acordo com o método Hematoxilina-Eosina (H&E). A observação das lâminas foi realizada ao microscópico com câmara fotográfica (Leica DM 2000 LED + Leica MC 170 HD) para determinar se houve alterações nos intestinos dos peixes sujeitos às diferentes dietas. A avaliação histológica baseou-se em critérios de alterações inflamatórias como o comprimento das vilosidades intestinais, alteração da posição dos núcleos dos enterócitos, vacuolização supranuclear absorptiva, hiperplasia do tecido conjuntivo na lâmina própria e submucosa e infiltração de células inflamatórias, conforme descrito por Guerreiro *et al.* (2015). As alterações inflamatórias como hiperplasia do tecido conjuntivo na lâmina própria e na submucosa, infiltração de células inflamatórias e vacuolização supranuclear absorptiva foram classificadas em ausente (-), leve (+), moderada (++) e grave (+++) (Oda *et al.*, 2016). O comprimento das vilosidades intestinais foi classificado em curto ou comprido, a posição do núcleo em basal ou apical e a largura da lâmina própria e da submucosa em fina ou espessa.

2.6- Análise Estatística

As análises estatísticas seguiram os métodos descritos por Zar (1999). Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade das variações usando o teste de Kolmogorov – Smirnov e Levene, respectivamente. Em seguida, os dados foram analisados com análise de variância unidirecional (ANOVA) para testar as diferenças entre os tratamentos dietéticos. Quando este teste mostrou significância, as médias individuais foram comparadas pelo teste de Tukey e no caso da mortalidade foi utilizado o teste de LSD. Diferenças significativas foram testadas a $p < 0,05$. Quando as suposições da ANOVA não foram cumpridas, os dados foram submetidos aos testes não paramétricos (teste de Kruskal – Wallis). Todos os testes estatísticos foram realizados no software SPSS (v26, IBM, EUA).

3- Resultados

3.1- Performance de crescimento

Os resultados da performance do crescimento das douradas estão apresentados na Tabela 2. A dieta experimental com 5% de alga moída apresentou um maior ganho de peso (WG) quando comparada com as dietas controlo e ficocolóides. O mesmo se observou para o índice de crescimento diário (DGI). Além disso a dieta a 5% de alga moída também apresentou uma melhor taxa de conversão alimentar (FCR), apresentando diferenças estatisticamente significativas em comparação com a dieta de 0,15% de extrato de alga, os ficocolóides e o controlo, não ocorrendo diferenças estatisticamente significativas com as dietas de 2,5% de alga moída e 0,35% de extrato de alga ($p > 0,05$).

Tabela 2- Parâmetros de crescimento das douradas alimentadas com as diferentes dietas durante 52 dias, (média \pm DP). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).

Dietas	WG (%)	DGI	VFI	FCR
5% Alga moída	339,25 \pm 9,25 ^A	2,31 \pm 0,01 ^A	2,22 \pm 0,02	0,92 \pm 0,01 ^A
2,5% Alga moída	331,30 \pm 18,32 ^{AB}	2,26 \pm 0,06 ^{AB}	2,24 \pm 0,07	0,93 \pm 0,03 ^{AC}
0,35% Extrato de alga	320,98 \pm 7,93 ^{AB}	2,22 \pm 0,01 ^{ABC}	2,20 \pm 0,07	0,93 \pm 0,03 ^A
0,15% Extrato de alga	309,78 \pm 7,96 ^{ABC}	2,19 \pm 0,03 ^{BC}	2,29 \pm 0,05	0,98 \pm 0,01 ^{ABC}
0,2% Ficocolóide	293,55 \pm 26,20 ^{BC}	2,10 \pm 0,14 ^{BC}	2,32 \pm 0,01	1,02 \pm 0,04 ^B
Controlo	275,17 \pm 10,74 ^C	2,05 \pm 0,06 ^C	2,23 \pm 0,02	1,00 \pm 0,01 ^{BC}

3.2- Hematologia

O perfil hematológico das douradas alimentadas com dietas experimentais está apresentado na Tabela 3. O valor observado para o hematócrito foi maior nas dietas com alga moída, especialmente na concentração de 2,5% quando comparada com as dietas de extrato de 0,35%, ficocolóide e controlo. O mesmo padrão foi observado no MCV. No MCHC, o padrão foi revertido, sendo maior na dieta de 0,35% de extrato, especialmente quando comparadas as dietas

com alga moída. Relativamente à contagem diferencial de células, os trombócitos apresentaram um maior número na dieta de 5% de alga moída, enquanto nos linfócitos a contagem foi baixa na mesma dieta. Quanto aos restantes parâmetros não se observaram diferenças significativas ($p > 0,05$).

Tabela 3- Resultados hematológicos de douradas alimentadas com dietas diferentes. Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).

Parâmetros	5% Alga moída	2,5% Alga moída	0,35% Extrato Alga	0,15% Extrato Alga	0,2% Ficocólide	Controlo
WBC ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	5,51 \pm 0,69	4,92 \pm 1,48	5,97 \pm 1,02	5,01 \pm 1,83	6,50 \pm 1,82	5,07 \pm 1,58
RBC ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	1,91 \pm 0,36	2,09 \pm 0,36	2,02 \pm 0,44	2,06 \pm 0,31	2,13 \pm 0,34	2,09 \pm 0,20
Ht (%)	39,44 \pm 5,62 ^{AB}	43,56 \pm 5,32 ^B	27,78 \pm 6,63 ^C	32,25 \pm 3,85 ^{ABC}	32,11 \pm 9,85 ^{AC}	33,89 \pm 4,11 ^{AC}
Hb (g dL ⁻¹)	0,84 \pm 0,22	0,93 \pm 0,20	0,93 \pm 0,19	1,00 \pm 0,17	0,89 \pm 0,19	0,87 \pm 0,18
MCV (μm^3)	210,10 \pm 35,54 ^{AC}	210,91 \pm 25,75 ^A	150,62 \pm 75,83 ^B	173,23 \pm 26,77 ^{BC}	156,51 \pm 56,85 ^B	163,49 \pm 21,77 ^B
MCH (pg cél ⁻¹)	4,51 \pm 1,34	4,48 \pm 0,95	4,95 \pm 2,05	4,93 \pm 0,80	4,30 \pm 1,17	4,61 \pm 1,09
MCHC (g 100 mL ⁻¹)	2,16 \pm 0,59 ^A	2,13 \pm 0,42 ^A	3,45 \pm 0,80 ^B	2,81 \pm 0,51 ^{AB}	3,01 \pm 0,96 ^{AB}	2,90 \pm 0,95 ^{AB}
Trombócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	154,89 \pm 11,03 ^A	123,33 \pm 10,33 ^{BC}	121,33 \pm 17,60 ^{BC}	128,00 \pm 15,48 ^B	120,11 \pm 11,46 ^{BC}	110,00 \pm 8,17 ^C
Linfócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	22,56 \pm 5,92 ^A	53,89 \pm 7,98 ^B	45,33 \pm 10,46 ^B	46,33 \pm 9,30 ^B	55,11 \pm 10,07 ^B	55,44 \pm 13,37 ^B
Monócitos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	5,22 \pm 2,28	10,11 \pm 3,55	9,44 \pm 5,81	6,56 \pm 2,51	6,78 \pm 4,32	8,22 \pm 3,15
Neutrófilos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$)	17,33 \pm 10,67	12,67 \pm 12,70	23,89 \pm 14,26	19,11 \pm 13,21	18,00 \pm 11,57	26,33 \pm 9,76

3.3- Parâmetros imunológicos

Os parâmetros imunológicos registados nas douradas alimentadas com as diferentes dietas estão apresentados na Figura 2. Os resultados não mostraram diferenças entre as diferentes dietas quanto à atividade da peroxidase. No entanto, a concentração de lisozima apresentou algumas diferenças entre os tratamentos, nomeadamente com peixes alimentados com dieta de extrato de alga 0,15% apresentaram valores significativamente maiores do que as dietas suplementadas com alga moída ($p > 0,05$).

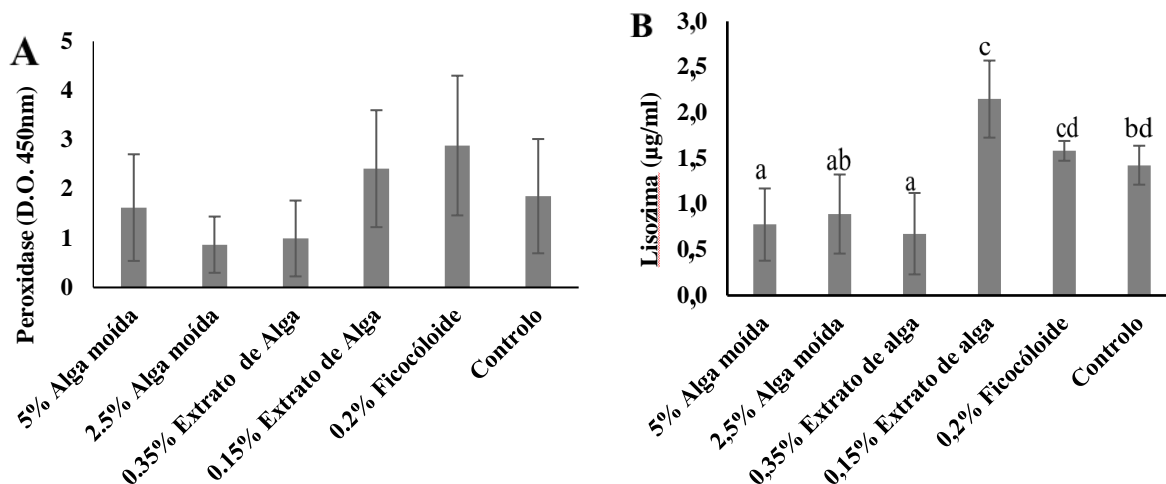


Figura 2 - Parâmetros imunológicos em douradas alimentadas com dietas diferentes por 52 dias (média \pm DP), $n = 7$ para atividade da peroxidase (A), $n = 6$ para a lisozima (B). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).

3.4- Parâmetros do *stress* oxidativo

Os parâmetros dos resultados de *stress* oxidativo das douradas alimentadas com as diferentes dietas estão apresentados na Figura 3. A atividade da catalase foi significativamente menor nas douradas alimentadas com a dieta de 0,15% de extrato quando comparados com as dietas de 2,5% de alga moída e controlo. A peroxidação lipídica foi elevada em todas as dietas, principalmente na dos ficocolóides a 0,2%, na dieta de 2,5% de alga moída e na dieta de 0,15% de extrato de alga. A atividade da SOD foi significativamente menor nas dietas de 0,15% de extrato de alga e 0,2% de ficocóloides quando comparadas com as dietas 5 % de alga moída e controlo. A glutaciona total foi significativamente menor nas douradas alimentadas com as dietas de alga moída quando comparadas com as dietas de 0,15% de extrato de alga, 0,2% de ficocóloides e o controlo. Quanto à glutaciona S-transferase não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

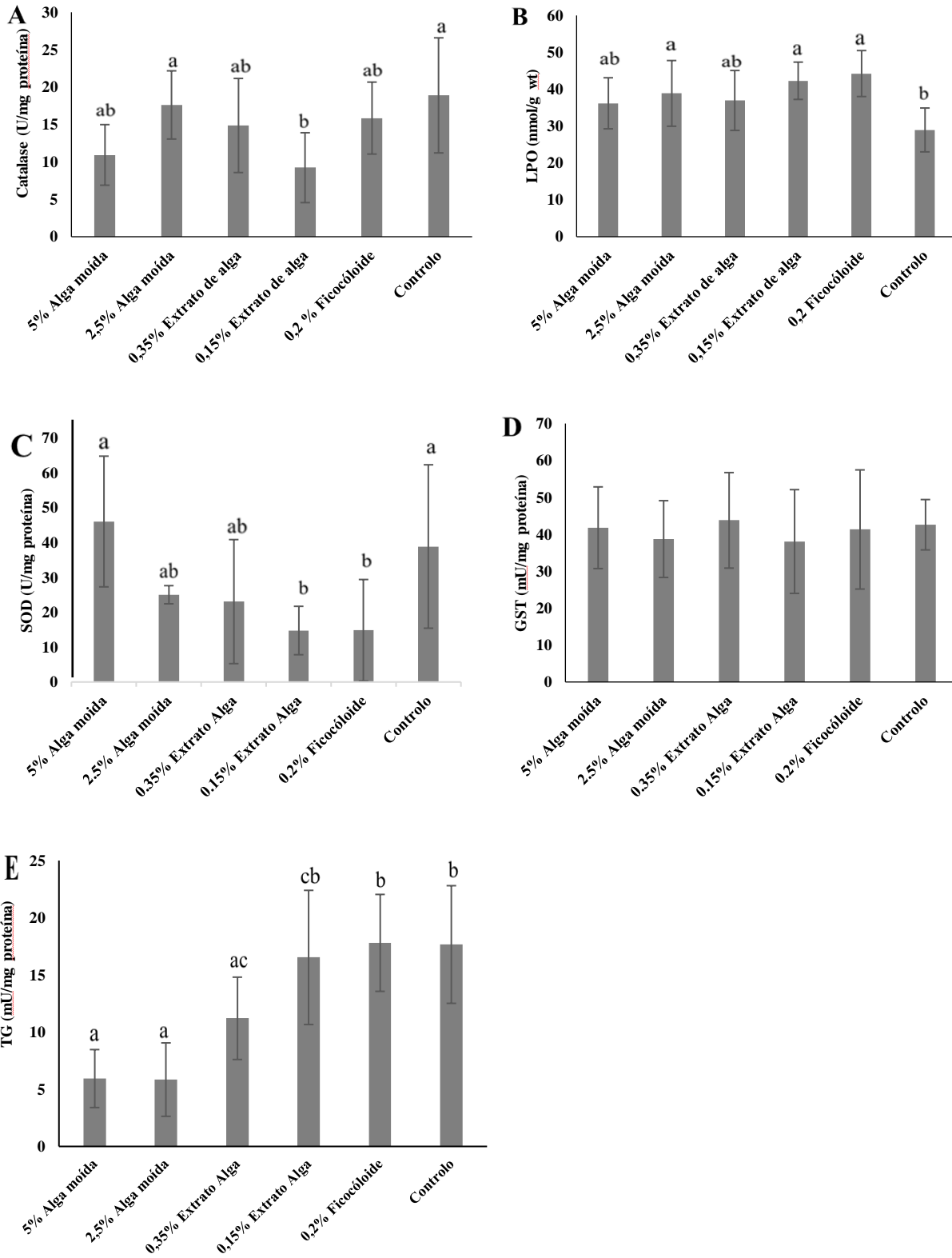


Figura 3- Parâmetros de *stress* oxidativo em douradas alimentadas com dietas diferentes por 52 dias (média ± DP), n = 8 para atividades de Catalase, GST e TG (A, D e E, respectivamente), n = 9

para LPO (B) e $n = 7$ para a atividade da SOD (C). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).

3.5- Parâmetros metabólicos

Os parâmetros metabólicos das douradas alimentadas com as diferentes dietas estão apresentados na Tabela 4. A quantidade de glicose foi significativamente maior nas dietas de 0,35% de extrato e na dieta controlo quando comparadas com a dieta dos Ficocolóides. Nos triglicéridos as duas dietas com alga moída apresentaram maiores quantidades, sendo que a dieta de 2,5% de alga moída foi significativamente maior quando comparada com as duas dietas de extrato de alga, com os ficocolóides e com o controlo. No colesterol e nos lípidos totais não se observaram diferenças significativas entre as diferentes dietas ($p > 0,05$).

Tabela 4- Parâmetros metabólicos das douradas alimentadas com as diferentes dietas. Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$), e os resultados sem letras não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Dietas	Glicose (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Lípidos totais (mg/dL)
5% Alga moída	68,44 ± 12,16 ^{AB}	372,81 ± 189,04 ^{AB}	284,29 ± 97,63	683,1 ± 440,2
2,5% Alga moída	67,75 ± 12,07 ^{AB}	515,48 ± 188,04 ^A	339,40 ± 102,73	994,6 ± 214,7
0,35% Extrato de alga	86,00 ± 22,56 ^A	364,41 ± 152,40 ^{AB}	329,99 ± 108,42	742,0 ± 75,3
0,15% Extrato de alga	75,27 ± 28,49 ^{AB}	295,18 ± 69,51 ^B	303,03 ± 70,84	1127,6 ± 283,3
0,2% Ficocolóides	55,89 ± 7,84 ^B	233,52 ± 77,47 ^B	296,75 ± 51,77	904,3 ± 261,0
Controlo	74,78 ± 17,11 ^{AB}	246,93 ± 113,91 ^B	272,09 ± 55,49	951,9 ± 316,1

3.6- Histologia

A análise histológica dos intestinos de douradas alimentadas com as dietas experimentais não revelou alterações inflamatórias. O comprimento das vilosidades intestinais foi classificado como comprido, a espessura da lâmina própria e da submucosa foi fina e verificou-se uma leve infiltração

de células inflamatórias em todas as dietas. Contudo observaram-se algumas diferenças em comparação com a dieta controlo estando apresentadas na Tabela 5. A vacuolização supranuclear absorptiva foi moderada nas dietas 5% de alga moída e 0,35% de extrato de algas. A posição do núcleo dos enterócitos foi apical apenas na dieta de 0,2% de ficocolóide, nas restantes dietas foi considerada basal. A hiperplasia do tecido conjuntivo da lâmina própria está ausente nas dietas de 5% de alga moída, 2,5% de alga moída e 0,35% do extrato de algas.

Tabela 5- Alterações estruturais e morfológicas no intestino de douradas alimentadas com diferentes dietas. As alterações foram classificadas em: comprimento das vilosidades intestinais—comprido ou curto; posição do núcleo - basal ou apical; largura da lâmina própria e submucosa - fina ou espessa; ausente (-); leve (+); moderado (++); grave (+++); e a percentagem de indivíduos em que se observaram essas alterações.

Alterações inflamatórias	5% Alga moída	2,5% Alga moída	0,35% Extrato de alga	0,15% Extrato de alga	0,2% Ficocolóides	Controlo
Vilosidades intestinais Comprimento	Comprido (89%)	Comprido (89%)	Comprido (83%)	Comprido (83%)	Comprido (87%)	Comprido (89%)
Enterócitos						
Posição dos núcleos	Basal (67%)	Basal (90%)	Basal (80%)	Basal (56%)	Apical (75%)	Basal (88,8%)
Vacuolização supranuclear absorptiva	(++) (50%)	(+) (67%)	(++) (88,8%)	(+) (88,8%)	(+) (78%)	(+) (75%)
Lamina própria						
Largura	Fina (89%)	Fina (100%)	Fina (78%)	Fina (100%)	Fina (100%)	Fina (100%)
Hiperplasia do tecido conjuntivo	(-) (89%)	(-) (89%)	(-) (67%)	(+) (75%)	(+) (89%)	(+) (67%)
Submucosa						
Largura	Fina (100%)	Fina (89%)	Fina (100%)	Fina (100%)	Fina (100%)	Fina (89%)
Hiperplasia do tecido conjuntivo	(-) (75%)	(-) (89%)	(-) (78%)	(-) (75%)	(-) (75%)	(-) (75%)
Infiltração de células inflamatórias na lamina própria e na submucosa	(+) (50%)	(+) (75%)	(+) (67%)	(+) (89%)	(+) (67%)	(+) (78%)

3.7- Challenge com *Phdp*

Observou-se uma mortalidade estatisticamente menor nas douradas alimentadas com as dietas suplementadas com alga moída, principalmente com a dieta de 5%, quando comparadas às dietas com extratos, ficocolóides e controlo. As douradas alimentadas com suplementação de 0,2% de ficocolóides apresentaram maior mortalidade comparadas com as restantes dietas (figura 4). E quanto aos peixes injetados com PBS, ou seja os não infetados não se observaram mortalidades.

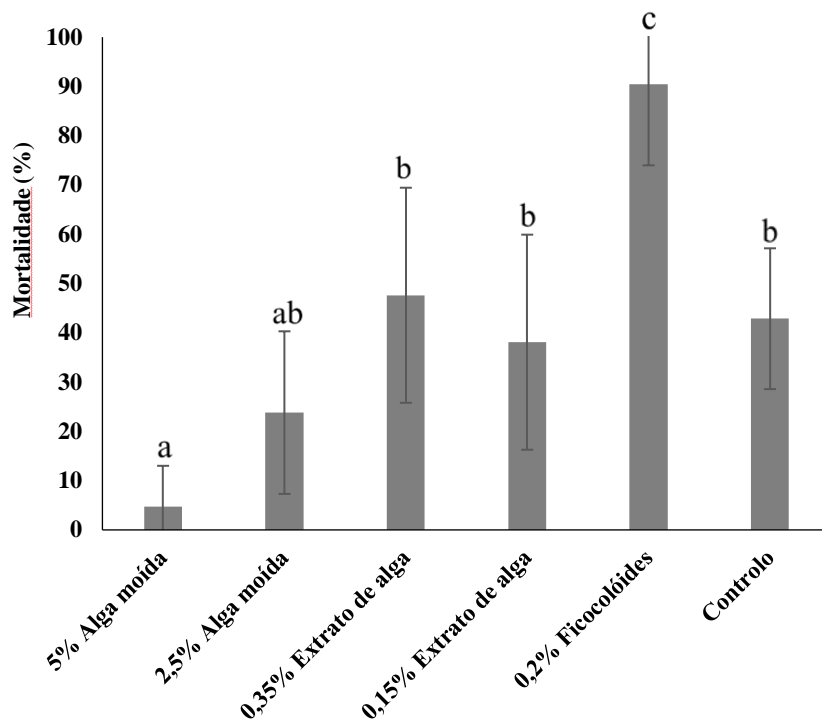


Figura 4- Mortalidade observada no *Challenge* com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* em douradas durante 14 dias, alimentadas com diferentes dietas (média \pm DP, n = 3). Diferenças estatisticamente significantes identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).

4- Discussão e conclusão

O presente estudo mostrou que a suplementação de dietas com *G. gracilis*, em 5% e 2,5% de alga moída e extrato etanólico a 0,35%, tiveram um efeito benéfico no crescimento das douradas, quando comparadas com as dietas com 0,15% de extrato de alga e de 0,2% de ficocolóides, suplementos que não resultaram em alterações nos parâmetros do crescimento. Num estudo feito por Peixoto *et al.* (2016b) com juvenis de robalo (*Dicentrarchus labrax*), não ocorreram diferenças significativas no crescimento, quando estes foram alimentados com uma ração suplementada com 2,5% e 7,5% de *Gracilaria* spp. Os autores afirmaram que a quantidade de proteína necessária estaria num nível de suplementação de 10% de alga, o que foi também concluído por Valente *et al.* (2006) num estudo com *G. bursa-pastoris* a 10%, em robalos. Similarmente, Queiroz *et al.* (2014) num estudo com dourada (*S. aurata*) não observaram alterações no desempenho do crescimento quando os peixes foram alimentados com dietas suplementadas com algas marinhas a 2,5% e 7,5%. O desempenho do crescimento é muito afetado por fatores, como a espécie, o estágio de vida e as condições experimentais, tal como afirmaram Hoseinifar *et al.* (2018) num estudo com peixe-zebra (*Danio rerio*), alimentados com suplementação de *G. gracilis* em pó a 0,25%, 0,5% e 1%, onde não se registaram diferenças significativas no crescimento. Em alguns estudos com algas do mesmo género e diferentes espécies de peixes pode-se observar resultados muito diferentes no efeito ao crescimento, nomeadamente num estudo com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com *G. arcuata* a 20%, 40% e 60% substituindo a farinha de peixe, obtiveram efeitos negativos no crescimento, verificando-se que nos níveis mais altos de incorporação foi onde se obtiveram resultados piores, sugerindo que a *G. arcuata* não pode ser usada como alimento a níveis iguais ou superiores a 60% (Younis *et al.*, 2018). Do mesmo modo, num estudo com a alga *G. lemaneiformis* substituindo a farinha de peixe, a alga foi incorporada a um nível de 15% na dieta de juvenis de *Acanthopagrus schlegelii*, não se registaram variações no ganho de peso e na FCR, embora quando se testaram valores maiores (20%), o desempenho de crescimento tenha sido comprometido (Xuan *et al.*, 2013). Silva *et al.* (2015) e Valente *et al.* (2015) trabalhando com truta arco-íris (*O. mykiss*) e tilápia do Nilo (*O. niloticus*) respetivamente, estabeleceram uma inclusão de 5% de *Gracilaria* spp. como o nível de suplementação dietética recomendada, o que está em concordância com os resultados do presente estudo, levam a acreditar que a inclusão de 5% de *G. gracilis* moída pode ser a proporção mais adequada para alcançar o

melhor desempenho de crescimento também em douradas, no entanto, estudos adicionais com uma ampla gama de suplementações podem revelar-se necessário.

A avaliação hematológica representa uma importante área de estudo sobre o estado de saúde dos peixes, podendo auxiliar no diagnóstico e no prognóstico de diversas patologias (Jain, 1993; Sotoudeh & Jafari, 2017). Neste estudo, os valores de hematócrito foram maiores nos peixes alimentados com suplementação de 2,5% de alga moída. O MCV também foi maior em peixes alimentados com as dietas de alga moída, isto porque esses peixes também apresentaram um maior crescimento. Segundo Fazio *et al.* (2015) o aumento da atividade metabólica implica um aumento do volume de eritrócitos, acompanhado por um hematócrito superior, existindo assim uma relação entre o aumento da dimensão dos peixes e os valores elevados dos eritrócitos, hematócrito e hemoglobina (Jawad *et al.*, 2004), porém no presente estudo os eritrócitos foram maiores em volume celular mas em menor quantidade. Os trombócitos tiveram uma contagem mais elevada em peixes alimentados com 5% de alga moída, o que é um resultado positivo, sendo que possuem grande capacidade fagocitária o que é essencial para as funções de defesa dos peixes ósseos (Stosik *et al.*, 2019). Estes resultados demonstram que a performance hematológica dos peixes alimentados com as dietas de algas moídas, sofreu alterações que parecem estar relacionados com o crescimento dos peixes.

A lisozima, é uma componente muito importante na defesa dos peixes, uma vez que age contra patógenos, destruindo diretamente as suas paredes celulares ou através da produção de substâncias químicas nocivas, como os radicais oxidativos (Nayak 2010). No presente estudo a concentração de lisozima foi maior nos peixes alimentados com 0,15% de extrato de alga, enquanto que num estudo feito por Araújo *et al.* (2016) com truta arco-íris, a concentração de lisozima foi maior na dieta suplementada com 5% de *G. vermiculophylla*, isto porque a resposta imune dos peixes à suplementação alimentar de algas marinhas foi reconhecida como dependente da dose e da espécie. Estudos anteriores já demonstraram que compostos de algas, principalmente polissacarídeos, modulam a resposta imunológica, desempenhando um papel na resistência a doenças em várias espécies (Castro *et al.*, 2004), sendo que estes compostos são variáveis por espécie, época do ano e método de cultura, e portanto pode ser que o método de cultivo da *G. gracilis* não tenha sido o ideal para um maior enriquecimento destes tais compostos estimulantes para os sistemas de defesa de peixes.

As algas marinhas são ricas fontes de compostos bioativos capazes de modular o *stress* oxidativo (Lee *et al.*, 2013), que ocorre quando a produção de ROS não é balanceada por um sistema de defesa antioxidante endógeno ou por antioxidantes alimentares exógenos que mantêm esses oxidantes compostos em níveis aceitáveis (Biller & Takahashi, 2018). A CAT é uma enzima antioxidante que atua na defesa contra o *stress* oxidativo, e no presente estudo demonstrou maiores atividades nas dietas controlo e 2,5 % de alga moída, tendo sido inibida na dieta de 0,15% de extrato de alga, o que vai de acordo com o resultado de um estudo feito por Magnoni *et al* (2017) provando a incapacidade do extrato de algas em proteger contra os ROS, já que a atividade da CAT foi menor, em douradas alimentadas com dietas suplementadas com *Gracilaria* tratada termicamente, num cenário hipóxico. A SOD que também é uma enzima antioxidante demonstrou um comportamento similar a CAT, com uma maior inibição no tratamento de 0,15% de extrato de alga e uma maior atividade no controlo e no tratamento de 5% de alga moída. Sotoudeh & Mardani (2017), afirmaram que a menor atividade enzimática pode ser uma indicação de menor necessidade de remover peróxido de hidrogénio e peróxido lipídico do tecido, quando eles obtiveram resultados parecidos com o presente estudo, ao testar a suplementação com *G. pygmaea* na alimentação da truta arco-íris e a SOD também foi menor em todas as dietas suplementadas em comparação com a dieta controlo. A peroxidação lipídica é o processo metabólico complexo e negativo, pois quando induzida por radicais livres é a principal causa de dano celular. Esse processo envolve a formação e propagação de peróxidos lipídicos e a eventual destruição das membranas lipídicas, produzindo produtos secundários como o malondialdeído (MDA) em microssomas (Zhang *et al.*, 2003). No presente estudo pode-se dizer que dietas suplementadas com *G. gracilis* não protegeram as células contra os efeitos dos ROS, tendo em conta que a peroxidação lipídica foi menor nos peixes alimentados com o tratamento controlo. Guerreiro *et al.* (2019) obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo, com *Ulva lactuca* e *Chondrus crispus* como suplementação de ração para robalos e Peixoto *et al.* (2016c) sugerem que a suplementação de algas marinhas aumenta a degradação da camada lipídica celular, aumentando o *stress* oxidativo. Noutro estudo elaborado por Peixoto *et al.*, (2018) com robalos alimentados com suplementação de *Gracilaria* sp, não houve influência da alga na peroxidação lipídica. Segundo Wang (2009), esses resultados são o contrário do esperado, uma vez que os compostos polifenólicos derivados da extração de metanólica de algas vermelhas foram descritos como fatores de diminuição da peroxidação lipídica. No entanto, num estudo anterior de Peixoto *et al.* (2016a), no qual a LPO em *Argyrosomus*

regius alimentados com *Gracilaria* sp, foi menor, demonstrando as propriedades antioxidantes associadas às macroalgas vermelhas. A glutatona total (GT) representa o estado do peptídeo glutatona, somando as formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), seu nível está relacionado à depleção de antioxidantes, considerando a recuperação incompleta do GSSG (Eroglu *et al.*, 2014; Owen & Butterfield, 2010). No presente estudo pode-se observar que as dietas suplementadas com alga moída a 5% e 2,5% apresentaram uma menor GT, em comparação com a dieta controle, sugerindo que nestas percentagens de suplementação, *Gracilaria* não possui elevada atividade antioxidante da GT. Em estudos como o de Cappello *et al.* (2016), onde foram feitos testes analíticos como a quantificação da glutatona reduzida (GSH), permitindo ter uma maior certeza sobre o efeito antioxidante da GT. Estudos realizados por Peixoto *et al.* (2016b) e Peixoto *et al.* (2018), com robalos alimentados com suplementação de *Gracilaria* sp em concentrações de 2,5% e 7,5%, e robalos alimentados com extratos de *Gracilaria* sp a 0,5% e 4,5%, respectivamente a GT não apresentou diferenças entre as dietas. No entanto, as frações de solvente obtidas da extração metanólica de diferentes algas vermelhas, incluindo *Gracilaria edulis*, foram caracterizadas como possuindo propriedades antioxidantes segundo Ganesan *et al.*, (2008), que também relataram que as atividades antioxidantes de diferentes algas marinhas apresentam dependência da dose, aumentando em concentrações mais altas de extrato. A baixa concentração e / ou disponibilidade dos compostos com propriedades antioxidantes pode ser o motivo da baixa atividade da GT no presente estudo, nas dietas de alga moída.

Nos metabolitos plasmáticos, em relação à glicose apenas houve diferenças significativas entre as dietas de 0,35% de extrato de alga e 0,2% de ficocóloides, não houve diferenças em comparação com a dieta controle, sendo que as dietas de 5% e 2,5% de alga moída apresentaram menores valores de glicose o que pode estar relacionando com o facto desses peixes terem apresentado um maior crescimento o que implica uma maior gasto energético o que pode ter levado os peixes a utilizarem as reservas de glicose. Nos triglicéridos apenas houve diferenças significativas entre a dieta de 2,5% de alga moída em comparação com a dieta 0,15% de extrato de alga e a dieta de 0,2% de ficocóloides. Num estudo de Guerreiro *et al.* (2019), com douradas alimentadas com suplementação de *Ulva lactula* e *Chondrus crispus*, a glicose plasmática foi menor em peixes alimentados com a suplementação de algas, possivelmente devido ao menor nível de amido em dietas contendo algas marinhas, enquanto Batista *et al.* (2020) num estudo com juvenis de robalo

alimentados com 8% de *Gracilaria gracilis*, registaram um aumento nos níveis de glicose comparativamente à dieta controlo. No entanto, Vizcaíno *et al.* (2016) encontraram uma relação inversa da concentração de glicose ao aumentar os níveis de macroalgas (*G. cornea* e *Ulva rigida*) nas dietas de douradas. Du *et al.* (2005) assim como Hamre *et al.* (2004) afirmam que os metabólitos plasmáticos, como colesterol, triglicédeos e glicose, respondem à modulação da dieta envolvendo o conteúdo lipídico e amido. No presente estudo o colesterol e os lípidos totais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as dietas.

É muito importante avaliar a histologia intestinal de peixes marinhos alimentados com ingredientes vegetais para entender os efeitos na saúde intestinal em diferentes níveis de inclusão e no bem-estar dos peixes (Fuentes-Quesada *et al.*, 2018). O presente estudo mostra que dietas suplementadas com *G. gracilis* não causaram alterações morfológicas no intestino de dourada, no entanto observaram-se algumas diferenças, quanto à vacuolização supranuclear absorptiva, a posição do núcleo dos enterócitos, em peixes alimentados com as diferentes dietas de *G. gracilis* em comparação com a dieta controlo. Em outros estudos, também foi verificada a ausência de efeitos causados pelo uso de algas na alimentação de várias espécies de peixes. Guerreiro *et al.*, (2019) incorporaram na três dieta na alimentação de douradas, uma de 5% de *Ulva lactuca*, outra de 5% de *Chondrus crispus* e 2,5% de ambas as algas e concluíram que as dietas experimentais não causaram alterações na histomorfologia intestinal porque não foram observados sinais de hipertrofia ou hiperplasia das células caliciformes e também a largura da lâmina própria era fina e a submucosa demonstrou uma largura semelhante em peixes alimentados com algas e controlo. Também Batista *et al.* (2020) num estudo com robalos alimentados com dietas de *G. gracilis* a 8%, *Nannochloropsis oceanica* a 8% e uma mistura das duas algas a 4% cada uma, a morfologia intestinal muito bem preservada, sem grandes diferenças entre as dietas experimentais. Num outro estudo de Araújo *et al.*, (2016) com *Oncorhynchus mykiss* alimentados com 10% de *G. vermiculophylla*, mostraram que a altura das vilosidades e o diâmetro intestinal eram significativamente menores do que em peixes alimentados apenas com 5% da alga. Vizcaíno *et al.*, (2019), em juvenis de *Solea senegalensis* alimentados com dietas suplementadas com 5% de *Ulva ohnoi*, obtiveram resultados que demonstraram que as dietas não causaram alterações na morfologia intestinal ou enterocitárias. Segundo Guerreiro *et al.*, (2019), o efeito das algas na estrutura e morfologia do intestino pode ser variável com a espécie de peixes, as algas utilizadas

nas dietas, o processamento de dietas ou outros ingredientes presentes, e isso pode justificar as diferenças entre estudos, requerendo por isso estudos mais aprofundados.

No *challenge* bacteriano com *Phdp*, em peixes alimentados com 5% de alga moída apresentaram uma mortalidade quase nula, o que pode ser devido aos trombócitos que tiveram maior percentagem neste tratamento, e Fink *et al.*, (2015) e Stosik *et al* (2019), sugeriram que os trombócitos também participam na função de defesa desempenhando um papel importante por meio da atividade fagocítica e capacidade de inibir bactérias, constituindo quase metade da população de células fagocíticas do sangue periférico, conferindo assim uma maior resistência bacteriana o que pode ter impedido a proliferação do *Phdp*. Num estudo feito por Peixoto *et al.*, (2019) com robalos (*D. labrax*), suplementados com *Gracilaria* sp. a 5%, obtiveram maior percentagem de sobrevivência contra a infecção por *Phdp*, assim como no presente estudo. Quanto à suplementação com 0,2% de ficocolóides pode-se observar uma mortalidade de quase 100%, e segundo Wan *et al.*, (2019) os polissacarídeos, como os ficocolóides atuam como emulsionantes o que pode ser um obstáculo à absorção de nutrientes em todo o sistema digestivo dos peixes, esses autores ainda afirmam que apesar de haver pouca informação sobre a forma como a suplementação de ficocolóides na alimentação de peixes influencia a qualidade e aceitabilidade da dieta, num estudo anterior de Cheng *et al.*, (2008) com inclusão dietética de alginato de sódio ou k-carragenano em *Epinephelus fuscoguttatus*, foi demonstrado que esses compostos tinham capacidade para aumentar a imunidade inata de peixes (contagem de leucócitos, atividade fagocítica e índice fagocítico) e aumentar a taxa de sobrevivência na presença do patógeno *Vibrio alginolyticus*, enquanto no presente estudo os parâmetros de imunidade analisados não foram alterados e a mortalidade no *challenge* com *Phdp* foi muito alta.

Com este presente estudo conclui-se que *Gracilaria gracilis* a um nível de suplementação de 5% e 2,5% de alga moída influenciou beneficemente o crescimento das douradas, assim como conferiu maior resistência bacteriana contra a *Phdp* apresentando uma taxa de mortalidade quase nula. Também apresentou maiores atividades nas enzimas antioxidantes como a CAT e a SOD. Relativamente à análise histológica, a integridade dos intestinos foi preservada na suplementação de 5%, assim como nas outras dietas.

Como perspectivas futuras, e tendo em vista a melhor avaliação dos efeitos das suplementações no trato intestinal deverá ser feito um estudo da microbiota intestinal, assim como a separação do

intestino anterior e do posterior de modo a perceber melhor os efeitos da suplementação no comportamento e número das células características de cada uma destas partes dos intestinos (as células Goblets, os enterócitos, entre outros) , assim como aumentar as concentrações de alga nas diferentes dietas e alargar a duração do ensaio da alimentação de modo a testar se a nível histológico, se serão observadas diferenças e alterações acentuadas entre os diferentes tratamentos, assim como averiguar se a resposta imune e as enzimas antioxidantes apresentam maior atividade, principalmente no LPO, GST e GT. Poderão ser feitos testes adicionais de forma a complementar os resultados, sendo que na GT seria importante quantificar a GSH ou GSSG. Portanto pode dizer-se que com a possibilidade de obter a alga a partir de sistemas integrados de aquacultura, ecologicamente mais sustentáveis (Aquacultura multi-trófica integrada- IMTA), a *Gracilaria gracilis* pode ser considerada um bom suplemento dietético para a aquacultura. Também seria interessante realizar este estudo com outras espécies de algas e ou peixes, assim como avaliar o potencial de defesa com outros patógenos.

Referências bibliográficas

- Afonso, A., Lousada, S., Silva, J., Ellis, A.E., Silva, M.T., 1998. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Dis Aquat Org* 34, 27-37.
- Almeida, J.R., Oliveira, C., Gravato, C., Guilhermino, L., 2010. Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion. *Ecotoxicology* 19, 1369-1381.
- Alvarez-Pellitero, P., 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126(3-4), 171–198.
- Ameer, W., De Lapuente, J., El Megdiche, Y., Barhoumi, B., Trabelsi, S., Camps, L., Serret, J., Ramos-López, D., Gonzalez-Linares, J., Driss, M.R., 2012. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). *Marine pollution bulletin*. 64, 241-251.
- Andreoni, F., Magnani, M., 2014. Photobacteriosis: prevention and diagnosis. *Journal of Immunology Res* 2014:7.
- Araújo, M., Rema, P., Sousa-Pinto, I., Cunha, L., Peixoto, M., Pires, M., Seixas, F., Brotas, V., Beltrán, C., Valente, LP., 2016. Dietary inclusion of IMTA cultivated *Gracilaria vermiculophylla* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: effects on growth, intestinal morphology, tissue pigmentation, and immunological response. *Journal of Applied Phycology*.
- Baker, M., Cemiglia, G., Zaman, A., 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* 190, 360-365.
- Banerjee, G., Ray, A.K., 2017. The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Research in Veterinary Science*, 115, 66–77.
- Batista, S., Pereira, R., Oliveira, B., Baião, L. F., Jessen, F., Tulli, F., ... Valente, L. M. P., 2020. Exploring the potential of seaweed *Gracilaria gracilis* and microalga *Nannochloropsis oceanica*, single or blended, as natural dietary ingredients for European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Applied Phycology*.
- Batista, S., 2008. Efeito da substituição da farinha de peixe por farinha de algas *Gracilaria* sp. e *Ulva rigida* no crescimento e nos parâmetros metabólicos da dourada (*Sparus aurata*). Dissertação de mestrado integrado de Engenharia Biológica, Universidade do Algarve.

- Biller, J., Takahashi, L., 2018. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. *Fish Shellfish Immunology* 47: 360-367.
- Bird, R.P., Draper, A.H., 1984. Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. *Methods in Enzymology* 90, 105-110.
- Bricknell, I., Dalmo, R.A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture, *Fish & Shellfish Immunology*.19 (5) 457-72.
- Caipang, C., Lazado, C., 2015. Nutritional impacts on fish mucosa: immunostimulants, pre- and probiotics. *Mucosal Health in Aquaculture*, 211–272.
- Campbell, T.W., 2004. Hematology of lower vertebrates., in: 55th Annual meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) and 39th Annual meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP). ACVP and ASVCP (Eds.), Middleton WI, USA. International Veterinary Information Service, Ithaca NY, pp.1214–1104.
- Cannizzo, E. S., Clement, C. C., Sahu, R., Follo, C., & Santambrogio, L., 2011. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *Journal of Proteomics*, 74(11), 2313–2323.
- Cappello, T., Brandão, F., Guilherme, S., Santos, M. A., Maisano, M., Mauceri, A., Pereira, P., 2016. Insights into the mechanisms underlying mercury-induced oxidative stress in gills of wild fish (*Liza aurata*) combining 1 H NMR metabolomics and conventional biochemical assays. *Science of The Total Environment*, 548-549, 13–24.
- Carbone, D., Faggio, C., 2016. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology* 54, 172-178.
- Castro, R., Zarra, I., Lamas, J., 2004. Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture* 229:67–78.
- Cheng, A.C., Chen, Y.Y., Chen, J.C., 2008. Dietary administration of sodium alginate and kappa-carrageenan enhances the innate immune response of brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* p 121: 206–215.
- Clairborne, A., 1985. Catalase activity. In Grenwald, R.A. (Ed), *Handbook of Methods of Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 283–284.
- Clauss, T.M., Dove, A.D., Arnold, J.E., 2008. Hematologic disorders of fish. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*;11(3):445–62.
- Claver, J.A., Quaglia, A.I., 2009. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*; 18(2):87–97

- Costas, B., Conceição, L.E.C., Dias, J., Novoa, B., Figueras, A., Afonso, A., 2011. Dietary arginine and repeated handling increase disease resistance and modulate innate immune mechanisms of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). *Fish & Shellfish Immunology* 31, 838-847.
- Cruz, P.M., Ibáñez, A.L., Hermosillo, O.A.M., Saad, H.C.R., 2012. Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiology* 2012:13.
- De Almeida, C., S. Falcão, H., Lima, G., Montenegro, C., Lira, N., Athayde-Filho, P., Rodrigues, L., Souza, M., Barbosa-Filho, J., Batista, L., 2011. Bioactivities from marine algae of the genus *Gracilaria*. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 4550–4573.
- Dong, M., Liang, Y., Ramalingam, R., Tang, S., Shen, W., Gopalakrishnan, S., Lam Y., 2017. Proteomic characterization of the interactions between fish serum proteins and waterborne bacteria reveals the suppression of antioxidative defense as a serum-mediated antimicrobial mechanism. *Fish & Shellfish Immunology* 62: 96-106.
- Du, Z.Y., Liu, Y.J., Tian, L.X., Wang, J.T., Wang, Y., Liang, G.Y., 2005. Effect of dietary lipid level on growth, feed utilization and body composition by juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition* 11: 139–146
- Ellis, A.E., 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 827-839.
- Emre, Y., Ergün, S., Kurtoğlu, A., Güroy, B., Güroy, D., 2013. Effects of Ulva meal on growth performance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) at different levels of dietary lipid. *Turkish Journal of Fish Aquatic* 13:841–846.
- Eroglu, A., Dogan, Z., Kanak, E., Atli, G., Canli, M., 2014. Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. *Environment Science Pollution Research* 22:3229–3237.
- Francavilla, M., Franchi, M., Monteleone, M., Caroppo, C., 2013. The red seaweed *Gracilaria gracilis* as a multi products source. *Marine Drugs*,
- Faggio C, Fazio F., Marafioti S., Arfuso F., Piccione G., 2015. Oral administration of Gum Arabic: effects on haematological parameters and oxidative stress markers in *Mugil cephalus*, *Iranian Journal of Fisheries Science*. 14, 60-72.
- FAO, 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Contributing to food security and nutrition for all.
- FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all.

- Fazio, F., 2018. Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: A review. *Aquaculture* 3: 125-130.
- Fazio, F., Saoca, C., Casella, S., Fortino, G., & Piccione, G., 2015. Relationship between blood parameters and biometric indices of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* cultured in onshore tanks. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 48(4), 289–296.
- Fink, I.R., Ribeiro, C.M.S., Forlenza, M., Taverne-Thiele, A., Rombout, J.H.W.M., Savelkoul, H.F.J., Wiegertjes, G.F., 2015. Immune-relevant thrombocytes of common carp undergo parasite-induced nitric oxide-mediated apoptosis. *Development & Comparative Immunology* 50, 146-154.
- Frasco, M.F., Guilhermino, L., 2002. Effects of dimethoate and betaphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 149-156.
- Fuentes-Quesada, J.P., Viana, M.T., Rombenso, N.A., Guerrero-Rentería, Y., Nomura-Solís, M., Gomez-Calle, V., Lazo, J.P., Mata-Sotres, J.A., 2018. Enteritis induction by soybean meal in *Totoaba macdonaldi* diets: Effects on growth performance, digestive capacity, immune response and distal intestine integrity. *Aquaculture* 495, 78–89.
- Gabriel, U.U., Akinrotimi, O.A., Eseimokumo, F., 2011. Haematological responses of wild Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after acclimation to captivity. *Journal of Biology and Science*. 4: 225–230.
- Ganesan, P., Kumar, C.S., Bhaskar, N., 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology* 99:2717–2723
- Gatlin III, D.M., 2002. Nutrition and fish health, in: *Fish Nutrition*, Academic Press, San Diego, C, pp 671-702.
- Guerreiro, I., Magalhães, R., Coutinho, F., Couto, A., Sousa, A., Delerue-Matos, C., Domingues, V.F., Oliva-Teles, A., Peres, H., 2019. Evaluation of the seaweeds *Chondrus crispus* and *Ulva lactuca* as functional ingredients in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Applied Phycology* 31, 2115-2124.
- Guerreiro, I., Couto, A., Pérez-Jiménez, A., Oliva-Teles, A., Enes, P., 2015. Gut morphology and hepatic oxidative status of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed plant feedstuffs or fishmeal-based diets supplemented with short-chain fructo-oligosaccharides and xylo-oligosaccharides. *British Journal of Nutrition* 114, 1975–1984.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biology and Chemistry* 249, 7130-7139.

- Hamre, K., Christiansen, R., Waagbø, R., Maage, A., Torstensen, B.E., Lygren, B., Lie, Ø., Wathne, E., Albrektsen, S., 2004. Antioxidant vitamins, minerals and lipid levels in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.): effects on growth performance and fillet quality. *Aquaculture Nutrition* 10: 113–123
- Heo, S.J., Park, E.J., Lee, K.W., Jeon, K.J., 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology* 96:1613–1623.
- Hirano, M., 2018. The Origin and Early Evolution of Adaptive Immune Systems. *Advances in Comparative Immunology*, 637–657. doi:10.1007/978-3-319-76768-0_17.
- Hirano, M., Guo, P., McCurley, N., Schorpp, M., Das, S., Boehm, T., & Cooper, M. D., 2013. Evolutionary implications of a third lymphocyte lineage in lampreys. *Nature* 501, 435–438.
- Hoseinifar, S. H., Yousefi, S., Capillo, G., Paknejad, H., Khalili, M., Tabarraei, A., Van Doan, H., Spano, N., Faggio, C., 2018. Mucosal immune parameters, immune and antioxidant defence related genes expression and growth performance of zebrafish (*Danio rerio*) fed on *Gracilaria gracilis* powder. *Fish & Shellfish Immunology* 83: 232–237.
- Houston, A.H., 1990. Blood and circulation; In: Shreck, C.B. & Moyle, P.B. (eds.). *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Maryland, p. 273 – 334.1990.
- Ibrahim, M.D., Fathi, M., Mesalhy, S., 2010. Effect of dietary supplementation of inulin and vitamin C on the growth, hematology, innate immunity, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology* 29:241–246.
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R.S., Eliassen, R.A., Carlsen, K.T., Evjen T., 2005. Stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts during commercial well boat transports, and effects on survival after transfer to sea. *Aquaculture* 243:373–382.
- Jain, N.,C., 1993. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Jawad, L.A., Al-Mukhtar, M.A., Ahmed, H.K., 2004. The relationship between haematocrit and some biological parameters of the Indian shad, *Tenulosa ilisha* (Family Clupeidae). *Animal Biodiversity Conservation*. 27, 47–52.
- Kadam, S., Prabhasankar, P., 2010. Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. *Food Research International*, 43, 1975–1980.
- Kaplow, L.S., 1965. Simplified Myeloperoxidase Stain Using Benzidine Dihydrochloride. *The Journal of Hematology* 26, 215
- Klebanoff, S. J., 1968. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. *Journal of Bacteriology*, 95, 2131–2138.

- Lee, J.C., Hou, M.F., Huang, H.W., Chang, F.R., Chi-Chen, Y., Tang, J.Y., Chang, H.W., 2013. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell International* 13:55
- Leal, E., Fernández-Durán, B., Guillot, R., Ríos, D., Cerdá-Reverter, J., 2011. Stress-induced effects on feeding behavior and growth performance of the seabass (*Dicentrarchus labrax*): a self-feeding approach. *Journal of Comparative Physiology B* 181:1035–1044
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., Wu, G., 2008. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* 37:43–53.
- Lordan, S., Ross, R.P., Stanton, C., 2011. Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine Drugs*, 9, 1056–1100.
- Luskova, V., 1997. Annual cycles and normal values of hematological parameters in fishes. *Acta Scientiarum Naturalium Bohemoslovacae Brno*. 31:70–78.
- Lyra, G., Gurgel, C., Costa, S., De Jesus, P., Oliveira, M., Oliveira, E., Davis, C., Nunes, C., 2016. Delimitating cryptic species in the *Gracilaria domingensis* complex (Gracilariaceae, Rhodophyta) using molecular and morphological data, *Journal of Phycology* 52: 997–1017.
- Machado, M., Azeredo, R., Díaz-Rosales, P., Afonso, A., Peres, H., Oliva-Teles, A., Costas, B., 2015. Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response. *Fish & Shellfish Immunology* 42, 353-362.
- Madeira, D., Vinagre, C., Diniz, M.S., 2016. Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*. *Ecological Indicators* 63: 324–331.
- Magnoni, L.J., Martos-Sitcha, J.A., Queiroz, A., Calduch-Giner, J.A., Gonçalves, J.F.M., Rocha, C.M.R., Abreu, H.T., Schrama, J.W., Ozorio, R.O.A., Pérez-Sánchez, J., 2017. Dietary supplementation of heat-treated *Gracilaria* and *Ulva* seaweeds enhanced acute hypoxia tolerance in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biology open* 6, 897-908.
- Makkar, H.P.S., Tran, G., Heuzé, V., Giger-Reverdin, S., Lessire, M., Lebas, F., Ankers, P., 2016. Seaweeds for livestock diets: a review. *Animal Feed Science Technology* 212:1–17.
- Michalak, I., & Chojnacka, K. 2015. Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences*, 15(2), 160–176.
- Modrá, H., Svobodová, Z., Kolářová, J., 1998. Comparison of differential leukocyte counts in fish of economic and indicator importance. *Acta Veterinaria Brno*. 67:215–226.

- Molinski, T.F., Dalisay, D.S., Lievens, S.L., Saludes, J.P., 2009. Drug development from marine natural products. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 69–85.
- Nayak, S.K., 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology* 29, 2-14.
- Norambuena, F., Hermon, K., Skrzypczyk, V., Emery, J.A., Sharon, Y., Beard, A., Turchini, G.M., 2015. Algae in Fish Feed: Performances and Fatty Acid Metabolism in Juvenile Atlantic Salmon. *Plos One* 10(4): e0124042.
- Oda, S. S., Tohamy, H. G., Massoud, R. G., 2016. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16(4).
- Owen, J.B., Butterfield, D.A., 2010. Measurement of oxidized/reduced glutathione ratio. *Methods in Molecular Biology* 648:269–277.
- Passos, R., Correia, A.P., Ferreira, I., Pires, P., Pires, D., Gomes, E., Do Carmo, B., Santos, P., Simões, M., Afonso, C. and Baptista, T., 2020. Effect on health status and pathogen resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed with diets supplemented with *Gracilaria gracilis*, *Aquaculture* 531: 735888.
- Peixoto, M.J., Ferraz, R., Magnoni, L.J., Pereira, R., Gonçalves, J.F., Calduch-Giner, J., Pérez-Sánchez, J., Ozório, R.O.A., 2019. Protective effects of seaweed supplemented diet on antioxidant and immune responses in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) subjected to bacterial infection. *Scientific Reports* 9.
- Peixoto, M. J., Magnoni, L., Gonçalves, J. F. M., Twijnstra, R. H., Kijjoa, A., Pereira, R., Ozório, R. O. A., 2018. Effects of dietary supplementation of *Gracilaria* sp. extracts on fillet quality, oxidative stress, and immune responses in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Applied Phycology* 31, 761-770.
- Peixoto, M.J., Salas-Leitón, E., Brito, F., Pereira, L.F., Svendsen, J.C., Baptista, T., Pereira, R., Abreu, H., Reis, P.A., Gonçalves, J.F.M., Ozório, R.O.A., 2016 (a). Effects of dietary *Gracilaria* sp. and *Alaria* sp. supplementation on growth performance, metabolic rates and health in meagre (*Argyrosomus regius*) subjected to pathogen infection. *Journal of Applied Phycology*, 29:433–447.
- Peixoto, M. J., Salas-Leitón, E., Pereira, L. F., Queiroz, A., Magalhães, F., Pereira, R., Ozório, R. O. de A., 2016 (b). Role of dietary seaweed supplementation on growth performance, digestive capacity and immune and stress responsiveness in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture Reports*, 3, 189–197.
- Peixoto, M.J., Svendsen, J.C., Malte, H., Pereira, L., Carvalho, P., Pereira, R., Gonçalves, J.M., Ozório, R.A, 2016 (c). Diets supplemented with seaweed affect metabolic rate, innate immune, and antioxidant responses, but not individual growth rate in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Applied Phycology* 28:2061–2071.

- Pereira, L., Amado, A.M., Critchley, A.T., van de Velde, F., Ribeiro-Claro, P.J.A., 2009. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocolloids* 23: 1903-1909.
- Plant, K.P., LaPatra, S.E., 2011. Advances in fish vaccine delivery, *Developmental & Comparative Immunology*, 35- 1256-1262.
- Quade, M.J., Roth, J.A., 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology Immunopathology* 58 (3-4), 239-248.
- Queiroz, A.C.S., Pereira, R., Domingues, A.F., Peixoto, M.J.D., Gonçalves, J.F.M., Ozorio, R.O.A., 2014. Effect of seaweed supplementation on growth performance, immune and oxidative stress responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Front. Mar. Sci.*, Conference Abstract: IMMR | International Meeting on Marine Research.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Pádua, S.B., Tavares-Dias, M., Egami, M.I., 2013. Métodos Para Análise Hematológica Em Peixes. Eduem, Maringá.
- Rasmussen, R.S., Morrissey, M.T., 2007. Marine biotechnology for production of food ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research*, 52, 237–292.
- Rizzo, C., Genovese, G., Morabito, M., Faggio, C., Pagano, M., Spanò, A., Zammuto, V., Armeli M., S., Manghisi, A., Cigala, R., Crea, F., Marino, F., Gugliandolo, C., 2017. Potential Antibacterial Activity of Marine Macroalgae against Pathogens Relevant for Aquaculture and Human Health. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 11: 1695-1706.
- Roberts, R.J., 2012. *Fish pathology*. John Wiley & Sons, USA.
- Rodger, H. D., 2016. Fish Disease Causing Economic Impact in Global Aquaculture. *Fish Vaccines*, 1–34.
- Rodrigues, A.C.M., Gravato, C., Quintaneiro, C., Bordalo, M.D., Barata, C., Soares, A., Pestana, J.L.T., 2017. Energetic costs and biochemical biomarkers associated with esfenvalerate exposure in *Sericostoma vittatum*. *Chemosphere* 189, 445-453.
- Romalde, J.L., 2002. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology* 5:3–9
- Sahu, M., Swarnakumar, N., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Kannan, L., 2008. Probiotics in aquaculture: Importance and future perspectives. *Indian Journal of Microbiology* 48: 299-308.
- Samad, R., 2013. Effects of dietary supplementation of Spirulina and Quercetin on growth, innate immune responses, disease resistance against *Edwardsiella tarda*, and dietary antioxidant capacity in the juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 16: 7–14.

- Satake, F., Pádua, S.B., Ishikawa, M.M., 2009. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica, in: Tavares-Dias, M. (Org.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá, pp. 330–345.
- Satoh, K., Nakagawa, H., & Kasahara, S., 1987. Effect of Ulva meal supplementation on disease resistance of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 1115-1120.
- Silva, D.M., Valente, L.M.P., Sousa-Pinto, I., Pereira, R., Pires, M.A., Seixas, F., Rema, P., 2015. Evaluation of IMTA-produced seaweeds (*Gracilaria*, *Porphyra*, and *Ulva*) as dietary ingredients in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., juveniles. Effects on growth performance and gut histology. *Journal of Applied Phycology* 27, 1671–1680
- Scapigliati G., Romano, N., Buonocore, F., Picchietti, S., Baldassini, M.R., Prugnoli, D., Galice, A., Meloni, S., Secombes, C.J., Mazzini, M., Abelli, L., 2002. The immune system of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. *Developmental & Comparative Immunology* 26:151–160.
- Schieber M. and Chandel N., 2014. ROS Function in Redox Signaling and Review. *Oxidative Stress. Current Biology* 24: 453-462.
- Segal, A.W., 2005. How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology* 23, 197–223
- Shabani F., Erikson U., Beli E., Rexhepi A., 2016. Live transport of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and subsequent live storage in market: water quality, stress and welfare considerations. *Aquaculture* 453: 110–115.
- Sotoudeh, E., Jafari, M., 2017. Effects of dietary supplementation with red seaweed, *Gracilaria pygmaea*, on growth, carcass composition and hematology of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture International* 25, 1857-1867.
- Sotoudeh, E., Mardani, F., 2017. Antioxidant-related parameters, digestive enzyme activity and intestinal morphology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry fed graded levels of red seaweed, *Gracilaria pygmaea*. *Aquaculture Nutrition* 24, 777-785
- Stosik, M., Tokarz-Deptula, B., Deptula, W., 2019. Characterisation of thrombocytes in Osteichthyes. *Journal of Veterinary Research* 63, 123-131.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., 2004. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto, Villimpress Complexo Gráfico.
- Thanigaivel, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., Thomas, J., 2015. Investigation of seaweed extracts as a source of treatment against bacterial fish pathogen. *Aquaculture* 448, 82-86.

- Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M., Montero, D., Robaina, L., Real, F., Sweetman, J., Tort, L., Izquierdo, M., 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish & Shellfish Immunology*. 23, 969-981.
- Torres, P., Santos, J. P., Chow, F., & dos Santos, D. Y. A. C., 2019. A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). *Algal Research*, 37, 288–306.
- Tu, T.H, Silvestre, F, Bernard, A, Douny, C, Phuong, T.C., Maghuin-Rogiste, G., Kestemont P., 2008. Oxidative stress response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to enrofloxacin and to culture system. *Aquaculture* 285, 244-248.
- Valente, L.M.P., Gouveia, A., Rema, P., Matos, J., Gomes, EF., Pinto, IS., 2006. Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 252:85–91.
- Valente, L.P., Araújo, M., Batista, S., Peixoto, M., Sousa-Pinto, I., Brotas, V., Cunha, L., Rema, P., 2015. Carotenoid deposition, flesh quality and immunological response of Nile tilapia fed increasing levels of IMTA-cultivated *Ulva* spp. *Journal of Applied Phycology* 28, pages 691–701.
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Diniz, M., 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological indicators*. 23, 274-279.
- Vizcaíno, A.J., Fumanal, M., Sáez, M.I., Martínez, T.F., Moriñigo, M.A., Fernández-Díaz, C., Anguis, V., Balebona, M.C., Alarcón, F.J., 2019. Evaluation of *Ulva ohnoi* as functional dietary ingredient in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Effects on the structure and functionality of the intestinal mucosa. *Algal Research* 42, 101608.
- Vizcaíno, A.J., Mendes, S.I., Varela, J.L., Ruiz-Jarabo, I., Rico, R., Figueroa, F.L., Abdala, R., Moriñigo, M.Á., Mancera, J.M., Alarcón, F.J., 2016. Growth, tissue metabolites and digestive functionality in *Sparus aurata* juveniles fed different levels of macroalgae, *Gracilaria cornea* and *Ulva rigida*. *Aquaculture Research* 47:3224–3238
- Wan, A. H. L., Davies, S. J., Soler-Vila, A., Fitzgerald, R., & Johnson, M. P. (2018). Macroalgae as a sustainable aquafeed ingredient. *Reviews in Aquaculture* 3: 1-35.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G., 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry* 116:240–248

- Wassef, E.A., El-Sayed, A-F.M., Sakr, E.M., 2013. Pterocladia (Rhodophyta) and Ulva (Chlorophyta) as feed supplements for European seabass, *Dicentrarchus labrax* L., fry. *Journal of Applied Phycology* 25:1369–1376.
- Xu, S., Zhang, L., Wu, Q., Liu, X., Wang, S., You, C., Li, Y., 2011. Evaluation of dried seaweed *Gracilaria lemaneiformis* as an ingredient in diets for teleost fish *Siganus canaliculatus*. *Aquaculture International* 19: 1007–1018.
- Xuan, X., Wen, X., Li, S., Zhu, D., Li, Y., 2013. Potential use of macro-algae *Gracilaria lemaneiformis* in diets for the black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*, juvenile. *Aquaculture* 412-413, 167-172.
- Younis, E.S.M., Al-Quffail, A.S., Al-Asgah, N.A., Abdel-Warith, A.W.A., Hafedh, Al-YS., 2018. Effect of dietary fish meal replacement by red algae, *Gracilaria arcuata*, on growth performance and body composition of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Saudi Journal of Biological Science*.
- Zar, J., 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ 4: 620.
- Zhang, S., Wang Z., Wang H., 2013. Maternal immunity in fish, *Developmental & Comparative Immunology*, 39,pp. 72-78.
- Zhang, Q., Yu, P., Li, Z., Zhang, H., Xu, Z., Li, P., 2003. Antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions from *Porphyra haitanesis*. *Journal of Applied Phycology* 15:305–310.