



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ARGENIS ALIRIO FIGUEROA GUTIÉRREZ

**USO DA MACROALGA *Kappaphycus alvarezii* NA ALIMENTAÇÃO DE
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) E RESPOSTAS AO DESAFIO DE
*Pseudomonas aeruginosa***

ILHÉUS- BAHIA

2024

ARGENIS ALIRIO FIGUEROA GUTIÉRREZ

**USO DA MACROALGA *Kappaphycus alvarezii* NA ALIMENTAÇÃO DE
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) E RESPOSTAS AO DESAFIO DE
*Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Linha de pesquisa: Produção e Comportamento Animal

Orientador: Prof. Dr. Luís Gustavo Tavares Braga

Coorientador: Prof. Dr. Lucas José Luduvério Pizauro

ILHÉUS- BAHIA

2024



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ - UESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPP
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

PARECER SOBRE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO / TESE DE DOUTORADO

NOME DO ALUNO: **ARGENIS ALIRIO FIGUEROA GUTIÉRREZ**

TÍTULO DO TRABALHO: **USO DA MACROALGA *Kappaphycus alvarezii* NA ALIMENTAÇÃO DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) E RESPOSTAS AO DESAFIO DE *Pseudomonas aeruginosa*.**

NOME DO PARECERISTA: **Joaldo Rocha Luz**

A partir do desenvolvimento do trabalho, análise do material produzido e da pesquisa científica realizada, foi possível constatar a relevância do estudo sobre o “Uso da macroalga *Kappaphycus alvarezii* na alimentação de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e respostas ao desafio de *Pseudomonas aeruginosa*”.

O estudo contribui significativamente para o conhecimento científico das respostas fisiológicas da tilápia nos experimentos realizados, especialmente na área de sanidade (desafio por *Pseudomonas aeruginosa*). No material escrito o autor deverá reescrever e aprofundar (principalmente) os resultados e a discussão para torná-los mais compreensíveis e cumprir o propósito de comunicar, à comunidade científica, as descobertas realizadas. Além disso, o mesmo necessitará apresentar maior uniformidade de formatação e adequação das referências bibliográficas. Estas deverão ser adequadas conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal/ABNT. Sugere-se realizar uma revisão detalhada para corrigir eventuais erros conceituais e atualização de algumas referências, visando eliminar excesso que não contribui de modo mais amplo para o trabalho.

Diante do exposto, este PARECER é pela APROVAÇÃO do discente pela relevante contribuição científica apresentada na dissertação supracitada. Observações detalhadas sobre o trabalho serão enviadas, como sugestões, por e-mail próprio para consideração e adesão pelo discente e seu orientador.

CONCLUSÃO:

☒ APROVADO
☐ REPROVADO

LOCAL

DATA: 29/08/2024

ASSINATURA

UESC – Ilhéus (BA).

ARGENIS ALIRIO FIGUEROA GUTIÉRREZ

**USO DA MACROALGA *Kappaphycus alvarezii* NA ALIMENTAÇÃO DE
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) E RESPOSTAS AO DESAFIO DE
*Pseudomonas aeruginosa***

Dsc. Luís Gustavo Tavares Braga
UESC/ DCAA (Orientador)

Dsc. Joaldo Rocha Luz
IFBaiano

Dsc. Ana Paula de Souza Ramos
UESB

**ILHÉUS- BAHIA
2024**

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus e a Nossa Senhora de Aparecida, a São Sebastião e São Miguel Arcanjo e a santa Catarina de Alexandria, por terem me abençoado e me levado a cursar um mestrado que eu tanto pedia.

Gostaria de agradecer à minha esposa e à minha filha, que me deram força e entusiasmo para enfrentar as adversidades e perseverar em minhas prioridades, nunca desistiram de mim e me apoiaram todos os dias da conclusão deste mestrado.

Quero agradecer aos meus pais, que me apoiaram desde o início, acreditaram em mim que eu conseguiria, que eu tinha a capacidade de fazer esse mestrado, e que não hesitaram em me acompanhar e até mesmo me ajudar nas etapas finais do mestrado.

Gostaria de agradecer ao meu professor orientador e a UESC por ter me aceitado, sem eles eu não teria tido a oportunidade de fazer esse mestrado. Sou grato pela fé que o meu professor orientador depositou em mim, sei que não foi fácil, mas ele não perdeu a fé em mim e me deu as oportunidades e espero que eu tenha conseguido cumpri-las.

Agradeço aos meus colegas de sala de aula, e a Marcia Torres, que me apoiaram e me deram a coragem de que precisei durante muito tempo para acreditar em minhas experiências, compartilhá-las com eles e trabalhar juntos, mesmo nos momentos mais difíceis, quando eu estava precisando e esperando que eu pudesse ter sucesso.

A todos eles, obrigado!

RESUMO

Uma das espécies mais cultivadas no mundo é a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), devido à qualidade de sua carne e rusticidade, o que a coloca em destaque no desenvolvimento da aquicultura. Com o aumento e a intensificação dos cultivos, observa-se o surgimento de doenças e mortalidade dos peixes de cultivo, frequentemente causadas por falhas no manejo, dietas de baixa qualidade e aumento da resistência bacteriana devido à exposição a antibióticos. A busca por alternativas naturais para tratar ou prevenir doenças na piscicultura e minimizar os prejuízos causados por tratamentos químicos tem sido objeto de estudo nos últimos anos. Por possuir metabólitos secundários com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, a macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii* pode substituir o uso de tratamentos químicos. Durante esta pesquisa, objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de diferentes níveis de farinha de *K. alvarezii* na dieta sobre o desempenho zootécnico de juvenis de tilápia do Nilo por 60 dias, além de avaliar as variáveis hematológicas, a resposta imune, a caracterização das principais alterações histopatológicas de alguns órgãos e a taxa de sobrevivência dos peixes frente ao desafio da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* por um período de 15 dias. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições, considerando as diferentes concentrações de inclusão da farinha da macroalga: 0,00% (controle), 0,50%, 1,00%, 1,50% e 2,00%. Em relação ao desempenho zootécnico, não se observaram diferenças entre os tratamentos ($p > 0,05$). Quanto maior a concentração da farinha da macroalga na alimentação das tilápias, menores foram as lesões causadas nos órgãos dos peixes ($p < 0,05$). A inclusão da farinha de *K. alvarezii* melhora a imunidade e sobrevivência dos juvenis de tilápia quando desafiados com a bactéria *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: Aquicultura; Imunidade; Sistema intesivo; Sobrevivência

ABSTRACT

USE OF MACROALGAE *Kappaphycus alvarezii* IN FOOD OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) AND RESPONSES TO THE CHALLENGE OF *Pseudomonas aeruginosa*

One of the most widely cultivated species in the world is the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), due to the quality of its meat and its hardiness, which makes it a key player in the development of aquaculture. With the increase and intensification of farming, there has been an emergence of diseases and mortality, often caused by management failures, poor quality diets and increased bacterial resistance due to exposure to antibiotics. The search for natural alternatives to treat or prevent diseases in fish farming and minimize the damage caused by chemical treatments has been the subject of study in recent years. Because it contains secondary metabolites with antioxidant and antimicrobial properties, the red macroalga *Kappaphycus alvarezii* can replace the use of chemical treatments. The aim of this study was to evaluate the effect of including different levels of *K. alvarezii* flour in the diet on the zootechnical performance of juvenile Nile tilapia for 60 days, as well as evaluating the hematological variables, the immune response, the characterization of the main histopathological changes in some organs and the survival rate of the fish when challenged with the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* for a period of 15 days. A completely randomized design was used with five treatments and four replicates, considering the different concentrations of macroalgae meal: 0.00% (control), 0.50%, 1.00%, 1.50% and 2.00%. In terms of zootechnical performance, no differences were observed between the treatments ($p>0.05$). It was observed that the higher the concentration of macroalgae meal, the smaller the lesions caused to the fish organs ($p<0.05$). The inclusion of *K. alvarezii* flour improve the immunity and survival of juvenile tilapia when challenged with the bacterium *P. aeruginosa*.

Key Words: Aquaculture; Immunity; Intensive system; Survival.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécie <i>Oreochromis niloticus</i>	16
Figura 2 - Como pegar um peixe para injeção intraperitoneal.	34
Figura 3 - Cortes do intestino anterior a 4,5 cm do estomago depois do duodeno.	47
Figura 4 - Vilosidades intestinais, com células caliciformes, setas indicam as células caliciformes.	48
Figura 5 - Cortes histológicos de fígados dos peixes aumento 200 µm, com diferentes dietas de <i>Kappaphycus alvarezii</i> . Corados com H&E.	50
Figura 6 - Corte de fígado mostrando os centros melanomacrofágicos.	51
Figura 7 - Cortes histológicos do baço das tilápias, das diferentes dietas de <i>Kappaphycus alvarezii</i> .	53

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Taxonomia da Tilápia do Nilo	17
Tabela II - Dietas experimentais fornecidas a juvenis de tilápia do Nilo, com diferentes concentrações da farinha de <i>Kappaphycus alvarezii</i> .	30
Tabela III - Valores médios dos parâmetros de desempenho da tilápia do Nilo alimentada com dietas contendo níveis crescentes de farinha de <i>Kappaphycus alvarezii</i> .	38
Tabela IV - Valores bioquímicos do sangue, analisados do desempenho (média) com níveis crescentes de farinha de <i>Kappaphycus alvarezii</i> .	39
Tabela V - Valores médios (%) da composição química file de juvenis de tilápia suplementados com níveis crescentes de farinha de <i>Kappaphycus alvarezii</i> .	39
Tabela VI - Avaliação de leucócitos prévio ao desafio com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	41
Tabela VII - Mortalidades dos peixes desafiados com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	42
Tabela VIII - Leucócitos presentes no sangue após desafio com a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , contagem a: Células x10 ³ / µl.	43
Tabela IX - Níveis de classificação das alterações histopatológicas de intestino de tilápia.	45
Tabela X - Avaliação das dimensões das vilosidades intestinais e número de células caliciformes em µm.	46
Tabela XI - Avaliação das alterações do fígado segundo o método Pierce <i>et al.</i> , (1978).	49
Tabela XII - Avaliação das lesões causadas pela <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no baço das tilápias.	52

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1. OBJETIVOS	13
1.1 GERAL	13
1.2 ESPECÍFICOS	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 PRODUÇÃO MUNDIAL DA PESCA E AQUICULTURA	14
2.2 PRODUÇÃO BRASILEIRA DE PEIXES	15
2.3 A TITLÁPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>)	16
2.4 O USO DE ADITIVOS NA NUTRIÇÃO DAS TILÁPIAS	19
2.5 CARACTERIZAÇÃO DO USO DA MACROALGA <i>Kappaphycus alvarezii</i>	21
2.6 RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS NA TILAPICULTURA	23
2.7 PSEUDOMONAS AERUGINOSA	25
2.8 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS PARA A SAÚDE DOS PEIXES	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 APROVAÇÃO CEUA	28
3.2 ANIMAIS E INFRAESTRUTURA	28
3.3 QUALIDADE DA ÁGUA	29
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
3.4.1 PREPARAÇÃO DAS DIETAS E MANEJO ALIMENTAR	30
3.4.2 VARIÁVEIS DE DESEMPENHO ZOOTÉCNICO	31
3.5 ANÁLISES LABORATORIAIS	32
3.6 DESAFIO DOS FILHOTES DE TILÁPIA: A BACTÉRIA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
3.6.1 INFECÇÕES EXPERIMENTAIS	33
3.6.2 A ATIVIDADE IMUNOMODULADORA PÓS-DESAFIO	34
3.6.3 CONTAGEM DE GLÓBULOS BRANCOS APÓS DESAFIO	35
3.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	36

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4. RESULTADOS	38
4.1 PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS	38
4.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	38
4.3 COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DO FILÉ	39
4.4 CONTAGEM DE CÉLULAS DEFENSIVAS APÓS O DESEMPENHO	40
4.5 PARÂMETROS DESAFIADOS COM <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
4.6 DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS	42
4.7 AVALIAÇÃO DAS LESÕES INTESTINAIS	44
4.8 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DAS VILOSIDADES INTESTINAIS E CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS CALICIFORMES	45
4.9 AVALIAÇÃO DOS FÍGADOS DAS TILÁPIAS SOB DIFERENTES TRATAMENTOS COM <i>Kappaphycus alvarezii</i>	48
4.10 AVALIAÇÃO DOS BAÇOS DAS TILÁPIAS SOB DIFERENTES TRATAMENTOS COM <i>Kappaphycus alvarezii</i>	51
5. DISCUSSÃO	54
5.1 PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS	54
5.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	55
5.3 COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DO FILÉ	56
5.4 CONTAGEM DE CÉLULAS DEFENSIVAS APÓS O DESEMPENHO DAS TILÁPIAS	58
5.5 PARÂMETROS DOS DESAFIOS COM A <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
5.6 DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS	61
5.7 AVALIAÇÃO DAS LESÕES INTESTINAIS	63
5.8 AVALIAÇÃO MORFOMETRICA DAS VILOSIDADES INTESTINAIS E CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS CALCIFORMES	65
5.9 AVALIAÇÃO DOS FÍGADOS DAS TILÁPIAS SOB OS DIFERENTES TRATAMENTOS COM A FARINHA DE <i>KAPPAPHYCUS ALVAREZII</i>	66
5.10 AVALIAÇÃO DOS BAÇOS DAS TILÁPIAS SOB OS DIFERENTES TRATAMENTOS COM A FARINHA DE <i>KAPPAPHYCUS ALVAREZII</i>	68
6. CONCLUSÃO	69
7. RECOMENDAÇÃO	71

1 INTRODUÇÃO

2
3 A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus Linnaeus*), é originária do continente
4 africano e tem sido cultivada desde os tempos do Egito Antigo (Amal; Zamri-Saad, 2011).
5 Atualmente, o Brasil ocupa o quarto lugar entre os maiores produtores dessa espécie,
6 ficando atrás de Egito, Índia e China (Peixe BR, 2024). Em 2023, o Brasil alcançou uma
7 produção de 579.080 toneladas de tilápia, registrando um aumento de 5,28% em relação
8 ao ano anterior. Essa produção representou 65,3% do total nacional de pescado. Em 2022,
9 o mercado brasileiro contabilizou 550.060 toneladas de tilápia, correspondendo a 63,93%
10 da produção nacional (Peixe BR, 2024).

11 A piscicultura brasileira, inserida em um contexto de expansão e intensificação
12 da produção, tem se beneficiado de avanços nas técnicas de aquicultura. O aprimoramento
13 dos sistemas de cultivo, impulsionado pela busca por maior rentabilidade, exige atenção
14 redobrada à qualidade da água, que é diretamente influenciada pelas condições ambientais
15 do sistema de produção. Em sistemas intensivos de cultivo, o estresse associado a altas
16 densidades de estocagem pode favorecer a proliferação de patógenos oportunistas
17 presentes na água, no solo e no trato intestinal dos peixes, resultando em surtos de
18 doenças.

19 Nesse cenário, o cultivo de macroalgas tem surgido como uma estratégia
20 promissora para mitigar esses problemas. Reconhecidas por suas propriedades
21 antibacterianas, antitumorais e antioxidantes, as macroalgas têm demonstrado benefícios
22 significativos no manejo da qualidade da água e na prevenção de doenças em sistemas de
23 aquicultura. Um exemplo notável é a macroalga *Kappaphycus alvarezii*, cujas
24 propriedades biológicas têm sido amplamente estudadas e aplicadas com sucesso em
25 sistemas de cultivo (Lisboa, 2021).

26 Com o aumento da produção e da densidade de estocagem, especialmente em
27 sistemas superintensivos, as práticas inadequadas de manejo tornam os peixes mais
28 suscetíveis a doenças. Condições de estresse, combinadas à presença de microrganismos
29 patogênicos no ambiente aquático, facilitam a ocorrência de surtos de enfermidades,
30 como aquelas causadas por parasitas e bactérias. Essas doenças são responsáveis por altas
31 taxas de mortalidade na tilapicultura (Lisboa, 2021; Ali, 2021).

O manejo inadequado, incluindo o transporte e as biometrias, também contribui para a proliferação de bactérias oportunistas, como aquelas das famílias *Pseudomonadaceae*, *Aeromonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Streptococcaceae* e *Staphylococcaceae* (Ali et al., 2021). Dentre essas, *Pseudomonas aeruginosa*, um bacilo Gram-negativo, destaca-se por causar infecções graves em peixes submetidos a condição de estresse. Tais infecções são caracterizadas por descamação, ulcerações hemorrágicas, distensão abdominal e exoftalmia. Em análises patológicas, são frequentemente observados enterites hemorrágicas, hepatomegalia congestionada, aumento do baço e necrose nos rins (Thomas et al., 2021).

Estudos recentes têm mostrado que a incorporação de farinha de *Kappaphycus alvarezii* na alimentação de tilápias pode trazer benefícios significativos, como redução da mortalidade e aumento da resistência às doenças. Além de seu uso tradicional na culinária asiática, essa macroalga apresenta propriedades imunomoduladoras, antibacterianas e antioxidantes, o que a torna uma aliada valiosa para a aquicultura (Sapuri, 2014; Rajauria, 2015; Ganesan-Rajauria, 2019; Lisboa, 2021; Gaona, 2022).

As pesquisas de Sapuri (2014), Lisboa (2021) e Gaona (2022) indicam que os metabólitos bioativos presentes na *Kappaphycus alvarezii*, como carotenoides e compostos fenólicos, fortalecem o sistema imunológico dos peixes, aumentando sua resistência a desafios microbianos. A inclusão de macroalgas na dieta dos peixes tem sido associada ao aumento do número de células de defesa e à redução das taxas de mortalidade em condições de exposição a patógenos (Sapuri, 2014; Lisboa, 2021; Gaona, 2022).

Assim, a avaliação dos efeitos da adição de farinha de *K. alvarezii* na alimentação de tilápias pode contribuir para aprimorar o desempenho zootécnico e a resposta imunológica desses organismos frente a desafios patogênicos, como o causado por *P. aeruginosa*. Esses resultados evidenciam o papel estratégico das macroalgas no fortalecimento da piscicultura sustentável.

1. OBJETIVOS

1.1 GERAL

Avaliar os efeitos da inclusão de farinha de macroalga *Kappaphycus alvarezii* na alimentação de tilápias *Oreochromis niloticus*, com foco no desempenho zootécnico e na resposta imunológica ao desafio causado pelo agente patogênico *Pseudomonas aeruginosa*.

1.2 ESPECÍFICOS

- Analisar o desempenho zootécnico de tilápias (*O niloticus*) alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações de farinha de *Kappaphycus alvarezii*;
- Avaliar as variáveis hematológicas, como a contagem de células sanguíneas e a resposta imunológica, além das taxas de sobrevivência das tilápias submetidas ao desafio bacteriano com *Pseudomonas aeruginosa*;
- Caracterizar as principais alterações histopatológicas em órgãos das tilápias expostas ao desafio bacteriano com *Pseudomonas aeruginosa*, como fígado, rim e baço.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO MUNDIAL DA PESCA E AQUICULTURA

De acordo com Silva (2023) e a FAO (2022), a produção global de produtos aquáticos alcançou 122,6 milhões de toneladas. Deste total, 87,5 milhões de toneladas foram compostas por animais aquáticos, avaliados em 264,8 milhões de dólares, enquanto 35,1 milhões de toneladas corresponderam à produção de algas, com valor estimado em 16,5 milhões de dólares.

Esse panorama reflete a crescente demanda por produtos pesqueiros, evidenciada pelo consumo global de 20,2 kg per capita entre 2020 e 2022, mais do que o dobro da média registrada na década de 1960. Esse crescimento no consumo está intrinsecamente ligado à geração de empregos, já que cerca de 58,5 milhões de pessoas trabalham diretamente na pesca extrativista e na aquicultura, enquanto aproximadamente 600 milhões dependem economicamente do setor aquícola. Entretanto, o comércio internacional do setor enfrentou desafios significativos nos últimos anos, já que devido a pandemia da COVID-19 houve uma redução de 151 milhões de dólares em 2020, destacando a vulnerabilidade da cadeia global de suprimentos pesqueiros (Ximenes; Vidal, 2023; FAO, 2022).

A aquicultura possui grande potencial para a alimentação e nutrição da crescente demanda da população mundial, porém se faz necessário a busca por uma produção mais sustentável. Em 2020, o valor da produção aquícola mundial foi de 281.500 milhões de USD. A produção da aquicultura aumentou em todas as regiões exceto na África, devido ao descenso em países de maior produção, como Egito até 3,12% em 2020 e Nigéria de 0,51%. Em outros países do continente africano houve crescimento de 14,5% em comparação ao ano 2019. A Ásia continua na frente, dominando a aquicultura com 91,6% do total da produção nas estatísticas segundo FAO (2022).

Em 2020, o valor da produção aquícola mundial foi de 281,5 milhões de dólares. Apesar de seu crescimento em quase todas as regiões, houve declínio na África, especialmente em países como o Egito (redução de até 3,12% em 2020) e a Nigéria (redução de até 0,51%). Em contrapartida, outras nações africanas apresentaram um aumento de 14,5% em comparação ao ano de 2019. A Ásia, no entanto, continua a

dominar o setor, representando 91,6% da produção total, conforme apontado pela FAO (2022).

2.2 PRODUÇÃO BRASILEIRA DE PEIXES

O setor aquícola brasileiro tem registrado crescimento constante, alcançando uma produção de 860.355 toneladas em 2022, conforme dados da Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR, 2023). Nesse contexto, Ramos (2022) destaca que, apesar dos desafios impostos pela pandemia de COVID-19 entre 2020 e 2021, o Brasil conseguiu produzir 841.005 toneladas de peixes de cultivo, crescendo 2,3% em 2022 em relação ao ano anterior (Ramos, 2022; Peixe BR, 2023).

Segundo Medeiros (2023), o ano de 2022 foi marcado por oscilações significativas nos preços pagos aos produtores de tilápia. O primeiro semestre foi marcado por uma queda nos preços, o que resultou em uma redução na oferta e na produção de peixes no mercado. No entanto, a segunda metade do ano trouxe uma recuperação significativa, com um aumento considerável nos preços pagos aos produtores, especialmente entre os meses de agosto e dezembro. Esse período se destacou pela maior série histórica de remuneração semanal, demonstrando a capacidade de adaptação do mercado e a importância da tilápia na economia da aquicultura nacional (Medeiros, 2023; Ximenes; Vidal, 2023).

Paralelamente a essa oscilação nos preços, o aumento dos custos de produção também representou um impacto para todas as cadeias de proteína animal, incluindo a piscicultura. O custo da ração, que é o maior gasto na cadeia de produção, sofreu altas significativas, afetando diretamente as margens de lucro dos produtores (Peixe BR, 2023).

Apesar desses desafios, o Brasil segue apresentando números positivos. Em 2022, o país registrou uma produção de 887.029 toneladas de peixes de cultivo, marcando um crescimento de 3,1% em relação ao ano anterior (Silva, 2023). Esse resultado reflete os esforços contínuos da indústria e das associações de piscicultura para fortalecer e valorizar a cadeia produtiva, consolidando o Brasil como um dos principais atores no mercado de peixe de cultivo. No entanto, a participação do Brasil nas exportações de peixe de cultivo ainda é limitada, o que implica que grande parte da produção seja direcionada ao consumo interno. Atualmente, o consumo médio per capita no país é de

4,35 kg de peixe por ano, o que demonstra um mercado interno robusto, com grande potencial de crescimento nos próximos anos (Santos, 2023; Peixe BR, 2023; Dos Santos *et al.*, 2023).

2.3 A TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia, pertencente à família Cichlidae e cientificamente denominada *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758, é originária do continente africano (Figura 1). Seu cultivo teve início no o Egito Antigo, sendo reconhecida historicamente pelo confinamento e criação no rio Nilo. Trata-se de um animal diurno, que, em seu estado selvagem, habita uma ampla gama de ambientes aquáticos, tanto lânticos quanto lóticos, incluindo rios caudalosos.

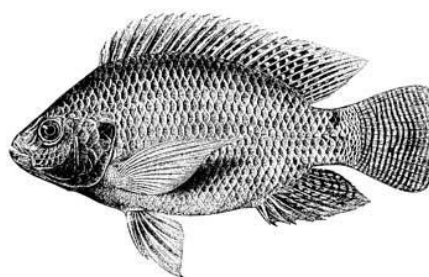


Figura 1 - Espécie *Oreochromis niloticus*. Fonte: Adaptado de FAO (2005-2024).

A espécie é onívora, alimentando-se de fitoplâncton, pequenos invertebrados flutuantes, fauna bentônica e cepas bacterianas presentes nos detritos. As fêmeas são ovíparas e possuem a característica de realizar a incubação bucal dos ovos após a desova (Gonzáles, 2023). A classificação taxonômica dessa espécie, conforme descrita por Linnaeus (Tabela I).

167

Tabela I - Taxonomia da tilápia do Nilo

Categoria	Descrição
Reino	Animalia
Filo	Chordata
Classe	Actinopterygii
Ordem	Perciformes
Família	Cichlidae
Gênero	<i>Oreochromis</i>
Espécie	<i>Oreochromis niloticus</i>

168

Fonte: Adaptado de Linnaeus (1758).

169

170 A *O. niloticus* mais conhecida como tilápia, é um membro significativo da
171 família Cichlidae. Anatomicamente, espécie distingue-se pela coloração cinzenta em sua
172 região dorsal, que gradualmente desbota para tons rosados nas laterais, sendo marcada
173 por 7 a 12 listras verticais escuras na nadadeira caudal. Além disso, apresenta um evidente
174 dimorfismo sexual, com as fêmeas geralmente menores do que os machos, especialmente
175 em relação ao comprimento da nadadeira caudal. Durante o período reprodutivo, as
176 nadadeiras da espécie adquirem tonalidades avermelhadas, o que reforça seu caráter
177 sazonal (Hernandez *et al.*, 2014).

178 No que se refere à sua morfologia, a espécie apresenta um corpo comprimido
179 lateralmente, e a profundidade de seu pedúnculo caudal é proporcional ao comprimento
180 do corpo. Suas escamas são cicloides, e a superfície dorsal do focinho não apresenta
181 saliência. A mandíbula superior, em termos de comprimento, não apresenta diferenças
182 entre machos e fêmeas. O primeiro arco branquial contém entre 27 e 33 filamentos
183 branquiais, e a linha lateral é interrompida. Já a nadadeira anal possui espinhos macios e
184 rígidos contínuos, contando com três espinhos e 10 ou 11 raios. A nadadeira caudal é
185 truncada, enquanto a dorsal se caracteriza por uma série de linhas pretas e espinhos rígidos
186 (FAO, 2024).

A introdução da tilápia do Nilo em diversos países, com climas que variam do tropical ao temperado, nas últimas cinco décadas, ressalta sua importância econômica e ecológica. Sua disseminação global é atribuída à significativa contribuição para a produção de alimentos, controle da flora aquática, atividades pesqueiras e utilização como organismo modelo em pesquisas científicas (González, 2023). É notório que o aumento da escalada na criação da tilápia, e a crescente demanda pelo seu consumo, está diretamente associada às suas características favoráveis, como a ausência de espinhas intramusculares, facilidade de filetagem, sabor agradável e preço acessível, fatores que a tornam altamente valorizada no mercado consumidor (Lisboa, 2021).

Quanto à viabilidade econômica, a produção de tilápias é particularmente rentável em países de clima tropical e subtropical, cujas condições térmicas favorecem o desenvolvimento da espécie. Nesses locais, os custos de produção situam-se entre 0,55 e 0,65 USD/kg, valores competitivos no comércio internacional, especialmente com os Estados Unidos, o maior importador da espécie. Em 2004, os EUA importaram cerca de 227.300 toneladas de tilápia, incluindo peixes inteiros congelados, filés frescos e congelados. Em contrapartida, em países de clima temperado, os custos de produção tornam-se proibitivos, dificultando a competitividade nesses mercados (FAO, 2024).

No cenário brasileiro, a piscicultura é uma das atividades de produção animal que mais cresce, destacando-se como importante fonte de geração de renda, empregos e segurança alimentar. Em 2021, a produção nacional cresceu 18,71% em relação a 2020, saltando de 71.512 para 84.893 toneladas. A piscicultura em águas da União representou 15,19% da produção nacional de peixes, que totalizou 559 mil toneladas, gerando um valor aproximado de R\$ 4,7 bilhões. A região Sul é a maior produtora de peixes em cativeiro no país, contribuindo com 35,42% da produção, enquanto as demais regiões participam com índices entre 13% e 18% (Ximenes; Vidal, 2023).

Vale ressaltar que, dentre as espécies cultivadas no Brasil, a tilápia se destaca como a mais representativa, concentrando 64,63% da produção nacional, o que equivale a 351 mil toneladas. Além disso, é a espécie mais remunerada, gerando R\$ 2,75 bilhões, correspondendo a 54,47% da renda total da piscicultura. Esses números refletem o excelente desempenho da tilápia nos diferentes sistemas de produção e ambientes do país. A facilidade no manejo nutricional e reprodutivo também favorece sua ampla disseminação e consolidação como espécie-chave para a aquicultura brasileira (Ximenes; Vidal, 2023).

2.4 O USO DE ADITIVOS NA NUTRIÇÃO DAS TILÁPIAS

A produção de peixes em sistemas intensivos, caracterizada por alta densidade de estocagem, pode levar a alterações significativas na qualidade da água. Esse cenário contribui para o aumento de material orgânico e, conseqüentemente, para a elevação dos níveis de nitrogênio amoniacal, sulfatos e ureia. Esses elementos favorecem a colonização de microrganismos, como bactérias e fungos, intensificando o processo de eutrofização. Tal condição resulta em maior concentração de CO₂ e aumento na demanda por oxigênio, devido à elevada carga bacteriana, que, além de consumir o oxigênio dissolvido, emite gases metabólicos próprios (De Souza, 2023).

Além disso, o manejo intensivo e o transporte frequente dos peixes podem induzir ao estresse, acarretando implicações negativas no desempenho produtivo. A utilização de antibióticos e vacinas, embora contribua temporariamente para a imunidade, pode levar ao desenvolvimento de patógenos mais resistentes, dificultando o controle de doenças no longo prazo. Esses desafios enfatizam a necessidade de abordagens alternativas para a saúde e o manejo dos peixes (De Souza, 2023).

Nesse contexto, o uso de aditivos alimentares surge como uma estratégia profilática promissora na aquicultura. Compostos bioativos como flavonoides, terpenoides, alcaloides, saponinas e esteroides apresentam propriedades imunoestimulantes, fortalecendo o sistema imunológico dos peixes e aumentando sua resistência inata e adquirida contra patógenos. Esses aditivos, geralmente derivados de fontes naturais, também têm sido associados à melhoria geral da saúde dos peixes quando incorporados à dieta (De Souza, 2023; Sapuri, 2014).

De acordo com De Souza (2023), o uso de imunoestimulantes contribui significativamente para a melhoria do desempenho produtivo, reduzindo o estresse e aumentando a resistência às doenças. Além disso, esses compostos promovem uma melhor saúde gastrointestinal, otimizando a absorção de nutrientes da ração e, conseqüentemente, favorecendo o crescimento e o desenvolvimento dos peixes. Dessa forma, o estudo e a aplicação de aditivos alimentares alternativos aos antibióticos se mostram cada vez mais essenciais para a sustentabilidade e o avanço da piscicultura moderna.

Pesquisas realizadas por Sapuri (2014) e Sakthivel *et al.* (2015) destacam a macroalga *Kappaphycus alvarezii* como uma alternativa viável para a nutrição de peixes. Além disso, ela é rica em polissacarídeos, flavonoides, taninos, saponinas e desempenha funções antibacterianas importantes, como a inibição da síntese proteica de bactérias, o que contribui para uma aquicultura mais segura e sustentável.

Segundo Erwin (2015), a *K. alvarezii* representa uma opção imunológica para promover a sobrevivência de tilápias por meio da alimentação, mas não como ingrediente proteico. Tilápias alimentadas com a dieta controle, que incluía farinha de peixe, apresentaram, segundo os resultados da pesquisa, taxa de crescimento específico diário de $0,94 \pm 0,14\%$, enquanto aquelas alimentadas com uma dieta contendo 5% de *K. alvarezii* alcançaram $0,52 \pm 0,17\%$. Observou-se redução acentuada na taxa de crescimento à medida que a concentração de *K. alvarezii* aumentava, atingindo $0,06 \pm 0,04\%$ com a inclusão de 20% dessa macroalga. A conversão alimentar foi melhor na dieta controle ($0,31 \pm 0,02$) e menos eficiente no tratamento com 20% de *K. alvarezii*, que alcançou $0,45 \pm 0,03$.

Quanto à sobrevivência, o controle apresentou o melhor resultado de $80,00 \pm 0,00\%$, seguido pelo tratamento com 5% de *K. alvarezii*, que registrou $76,67 \pm 0,06\%$, e pelo tratamento com 20%, que demonstrou $63,33 \pm 0,06\%$. Dessa forma, os dados revelam que o controle foi significativamente superior em comparação aos tratamentos com maiores concentrações de *K. alvarezii*. Testes estatísticos confirmaram que a sobrevivência no controle diferiu de forma significativa em relação aos demais tratamentos, conforme relatado por Erwin (2015).

Adicionalmente, no estudo realizado Erwin (2015), a tilápia foi alimentada com diferentes proporções de farinha de *K. alvarezii*, em substituição parcial à farinha de peixe. O tratamento controle não incluía farinha de algas, enquanto as dietas experimentais apresentavam concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% de farinha de *K. alvarezii*. Os resultados mostraram que o desempenho inicial foi mais promissor com a inclusão de 5% de farinha de macroalga, alcançando uma taxa de sobrevivência de 76,7%. Contudo, à medida que a proporção de farinha de macroalga aumentava, observou-se uma redução progressiva tanto no desempenho quanto na sobrevivência dos peixes, indicando maior dificuldade no aproveitamento das dietas com concentrações superiores de *K. alvarezii*.

Vale ressaltar, que alternativas como a farinha de insetos também têm ganhado destaque na substituição da farinha de peixe. Rapatsa *et al.* (2016) demonstraram que a farinha da lagarta mopane (*Imbrasia belina*), rica em proteínas e amplamente disponível em países africanos, pode substituir até 60% da farinha de peixe na dieta de tilápias, oferecendo um perfil nutricional equilibrado e alta digestibilidade.

Além disso, estudos recentes, como o de Rehan *et al.* (2024), investigaram a eficácia do óleo de orégano como suplemento alimentar na dieta da tilápia do Nilo. Quando administrado em proporção de 10 ml/kg de ração durante 28 dias, o óleo promoveu melhorias significativas na imunidade dos peixes, especialmente ao enfrentar patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*. Outros óleos essenciais, como o de *Panax ginseng* e de coentro (*Coriandrum sativum*), também demonstraram potencial em intensificar a resposta imunológica e aumentar a resistência contra doenças bacterianas, como a causada por *Aeromonas hydrophila*.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DO USO DA MACROALGA *Kappaphycus alvarezii*

A macroalga *K. alvarezii*, pertencente ao grupo das algas *Rhodophyta*, é composta por organismos multicelulares, não vasculares e fotossintéticos que contêm clorofila. Sua estrutura reprodutiva simples e composição química variam de acordo com a espécie, o *habitat* e as condições ambientais. Há registros de que, há mais de 14 mil anos, o ser humano se beneficia dessas algas, utilizando-as como alimento, medicamento e como um componente essencial na aquicultura multitrófica integrada (Lisboa, 2021).

Entre as diversas aplicações comerciais da *K. alvarezii*, destaca-se a produção de carragenana, um hidrocoloide de elevado valor econômico. De acordo com Webber *et al.* (2010), a carragenana é composta por galactanas naturais extraídas de algas vermelhas, sendo constituída por polissacarídeos de alto peso molecular que incluem unidades repetidas de galactose e 3,6-antidrogalaactose unidas por ligações glicosídicas, conhecidas como carragenanas α -(1-3) e β -(1-4). Juntamente com os alginatos e agares, as carragenanas integram o grupo dos ficocolóides, que são substâncias biopoliméricas complexas de grande relevância industrial (Webber *et al.*, 2010). Além de seu uso como fonte de carragenana, a *K. alvarezii* também possui propriedades imunoestimulantes que têm sido amplamente investigadas em estudos recentes. Conforme Polese (2021), essa

315 alga demonstra eficácia na promoção da saúde de peixes em cultivos, destacando-se como
316 uma alternativa promissora para melhorar a sobrevivência e o bem-estar dos peixes.

317 No âmbito da preservação e prolongamento da vida útil do pescado, Sapuri
318 (2014) enfatiza a importância de encontrar alternativas naturais aos conservantes
319 sintéticos, especialmente em razão das crescentes preocupações com a segurança
320 alimentar. Ingredientes naturais, como os compostos presentes na *K. alvarezii*, possuem
321 propriedades antibacterianas e antioxidantes que inibem o crescimento de
322 microrganismos prejudiciais, tornando-os mais seguros para o consumo humano.

323 Complementando essa perspectiva, pesquisas conduzidas por Nagarani;
324 Kumaraguru (2013) e Prabha *et al.* (2013) identificaram compostos bioativos, como
325 alcaloides, flavonoides, esteroides e taninos, nas algas vermelhas, confirmando suas
326 propriedades antimicrobianas. Os flavonoides, por exemplo, atuam formando complexos
327 com proteínas extracelulares, dissolvendo membranas celulares bacterianas e interferindo
328 na síntese de DNA e RNA, como destacado por Cushnie; Lamb (2005) e Sapuri (2014).
329 Os taninos, segundo Siregar *et al.* (2012), apresentam um mecanismo de ação baseado na
330 interação entre a polaridade dos lipídios da célula bacteriana e os grupos hidroxila. Essa
331 interação causa danos às membranas celulares e alterações na permeabilidade celular,
332 resultando na morte bacteriana (Ajizah, 2004). De maneira similar, os esteroides
333 presentes na *K. alvarezii* demonstram potencial antibacteriano, conforme os estudos de
334 Siregar *et al.* (2012) e Sapuri (2014). Esses compostos interferem na síntese de proteínas
335 bacterianas ao se acumularem e alterarem os constituintes da célula bacteriana, resultando
336 na interrupção do crescimento e, eventualmente, na morte das bactérias.

337 Seguindo com os estudos de Sapuri (2014), os compostos alcaloides, por sua
338 vez, atuam no peptidoglicano da parede celular bacteriana, impedindo sua formação
339 completa e causando lise celular. Esses compostos, ricos em nitrogênio, interagem com
340 aminoácidos da parede celular e com o DNA bacteriano, promovendo danos irreversíveis
341 às células. Por último, as saponinas, de acordo com Ngajow *et al.* (2013) se assemelham
342 ao sabão, por serem compostas por fortes ativos que causam espuma quando esfregados
343 na água. Elas se destacam por sua ação ativa, que reduz a tensão superficial da membrana
344 celular, resultando em vazamentos intracelulares e no rompimento das membranas. Essa
345 característica faz com que elas sejam amplamente utilizadas como agentes
346 antimicrobianos em diversas aplicações (Sapuri, 2014; Ngajow *et al.*, 2013).

Diante do cenário de aumento na demanda por ingredientes para rações, Polese (2019) ressalta que a farinha de peixe, amplamente empregada como fonte de proteína na aquicultura, possui alto valor nutritivo, mas seu elevado custo tem impulsionado a busca por alternativas viáveis e sustentáveis. Nesse contexto, a *K. alvarezii* se apresenta como uma solução promissora, unindo benefícios econômicos e biológicos.

2.6 RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS NA TILAPICULTURA

A tilápia do Nilo tornou-se amplamente conhecida em praticamente todo o território brasileiro, consolidando-se como a espécie de destaque na aquicultura nacional (Kubitza, 2004). De acordo com Scorvo-Filho *et al.* (2010), o Brasil ocupa uma posição relevante como fornecedor de frutos do mar no mercado global, aproveitando suas condições aquáticas e ambientais favoráveis para expandir a produção, ao mesmo tempo em que busca evitar os erros ambientais observados em outras regiões (Guimarães, 2011).

Pode-se afirmar que a popularidade da tilápia deve-se, principalmente, à sua alta qualidade como alimento, sendo reconhecida como uma excelente fonte de nutrição em diversas partes do mundo (Ranzani-Paiva *et al.* 2004). No entanto, desafios relacionados ao transporte e à qualidade da água têm aumentado os riscos à saúde desses peixes, resultando em maior estresse e maior susceptibilidade a doenças.

Os sistemas intensivos de criação, amplamente utilizados na piscicultura, caracterizam-se por altos rendimentos por unidade de área, controle alimentar rigoroso e monitoramento constante das condições sanitárias. Apesar das vantagens produtivas, esses sistemas frequentemente expõem os peixes a altas densidades populacionais, o que pode intensificar o estresse e comprometer o desempenho dos animais (Lima *et al.*, 2006; Guimarães, 2011). Estudos revelam que alterações nos níveis de proteína nas dietas podem influenciar parâmetros hematológicos, embora não tenham identificado prejuízos significativos ao sistema imunológico dos peixes (Guimarães, 2011).

Nesse contexto, investigações recentes têm buscado alternativas para mitigar o impacto de patógenos na tilápia. Segundo Rehan *et al.* (2024), foram conduzidos experimentos envolvendo a inclusão de óleo de *Origanum vulgare* e florfenicol na dieta de tilápias, as quais foram desafiadas com *Pseudomonas aeruginosa*. Nas observações, constatou-se que as taxas de mortalidade foram elevadas, especialmente no grupo

379 controle, que não recebeu o óleo de *Origanum vulgare*. Este grupo, assim como os grupos
380 tratados com diferentes concentrações de óleo, também foi desafiado com *Pseudomonas*
381 *aeruginosa*. Apesar de haver mortalidade em todos os grupos, esta foi significativamente
382 menor nos que receberam o óleo de *Origanum vulgare* e florfenicol, em comparação com
383 o grupo controle. Além disso, foram observadas diferenças na contagem de leucócitos
384 entre os grupos avaliados (controle, óleo de *Origanum vulgare*, florfenicol e a
385 combinação de ambos). Os grupos tratados com óleo de *Origanum vulgare* e com a
386 combinação de óleo de *Origanum vulgare* e florfenicol apresentaram um aumento no
387 número de neutrófilos, enquanto o grupo controle apresentou uma quantidade menor
388 dessas células, evidenciando uma possível influência positiva dos tratamentos sobre a
389 resposta imunológica das tilápias.

390 De forma complementar, Ali *et al.* (2021) avaliaram o efeito da cefotaxima
391 sódica no tratamento de tilápia do Nilo infectadas com *P. aeruginosa*. A administração
392 intraperitoneal do antibiótico resultou na menor taxa de mortalidade entre os grupos
393 analisados, destacando-se como uma alternativa eficaz no manejo de doenças subclínicas
394 e na proteção de peixes saudáveis. Além disso, parâmetros fisiológicos, como níveis de
395 creatinina, ureia e ácido úrico, apresentaram melhorias significativas, reforçando a
396 eficácia do tratamento.

397 No que diz respeito às respostas fisiológicas ao estresse, peixes submetidos a
398 situações adversas demonstram liberação de cortisol e adrenalina, decorrentes da ativação
399 do eixo hipotalâmico-pituitário-interrenal e do sistema simpático-cromafim (Okamura *et*
400 *al.*, 2007). Esses hormônios são marcadores primários do estresse e podem impactar
401 diretamente a saúde e o desempenho dos animais.

402 Nesse cenário, a análise hematológica em peixes torna-se uma ferramenta
403 fundamental para investigar as respostas fisiológicas a doenças e condições adversas.
404 Ranzani-Paiva *et al.* (2004) destacam a importância de estudos hematológicos para
405 compreender a interação entre os estados de saúde e os desafios impostos por patógenos.
406 Examinar os elementos sanguíneos e suas funções fornece informações valiosas sobre o
407 bem-estar dos peixes e contribui para o desenvolvimento de estratégias eficazes no
408 manejo sanitário (Azevedo *et al.*, 2006; Guimarães, 2011).

409

410

2.7 *Pseudomonas aeruginosa*

Descrita inicialmente por Schroeter em 1972, a *Pseudomonas aeruginosa* é um membro da ordem Pseudomonadales, pertencente à família Pseudomonadaceae e ao gênero *Pseudomonas* (Özen, 2012; Gonçalves; Goulart, 2021). Essa bactéria é caracterizada como um bacilo Gram-negativo cuja membrana externa é composta por proteínas, lipopolissacarídeos e fosfolipídios (Liang *et al.*, 2011; Gonçalves; Goulart, 2021).

É importante ressaltar que se trata de um microrganismo estritamente aeróbico, não esporulado, que pode ser encontrado sob a forma de células isoladas, em pares ou em cadeias curtas. Possui um flagelo polar monotríquio que lhe confere mobilidade (Gonçalves; Goulart, 2021). Essa característica, associada à sua estrutura e metabolismo, reforça sua adaptabilidade. Além disso, a *P. aeruginosa* se destaca por sua capacidade de produzir pigmentos fluorescentes, como pioverdina, piocianina, piorrubina e piomelanina, que auxiliam na identificação das espécies desse gênero bacteriano (Mandell *et al.*, 2000; Gonçalves; Goulart, 2021).

Metabolicamente, a *P. aeruginosa* não fermenta carboidratos, mas apresenta uma série de atividades enzimáticas, como a produção de citocromo-oxidase, arginina desidrolase e ornitina descarboxilase. Além disso, em condições anaeróbicas, é capaz de utilizar nitrato como substituto do oxigênio (Arai, 2011; Daddaoua *et al.*, 2009). Essa versatilidade metabólica, aliada à ampla distribuição geográfica, caracteriza a espécie como um patógeno oportunista, sendo a mais virulenta do gênero devido a fatores como a produção de fímbrias para aderência às células hospedeiras, síntese de polissacarídeos (alginato), produção de toxinas extracelulares e presença de lipopolissacarídeos (LPSs), que atuam como endotoxinas (Mayhall, 1996; Gonçalves; Goulart, 2021).

Com distribuição cosmopolita, a *P. aeruginosa* integra a microbiota normal de plantas e animais e pode causar infecções tanto em indivíduos na comunidade quanto em ambientes hospitalares (Murray, 1999; Fuentefria, 2008). Em especial, ambientes hospitalares frequentemente abrigam cepas multirresistentes, capazes de causar desde infecções superficiais na pele até quadros graves, como sepse fulminante (Murray, 1999; Gonçalves; Goulart, 2021).

Pupo (2006), afirma que os sistemas de criação intensiva de peixes caracterizam-se pelo fornecimento controlado de ração e pela alta densidade de estocagem nos tanques, com o objetivo de otimizar o processo produtivo. Um aspecto crucial nesse contexto é o uso de rações com altos níveis de proteína, especialmente para espécies carnívoras na fase de alevinos, em que a porcentagem de proteína bruta pode alcançar até 40%. Entretanto, o excesso de ração nos tanques de cultivo pode levar ao acúmulo de matéria orgânica dissolvida na água, o que cria um ambiente favorável ao desenvolvimento de microrganismos.

Ainda de acordo com Pupo (2006), esses sistemas também são descritos pelo arraçoamento e maior densidade de estocagem de peixes nos tanques, objetivando a otimização do processo produtivo. Nesse caso, se faz necessário notar que as rações para peixes podem contar com altos níveis de proteína; em espécies carnívoras na fase de alevinos, essa proteína bruta na ração pode chegar a até 40%. Essa dinâmica impacta diretamente a diversidade da microbiota, modulando-a em função das condições ambientais. O mesmo autor também salienta que a microbiota aquática estaria intimamente relacionada, tanto quantitativa quanto qualitativamente, aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do ambiente. Nesse cenário, bactérias dos gêneros *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas* e *Vibrio* destacam-se como os microrganismos mais adaptados ao ambiente aquático, contribuindo para a composição da microbiota típica desses sistemas de cultivo.

Esses microrganismos, integrantes da microbiota da água, pele, brânquias e intestino dos peixes, são considerados oportunistas. Assim, desequilíbrios nos sistemas bactéria-hospedeiro-ambiente podem resultar em epizootias. No caso específico da *P. aeruginosa*, a multirresistência está frequentemente associada à presença de enzimas específicas e a mutações, que podem ocorrer isoladamente simultaneamente (Köhler, 1999). Apesar disso, o controle e a eliminação de infecções por essa bactéria geralmente envolvem o uso de fármacos pertencentes aos grupos dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, polimixinas e fluoroquinolonas (Tortas, 2009; Gonçalves; Goulart, 2021).

2.8 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS PARA A SAÚDE DOS PEIXES

Sabe-se que a intensificação da produção aquícola pode acarretar problemas sanitários, como a má qualidade da água, que é frequentemente composta por agentes estressantes capazes de provocar a depressão dos mecanismos de defesa do organismo dos peixes. Essa condição aumenta a susceptibilidade dos animais a diferentes doenças, resultando em perdas significativas na produção (Guimarães, 2021).

De acordo com Guimarães (2021), as avaliações hematológicas baseiam-se em pesquisas realizadas em diferentes condições dentro de uma área geográfica específica. Nessas análises, observa-se que os peixes criados em tanques-rede, situados em represas ou áreas extensas como lagoas, apresentam condições naturais mais favoráveis, com constante troca de oxigênio e outros elementos essenciais. Em contrapartida, em tanques escavados, os peixes aumentam o número de hemácias como uma adaptação para otimizar a absorção de oxigênio na água. Além disso, há um aumento nos leucócitos, uma vez que as condições do ambiente, incluindo a temperatura da água, o espaço limitado e a presença de matéria orgânica, impactam de forma significativa, exigindo uma resposta imunológica mais robusta para que os peixes possam crescer de maneira saudável (Guimarães, 2021).

Ao avaliar o rendimento do crescimento dos peixes por área de cultivo, o controle da alimentação destaca-se como um fator essencial para a observação sanitária em sistemas de cultivo intensivo. Muitas atividades relacionadas ao manejo, manuseio e transporte dos peixes podem causar estresse, elevando o risco de infecções por patógenos oportunistas. Além disso, dietas com altos níveis de proteína, embora fundamentais para o crescimento, podem alterar variáveis hematológicas sem necessariamente favorecer o sistema imunológico dos peixes (Okamura *et al.*, 2007).

Os dados hematimétricos, amplamente utilizados em cuidados médicos de humanos e mamíferos domésticos, têm se tornado uma prática cada vez mais comum em animais de produção, como na tilapicultura. O estudo hematimétrico é reconhecido como uma ferramenta importante para o diagnóstico de doenças, especialmente quando combinado com análises histopatológicas. As técnicas utilizadas em mamíferos vêm sendo adaptadas e aplicadas aos peixes, com modificações que permitem avaliar tanto a produção quanto o estado de saúde das populações em criação (Ishikawa *et al.*, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 APROVAÇÃO CEUA

A referida pesquisa foi aprovada pela comissão de Ética de Uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), conforme o protocolo N° 034/2023, no dia 22/11/2023.

3.2 ANIMAIS E INFRAESTRUTURA

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos–AQUANUT, com duração de 75 dias, no município de Ilhéus, Bahia, Brasil (latitude 14° 47' 20" S, longitude 39° 02' 58" W). Foram utilizados 374 juvenis de tilápia do Nilo, provenientes do Laboratório Aguavale Piscicultura S.A., localizado em Ituberá-BA. Esses peixes foram inicialmente distribuídos em quatro tanques de quarentena, com capacidade de 1 m³ cada, onde permaneceram por 15 dias. O sistema utilizado foi de recirculação de água, equipado com filtro biológico e aeração forçada. Durante esse período, os peixes foram alimentados com ração comercial contendo 32% de proteína bruta, com granulometria de 1,6 mm, fornecida três vezes ao dia, nos horários de 8h, 12h e 16h.

Para a execução do ensaio biológico, foram montados 20 tanques circulares com capacidade de 310 L cada, sendo cada tanque considerado uma unidade experimental. Foram selecionados 240 peixes, os quais foram padronizados em relação ao peso ($185 \pm 5,87$ g) e distribuídos nas 20 unidades experimentais, na densidade de 12 peixes por tanque.

O sistema de recirculação de água utilizado no experimento contou com uma bomba de 1 CV em cada conjunto de 10 unidades experimentais, enquanto a drenagem da água foi realizada por gravidade, utilizando canaletas que conduziam o fluxo até um biofiltro, responsável pela retenção de compostos orgânicos. Cada tanque foi equipado com difusores de ar acoplados a um soprador de 0,75 CV, garantindo adequada aeração.

Para manutenção, os tanques foram limpos semanalmente por meio de drenagem, com o objetivo de remover o excesso de resíduos sólidos acumulados.

3.3 QUALIDADE DA ÁGUA

O monitoramento da qualidade da água foi realizado ao longo de todo o período experimental, com medições feitas diariamente às 8h e às 17h. Para isso, utilizou-se um equipamento multiparâmetro *YSI Professional Plus*, que permitiu registrar os valores de temperatura ($27,51 \pm 0,14^{\circ}\text{C}$), oxigênio dissolvido ($3,57 \pm 0,36 \text{ mg L}^{-1}$) e pH ($8,47 \pm 0,22$). Esses parâmetros foram considerados adequados para a criação de Tilápia do Nilo, conforme estabelecido por Furuya *et al.* (2013) e Furuya *et al.* (2005).

A concentração de amônia total ($0,2633 \pm 0,27 \text{ NH}_3$) e nitrito ($0,85 \pm 0,43$) foi medida semanalmente, utilizando um *kit* colorimétrico portátil fornecido pela (Alcon Ltda). Esses procedimentos garantiram o acompanhamento rigoroso das condições ambientais, fundamentais para o bem-estar e o desempenho dos peixes durante o experimento.

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental seguiu um modelo inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos com níveis crescentes de inclusão de farinha de *Kappaphycus alvarezii* (0,50%; 1,00%; 1,50% e 2,00%), além de um tratamento controle, isento do aditivo. Os tratamentos foram identificados de acordo com a inclusão da farinha de *K. alvarezii* nas dietas, sendo denominados: *Kappa* 0,00 (Controle), *Kappa* 0,50, *Kappa* 1,00, *Kappa* 1,50 e *Kappa* 2,00.

A farinha da macroalga *K. alvarezii* utilizada no experimento foi fornecida pela empresa Phycus Carbon Free - SP. As dietas experimentais foram formuladas como isoenergéticas e isonitrogenadas, utilizando o *software Super Crac*[®], com base nas exigências nutricionais da tilápia do Nilo descritas por Furuya *et al.* (2005). A formulação foi fundamentada no conceito de proteína ideal (Tabela II).

Tabela II - Dietas experimentais fornecidas a juvenis de tilápia do Nilo, com diferentes concentrações da farinha de *Kappaphycus alvarezii*

Ingrediente	Inclusão de Farinha de <i>Kappaphycus alvarezii</i> (g/kg)				
	Kappa 0,00	Kappa 0,50	Kappa 1,00	Kappa 1,50	Kappa 2,00
Fubá de milho	29,13	28,51	27,88	27,26	26,63
Farelo de soja 45%	29,81	30,03	30,24	30,45	30,67
Farinha de penas	7,34	7,33	7,32	7,31	7,29
Far. da alga <i>K. alvarezii</i> ^c	0,00	0,50	1,00	1,50	2,00
Farinha de carne osso 45%	18,37	18,26	18,16	18,09	17,94
DL- metionina	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
L-lisina HCL ^a	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
L-treonina ^a	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24
Óleo de soja	2,78	2,83	2,88	2,93	2,99
Premix vitamínico-mineral ^b	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Sal comum	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Composição química analisada (%)					
Proteína bruta	32,58	32,26	32,39	32,28	32,20
Extrato etéreo	7,33	8,59	8,43	9,62	9,60
Matéria seca	88,87	90,14	91,41	91,45	89,26
Matéria mineral	9,23	9,98	9,87	10,28	9,50

a) L-lisina, L-treonina, DL-metionina (CJ Bio, São Paulo, SP, Brasil).

b) Premix de vitaminas e minerais (composição química analisada/ kg do produto): sulfato de cobalto = 0,0130 mg; iodato de cálcio = 0,0210; vitamina B12 = 0,0375 mg; ácido fólico = 0,0520 mg; vitamina K3 = 0,0980 mg; vitamina D3 = 0,2050 UI; vitamina B6 = 0,3750 mg; biotina = 0,3750 mg; vitamina B1 = 0,3830 mg; vitamina B2 = 0,4690 mg; pantotenato de cálcio = 0,5270 mg; sulfato de cobre = 0,6000 mg; niacina = 1,0210 mg; óxido de zinco = 1,5000 mg; sulfato de manganês = 2,4040 mg; vitamina E = 4,0000 mg; sulfato de ferro = 4,1670; avila SE = 5,0000; vitamina C = 8,5720 mg; diluente básico = 25,0130; cloreto de colina = 29,1670 mg. Fonte: Elaborado pelo autor

3.4.1 PREPARAÇÃO DAS DIETAS E MANEJO ALIMENTAR

A confecção das dietas experimentais seguiu um processo cuidadoso. Primeiramente, os ingredientes foram moídos, pesados e misturados em um misturador circular, conforme as formulações das dietas. A extrusão das dietas foi realizada na Fábrica de Ração da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), utilizando uma matriz de 1,8 mm. Após a extrusão, as dietas passaram por um processo de secagem em estufa com ventilação forçada, a uma temperatura de 55°C, durante 24 horas. Em seguida, as dietas foram embaladas em recipientes individuais, devidamente identificados conforme os tratamentos, e armazenadas em refrigerador.

Para a alimentação, cada unidade experimental foi associada a um pote próprio, devidamente identificado com o número do tanque ao qual pertenciam, sendo a tampa mantida fechada. Os peixes foram alimentados manualmente três vezes ao dia, nos horários de 8h, 12h e 16h, até atingir a saciedade aparente em todo o período experimental.

3.4.2 VARIÁVEIS DE DESEMPENHO ZOOTÉCNICO

As biometrias foram realizadas no início e ao final do experimento (60 dias). Antes da coleta de dados, os peixes passaram por um período de 24 horas de jejum, para o esvaziamento do trato gastrointestinal. Todos os peixes de cada unidade experimental foram pesados e medidos individualmente, utilizando-se balança digital para o peso e ictiômetro para as medidas longitudinais. Além disso, foi realizado um monitoramento diário, incluindo a remoção de animais mortos, para contabilizar as mortes e ajustar a dieta fornecida conforme necessário.

Os dados associados ao consumo de dieta durante o período experimental foram usados para calcular as variáveis de desempenho de crescimento, conforme as seguintes equações abaixo:

- Ganho de Peso (g) = peso final – peso inicial
- Consumo de Dieta = Conversão Alimentar x Biomassa Total
- Conversão Alimentar = Consumo de Dieta / Biomassa Total
- Taxa de Crescimento Específico (% por dia) = $\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial}) \div \text{dias} \times 100$
- Sobrevivência (%) = $(\text{N}^\circ \text{ de peixes final} - \text{N}^\circ \text{ de peixes inicial}) \times 100$

3.5 ANÁLISES LABORATORIAIS

Para a coleta de sangue, ao final dos 60 dias de desempenho, os peixes foram insensibilizados em solução de Eugenol líquido (50 mg/L). Em seguida, foram manuseados com o uso de luvas cirúrgicas e pano úmido, para a coleta das amostras de sangue pela veia caudal, utilizando uma seringa de 1 ml e agulha de calibre 24.

As amostras de sangue foram distribuídas em dois tubos diferentes: um contendo EDTA, para evitar a coagulação e realizar a primeira contagem de glóbulos brancos; e outro tubo sorológico, sem anticoagulante, que foi encaminhado ao Essência Laboratório (Ilhéus-Ba) para análises de proteína total, glicemia, colesterol e triglicerídeos, realizadas no equipamento automatizado de bioquímica URIT-8031.

A contagem dos leucócitos foi feita imediatamente antes da coagulação do sangue nos tubos com EDTA. Após a transferência para o laboratório de análises clínicas, procedeu-se à obtenção de amostras para leitura em lâminas de vidro, em esfregaço, com o objetivo de contar os glóbulos brancos e determinar sua quantidade após o desempenho. A contagem foi realizada na câmara de Neubauer, permitindo a primeira leitura das amostras dos peixes que receberam a dieta controle e dos que receberam os diferentes tratamentos, para comparar os números de células defensivas em um estado pré-desafio.

Os mesmos dois peixes utilizados para a coleta de sangue foram também empregados para a extração de filés, os quais foram identificados e congelados para posterior secagem em estufa de ar forçado a 55°C por 24 horas, para realização das análises de composição química, conforme o método descrito pela AOAC (2016). Para a determinação da matéria seca, as amostras foram secas em estufa de circulação de ar forçado a 105°C por 24 horas. Para a análise de matéria mineral, utilizou-se mufla a 550°C por 4 horas, no Laboratório de Nutrição Animal da UESC.

As análises de proteína bruta e extrato etéreo foram realizadas no Laboratório CBO Análises (Valinhos-SP), utilizando o método 45 e o método 12, respectivamente, conforme o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2017).

3.6 DESAFIO DA TILÁPIA À BACTÉRIA *Pseudomonas aeruginosa*

3.6.1 INFECÇÕES EXPERIMENTAIS

Para esta etapa, utilizou-se o patógeno bacteriano *Pseudomonas aeruginosa*, série ATCC 12903, obtido do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), como organismo teste. A patogenicidade da cepa foi previamente avaliada por meio de inoculação em tilápias, utilizando uma concentração de 8×10^7 UFC/ml, conforme descrito por Ali *et al.* (2021). Os peixes afetados foram coletados e imediatamente examinados para identificar a causa da morte. Além disso, avaliou-se a recuperação da cepa injetada nos peixes infectados experimentalmente, de acordo com os postulados de Koch. A coleta foi realizada em áreas específicas, como fígado, baço e cavidade celomática, seguindo critérios morfotintoriais e características de cultivo bacteriano.

A cultura da cepa bacteriana foi conduzida no Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário da UESC. Para a preparação do inóculo, as bactérias foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 37°C por 24 horas. Posteriormente, a concentração foi ajustada para alcançar a dose infectante necessária para o experimento. Após o tratamento imunizante com o ingrediente de *K. alvarezii* durante 60 dias, os peixes foram injetados com 10 µl de solução salina contendo *P. aeruginosa* série ATCC 12903, na dose média letal (DML) de 8×10^7 UFC/ml, conforme descrito por Ali *et al.* (2021).

Para o desafio bacteriano, cinco peixes de cada unidade experimental, provenientes do estudo zootécnico, foram utilizados. A injeção intraperitoneal foi realizada na região entre as nadadeiras pélvicas, posterior às junções ósseas e cartilaginosas, permitindo o acesso direto ao conteúdo celomático da região abdominal dos peixes (Figura 2). O monitoramento das mortes súbitas foi conduzido com observações contínuas nas primeiras 72 horas, a fim de registrar os efeitos do patógeno e a eficiência do tratamento imunizante.

Também foi realizada a dissecação dos peixes mortos para examinar as manifestações internas e coletar amostras de fígado, baço, intestino, rim cefálico e conteúdo celomático. O material coletado foi encaminhado ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), onde foram realizadas

análises bacteriológicas em placas de Petri. Por meio dessas análises, os órgãos comprometidos foram identificados e a bactéria responsável pela mortalidade dos peixes foi recuperada.



Figura 2 – Posicionamento do peixe para injeção intraperitoneal.¹

3.6.2 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA PÓS-DESAFIO

No 75º dia foi realizada a coleta de sangue de dois peixes de cada tratamento, por meio de punção da veia caudal, utilizando seringas de insulina, para cada unidade experimental. As amostras foram obtidas com o objetivo de realizar a contagem de leucócitos, indicadores do sistema imunológico inato. Para isso, utilizou-se seringas de insulina de 1 ml, e o procedimento de coleta de sangue foi concluído em aproximadamente um minuto. O sangue coletado foi armazenado em tubos contendo EDTA e, em seguida, encaminhado para análises clínicas destinadas à observação das células sanguíneas.

As análises foram realizadas imediatamente após a coleta, antes que ocorressem coagulação e perda das células de defesa. As observações foram feitas de duas maneiras: através da preparação de esfregaços em lâminas de vidro para microscopia e pela contagem celular utilizando uma câmara de *Neubauer*, possibilitando comparações das

¹ Fonte: Universidad de Oriente UDOE, Venezuela, Dr. Arnaldo Figueredo.

concentrações celulares antes e depois do desafio com *P. aeruginosa*. Além disso, os órgãos imunológicos, como baço, intestino e fígado, foram extraídos e fixados em solução de formol a 10% para análises histopatológicas. As amostras foram processadas no Laboratório de Histopatologia do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

3.6.3 CONTAGEM DE GLÓBULOS BRANCOS APÓS DESAFIO

Após os 60 dias de desempenho, foi testado o ingrediente na dieta contendo *K. alvarezii* e seus compostos bioativos. Decorridos quinze dias do desafio, realizou-se a extração de sangue por punção da veia caudal comum, utilizando seringas de insulina, para determinar a contagem total de leucócitos. Para essa análise, foram diluídos 200 µl de sangue em 2 ml de solução de *Natt-Herrick* modificada com azul de cresil, que facilitou a visualização das células e a localização do núcleo. Após a diluição, as amostras foram fixadas, coradas e submetidas à contagem em um hemocitômetro Neubauer.

Essa abordagem permitiu a obtenção da contagem total de células brancas, bem como a diferenciação e identificação dos diversos tipos de leucócitos. A técnica de esfregaço foi utilizada para essa diferenciação, seguida da fixação e coloração das lâminas com hematoxilina e eosina. Essas etapas possibilitaram a identificação dos leucócitos e a comparação entre os tratamentos. Após a extração do sangue, os peixes foram submetidos à eutanásia utilizando o anestésico Eugenol (100 mg/L) em uma caixa com capacidade de 50 litros, conforme o protocolo descrito por Lisboa (2021),

Para realizar a contagem total e diferencial de células, prepararam-se extensões de sangue por meio de esfregaços em lâminas de vidro, que foram secas ao ar livre. Em seguida, essas lâminas foram coradas utilizando o método de Rosenfeld (1947) e analisadas em microscópio óptico com aumento de 40x e a adição de óleo de imersão. Foram contabilizados os leucócitos totais, neutrófilos, monócitos, basófilos e eosinófilos. A quantificação foi feita em uma base de 100 células, permitindo representar 100% dos leucócitos por tratamento. Esses dados foram registrados em câmara Neubauer e, posteriormente, utilizados para estimar o número total de células, seguindo o método recomendado por Franco (2023).

3.7 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

As análises histopatológicas foram conduzidas conforme os protocolos descritos por Suvarna et al. (2018). Amostras menores que 5 cm foram retiradas do fígado, baço e do intestino, especificamente a 4,5 cm após o estômago, no intestino anterior (duas amostras por unidade experimental). Os tecidos coletados foram fixados em formol neutro tamponado a 10% e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Secções histológicas de 4 μm foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para a avaliação microscópica. As lâminas histológicas preparadas foram examinadas e fotografadas com o auxílio do microscópio Leica DM 2500, utilizando o software Leica LAS versão 3.8.

Na análise morfométrica do intestino anterior, foram avaliadas as vilosidades intestinais em cada corte histológico, considerando o número de vilosidades, o comprimento (μm), a largura (μm), o número de células caliciformes e a área total (μm^2). Para medir o comprimento, a largura e as áreas das vilosidades, foi empregado o *software* ImageJ, garantindo precisão na análise morfométrica.

As alterações histológicas observadas em todos os cortes foram classificadas conforme o grau de intensidade, utilizando a seguinte escala: 0 (ausência de alteração), 1 (alteração leve, correspondendo a menos de 25% da área do tecido), 2 (alteração moderada, entre 25 e 30% da área do tecido), 3 (alteração grave, mais de 50% da área do tecido) e 4 (alteração pronunciada, com necrose e descamação do tecido). Essa categorização seguiu os métodos descritos por Pierce *et al.* (1978) e Schwaiger *et al.* (1997), com modificações propostas por Brum et al. (2018), Lisboa (2021) e Rapatsa; Moyo (2016).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Posteriormente, realizou-se a análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%. Para as avaliações dos testes de desafio, aplicou-se o teste de *Tukey* para comparar as médias e determinar os valores de p-value, enquanto o pacote *Psych* foi utilizado para calcular o desvio padrão. No caso dos dados provenientes dos testes bioquímicos do sangue, os resultados foram analisados pelo teste de Duncan, considerado mais específico e com maior capacidade de discriminação, complementando a análise realizada com o teste de *Tukey*. Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o *software* R Studio.

4. RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS

Os peixes apresentaram ganho de peso médio similar, atingindo 130,75 g, com uma taxa de crescimento específico de 0,89%. A espécie *Oreochromis niloticus* demonstrou estar fisiologicamente adaptada a dietas ricas em proteínas, sendo capaz de absorver e converter os compostos em carne e carcaça, alcançando conversão alimentar média de 1,48. Não foi observado efeito significativo ($P < 0,05$) da utilização de dietas com níveis crescentes de *K. alvarezii* sobre as variáveis analisadas (Tabela III).

Tabela III - Valores médios dos parâmetros de desempenho da tilápia do Nilo alimentada com dietas contendo níveis crescentes de farinha de *Kappaphycus alvarezii* por 60 dias

Variável	Inclusão de farinha de <i>Kappaphycus alvarezii</i> (g/Kg)					CV%	P-Value
	Kappa 0,00	Kappa 0,50	Kappa 1,00	Kappa 1,50	Kappa 2,00		
Peso inicial (g)	182,92	187,81	182,19	189,58	184,90	3,16	0,8508
Peso final (g)	316,13	307,45	324,15	322,82	311,13	6,44	0,7889
Ganho de peso (g)	133,21	119,13	141,96	133,24	126,23	10,28	0,5491
Consumo de dieta (g)	195,72	183,69	201,40	217,55	195,44	11,24	0,7621
Conversão alimentar	1,46	1,54	1,36	1,48	1,55	8,68	0,6921
Taxa cresc. específico (%)	0,91	0,82	0,95	0,89	0,87	13,39	0,9588
Sobrevivência (%)	77,08	95,83	97,92	95,83	97,92	6,860	0,3601

Fonte: Elaborado pelo autor

CV%: Coeficiente de Variação; p-value e todos os dados foram obtidos do *software* R Studio pelo teste de *Tukey*.

4.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Nas análises bioquímicas, a proteína total foi o único parâmetro que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), evidenciando variações em relação às demais variáveis analisadas. Os níveis crescentes de farinha de *K. alvarezii* refletiram em variações nos valores, analisadas de forma independente pela escala de Duncan, e com maior discriminação dos tratamentos pelo teste de *Tukey*, variando de 3,20 a 3,74 mg/dL. O

melhor resultado foi observado na dieta *Kappa* 1,50, que apresentou 3,74 mg/dL de proteína total no sangue, como observado na Tabela IV.

Tabela IV - Valores bioquímicos do sangue da tilápia do Nilo alimentada com níveis crescentes de farinha de *Kappaphycus alvarezii* na dieta, por 60 dias

Variável	Inclusão de farinha de <i>Kappaphycus alvarezii</i> (g/Kg)					CV %	P-Value
	Kappa 0,00	Kappa 0,50	Kappa 1,00	Kappa 1,50	Kappa 2,00		
Glicemia mg/dL	52,75	44,63	58,63	60,00	54,50	32,38	0,4426
Proteína mg/dL	3,30 ^{bc}	3,68 ^{ab}	3,20 ^c	3,74 ^a	3,47 ^{ac}	11,24	0,0381
Triglicerídeos mg/dL	335,38	432,13	366,25	378,63	390,88	50,47	0,8941
Colesterol mg/dL	177,25	200,00	157,50	197,00	179,75	30,89	0,5699

CV%: Coeficiente de Variação; Proteína mg/dL, letras diferentes como resultado mais discriminatório de Duncan realizado pelo teste de *Tukey* usando o *software* R Studio.
Fonte: Elaborado pelo autor

4.3 COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DO FILÉ

Os níveis crescentes de farinha de *K. alvarezii* na dieta das tilápias não apresentaram efeito significativo sobre a proteína bruta. No entanto, foram observadas diferenças no extrato etéreo, com valores heterogêneos para cada dieta. A dieta Kappa 0,50 apresentou a maior quantidade, com 2,77a, enquanto a dieta Kappa 2,00 registrou 2,64b. Cada concentração mostrou valores únicos, de acordo com o teste de *Tukey*, não sendo equivalentes às demais dietas (Tabela V).

Outro parâmetro com significância foi a matéria mineral ($p < 0,05$), evidenciando diferenças entre os dados analisados pelo teste de *Tukey*. A dieta Kappa 1,50 apresentou a maior concentração de matéria mineral, com 6,13, enquanto a dieta Kappa 0,00 apresentou o menor valor, com 5,05. As concentrações intermediárias foram observadas nas dietas Kappa 0,50 com 5,60 e Kappa 2,00 com 5,60, situando-se dentro de uma faixa aceitável de matéria mineral.

813 Tabela V - Valores médios (%) da composição química filé de juvenis de tilápia
814 suplementados com níveis crescentes de farinha de *Kappaphycus alvarezii*

Variável	Níveis de <i>Kappaphycus alvarezii</i> (%)					CV%	p-value
	Kappa 0,00	Kappa 0,50	Kappa 1,00	Kappa 1,50	Kappa 2,00		
Proteína bruta	86,78	85,94	86,45	85,26	86,34	1,950	0,8282
Extrato etéreo	2,40 ^d	2,77 ^a	2,18 ^e	2,52 ^c	2,64 ^b	0,930	< 0,001
Matéria seca	21,16	17,91	18,11	18,36	16,94	12,12	0,1472
Matéria mineral	5,05 ^b	5,60 ^{ab}	4,84 ^b	6,13 ^a	5,22 ^{ab}	8,210	0,007

815 CV%: Coeficiente de Variação, Kappa: concentração de *Kappaphycus alvarezii* em%,
816 teste utilizado *Tukey* $p < 0,05$, usando *software* R Studio. Fonte: Elaborado pelo autor.

817

818

819 4.4 CONTAGEM DE CÉLULAS DEFENSIVAS APÓS O DESEMPENHO

820

821 Os mecanismos de defesa foram acionados e reforçados pela macroalga *K.*
822 *alvarezii*, com destaque para a porcentagem de monócitos, que apresentou diferença
823 significativa ($p < 0,05$) conforme o nível de concentração. Em relação à defesa inata,
824 mediada principalmente por monócitos e neutrófilos, a contagem não mostrou diferença
825 significativa ($p > 0,05$) (Tabela VI).

826 No entanto, a porcentagem de monócitos apresentou diferenças significativas
827 ($p < 0,05$), com destaque para a dieta Kappa 0,50, que teve a maior concentração, com
828 5,250%. Em comparação, as dietas Kappa 1,50 e Kappa 0,00 apresentaram 4,500% e
829 3,000%, respectivamente. Esses resultados indicam que a farinha de *K. alvarezii* com
830 menor concentração de macroalga levou a uma maior replicação dos monócitos, com o
831 intuito de fortalecer o sistema imunológico. Por outro lado, as dietas com maior
832 concentração de *K. alvarezii* mostraram maior resistência celular, reduzindo a
833 necessidade de replicação dos monócitos, uma vez que os aditivos presentes na macroalga
834 reforçam a função dessas células.

835 Os linfócitos, por sua vez, foram as células predominantes, mantendo uma presença
836 numerosa em todas as lâminas e demonstrando dominância em todas as observações das
837 diferentes dietas, com valores dentro dos parâmetros normais previamente estabelecidos,
838 antes do desafio com o patógeno.

839

840 Tabela VI - Avaliação de leucócitos da tilápia do Nilo, antes do desafio com
 841 *Pseudomonas aeruginosa*

Item	Níveis de farinha de <i>Kappaphycus alvarezii</i>					CV%	p- value
	kappa 0,00%	kappa 0,50%	kappa 1,00%	kappa 1,50%	kappa 2,00%		
Linfócitos(μL)	25168,5	25155,68	26451,18	24177,8	23246,42	8,67	0,2368
Neutrófilos(μL)	2818,74	2728,14	2915,32	2743,22	2722,48	5,78	0,7559
Monócitos(μL)	2355,55	2426,1	2915,32	2743,22	2483,18	9,12	0,291
Basófilos(μL)	153,6	185,35	158,69	104,82	149,56	30,12	0,7676
Eosinófilos(μL)	18,00	14,2	22,3	13,41	14,23	5,48	0,799
Trombócitos(μL)	3418,37	4852,65	6258,72	3684,22	5711,34	24,62	0,7177
Linfócitos (%)	86,9583	79,0476	81,00	80,9583	82,4167	6,90	0,0904
Neutrófilos (%)	4,125	7	6,25	6,375	5,625	36,65	0,1149
Monócitos (%)	3,000 ^c	5,250 ^a	2,750 ^c	4,500 ^{ab}	3,250 ^{bc}	15,78	< 0,001
Basófilos (%)	1	1	1,25	1,25	1,5	45,64	0,6795
Eosinófilos (%)	1	1,5	1,25	1,25	1,33	46,03	0,8154
Trombócitos (%)	6,25	8,2857	9,625	7,5	7,875	38,83	0,2994

842 CV%: Coeficiente de variação; todos os dados foram obtidos do teste de Tukey p<0,05.

843 Fonte: Elaborado pelo autor.

844

845 4.5 PARÂMETROS DESAFIADOS COM *Pseudomonas aeruginosa*

846

847 A primeira observação refere-se às mortalidades, com destaque para o grupo
 848 controle Kappa 0,00, que apresentou 50% de mortalidade (Tabela VII). Esse resultado
 849 sugere que os peixes desse grupo não desenvolveram resistência suficiente para
 850 sobreviver, nem mostraram características adequadas de imunidade inata ou adquirida. A
 851 melhor taxa de sobrevivência foi observada no grupo Kappa 2,00, com apenas 5% de
 852 mortalidade.

853 A quantidade de peixes mortos, sem sinais de trauma ou manifestações clínicas,
 854 começou a aumentar nas primeiras 24 horas após a injeção intraperitoneal e prosseguiu
 855 nas seguintes 72 horas, sem que fossem observados sinais clínicos. Foi realizada a
 856 dissecação dos peixes e a coleta de amostras com suaves para cultivo em cápsulas de
 857 Petri, confirmando que a causa da morte foi uma infecção por *P. aeruginosa*. Após 96
 858 horas, começaram a surgir diferenças nas manifestações clínicas, como coloração alterada
 859 nos peixes, descamação da pele, olhos esbranquiçados unilateral e bilateralmente,
 860 ulcerações cutâneas, ascite e feridas sanguinolentas nas nadadeiras pélvicas, pectorais e
 861 caudal.

As manifestações observadas de letargia, falta de apetite e afastamento do grupo começaram no quarto dia após a inoculação da bactéria, culminando nas mortes subsequentes. A cada morte, foram realizadas dissecações e coletadas amostras do conteúdo celomático, fígado, baço e intestinos. As amostras foram enviadas para cultivo, onde foi confirmada a presença de *P. aeruginosa* nos cultivos realizados no laboratório de microbiologia.

Tabela VII - Mortalidade (%) da tilápia do Nilo desafiada com *Pseudomonas aeruginosa*

Variável	Níveis de farinha de <i>Kappaphycus alvarezii</i>					p- value
	Kappa 0,00%	Kappa 0,50%	Kappa 1,00%	Kappa 1,50%	Kappa 2,00%	
Mortalidade	50±11,55 ^a	20±0,00 ^b	25±10,00 ^b	15±10,00 ^b	5±10,00 ^b	<0,001
Morte súbita	5	4	0	0	0	-
Sinais clínicos	5	2	5	3	1	-

Valores médios com letras diferentes na mesma linha indica diferença significativa pelo teste de *Tukey* ($p < 0.05$). Fonte: Elaborado pelo autor

4.6 DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

As contagens sanguíneas totais após o desafio com o patógeno *P. aeruginosa*, incluindo as contagens totais e diferenciais de leucócitos nos diferentes grupos experimentais estão apresentadas na Tabela VIII. Observou-se uma variação significativa na contagem total de leucócitos entre os grupos, destacando-se aumento expressivo de neutrófilos no grupo alimentado com a dieta Kappa 2,00. Além disso, os valores de monócitos nesse grupo foram superiores aos registrados nos grupos que receberam dietas com concentrações menores de *K. alvarezii*, indicando um impacto direto da macroalga na ativação dessas células.

Dois grupos celulares relacionados à imunidade inata apresentaram valores significativamente superiores com o aumento da inclusão da farinha da *K. alvarezii* na dieta. Essa resposta reforça o papel da imunidade inespecífica, destacando a importância das células leucocitárias na absorção e aproveitamento dos compostos bioativos presentes na macroalga. Esses resultados sugerem que o uso da farinha da *K. alvarezii* nas

concentrações mais elevadas na alimentação da tilápia pode fortalecer o sistema imunológico de maneira geral.

Paralelamente, a resposta imune específica ou adaptativa também foi avaliada, revelando uma relação estreita com a imunidade inata. Nesse contexto, os linfócitos apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), com maior desempenho no grupo alimentado com a dieta Kappa 1,50%, que superou os demais grupos experimentais. Esse resultado foi o primeiro a alcançar relevância estatística nos testes realizados, enquanto os outros grupos apresentaram valores semelhantes.

Os basófilos, que também compõem a defesa específica, demonstraram maior desenvolvimento no grupo alimentado com a dieta Kappa 0,50%, exibindo resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Já os eosinófilos mantiveram uma equivalência nos valores entre os diferentes grupos. Essa estabilidade indica uma resposta imune consistente, independente da concentração de macroalga utilizada.

Por fim, ao analisar a porcentagem relativa de cada tipo de leucócito, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, exceto para os monócitos. Esses últimos apresentaram porcentagens significativamente mais altas nos grupos alimentados com as dietas Kappa 2,00% e Kappa 1,50% ($p < 0,05$), superando as demais dietas.

Tabela VIII - Leucócitos presentes no sangue de tilápia do Nilo após desafio com a *Pseudomonas aeruginosa*, contagem a: Células $\times 10^3/\mu\text{l}$

Item	Níveis de farinha de <i>Kappaphycus alvarezii</i>					p-value
	Kappa 0,00%	Kappa 0,50%	Kappa 1,00%	Kappa 1,50%	Kappa 2,00%	
Neutrófilos (μl)	2.457,5 $\pm$ 821,32	4.150 $\pm$ 471,45	2.905 $\pm$ 323,47	3.505 $\pm$ 861,84	4.178,33 $\pm$ 1.536,72	0,0637
Monócitos (μl)	650 $\pm$ 98,66 ^b	684 $\pm$ 143,81 ^b	1.380 $\pm$ 243,81 ^{ab}	1.325 $\pm$ 620,19 ^{ab}	1.620 $\pm$ 396,99 ^a	0,0013
Linfócitos (μl)	7.932 $\pm$ 3.022 ^b	7.280 $\pm$ 2.726,41 ^b	4.700 $\pm$ 970,77 ^b	12.755 $\pm$ 2.142,05 ^a	5.257,5 $\pm$ 615,38 ^b	0,0471
Basófilos (μl)	262,22 $\pm$ 60,12 ^{ab}	400 $\pm$ 188,33 ^a	185 $\pm$ 41,23 ^{ab}	290 $\pm$ 88,89 ^{ab}	116,67 $\pm$ 56,96 ^b	0,0185
Eosinófilos (μl)	251,11 $\pm$ 128,99	330 $\pm$ 57,74	545 $\pm$ 83,86	550 $\pm$ 177,76	330 $\pm$ 165,33	0,0221
Neutrófilos (%)	21,27 $\pm$ 1,52	32,31 $\pm$ 12,71	29,90 $\pm$ 1,85	19,02 $\pm$ 5,00	36,33 $\pm$ 11,13	0,2819
Monócitos (%)	5,63 $\pm$ 1,15 ^b	5,33 $\pm$ 0,27 ^b	14,20 $\pm$ 2,69 ^a	19,02 $\pm$ 1,23 ^{ab}	14,08 $\pm$ 3,27 ^a	0,0142
Linfócitos (%)	68,66 $\pm$ 29,46	56,68 $\pm$ 15,29	48,38 $\pm$ 4,89	69,23 $\pm$ 14,99	45,71 $\pm$ 7,06	0,5428
Basófilos (%)	2,27 $\pm$ 1,6	3,11 $\pm$ 1,42	1,90 $\pm$ 0,9	1,57 $\pm$ 0,5	1,01 $\pm$ 0,7	0,4829
Eosinófilos (%)	2,17 $\pm$ 0,11	2,57 $\pm$ 1,29	5,61 $\pm$ 0,18	2,99 $\pm$ 0,59	2,87 $\pm$ 1,14	0,1444

Valores médios com letras diferentes na mesma linha indica diferença significativa pelo teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

Após do desafio com a *P. aeruginosa*, com os leucócitos do sistema imune inespecífico monócitos e leucócitos do sistema imune específico linfócitos e basófilos tiveram significância incluindo o porcentual de monócitos pelo teste de Tukey $P < 0,05$, indicando heterogeneidade nos valores obtidos nos dados destas células defensivas.

4.7 AVALIAÇÃO DAS LESÕES INTESTINAIS

As lesões encontradas no intestino das tilápias apresentaram variações significativas, com observações de alta quantidade de vilosidades necrosadas e grande presença de células caliciformes. No grupo que recebeu a dieta Kappa 0,00% (controle), foi registrada uma contagem de até 2.123 células caliciformes em um perímetro de corte. No entanto, ao avaliar os cortes de intestino de peixes alimentados com a dieta contendo Kappa 0,50%, ainda foram observadas manifestações de necroses e elevado número de células caliciformes, embora não em todas as amostras. Nessas, observou-se uma diminuição gradativa das lesões causadas pela bactéria (Tabela IX).

Nos grupos que receberam as dietas Kappa 1,00%; Kappa 1,50%; e Kappa 2,00%, os resultados foram ainda mais expressivos. As lesões intestinais foram consideravelmente menores, as vilosidades apresentaram-se mais íntegras e firmes, e o número de células caliciformes foi reduzido. Esses achados sugerem que o aumento na concentração de *Kappaphycus alvarezii* na dieta contribui para a integridade do tecido intestinal, reduzindo os danos causados pela infecção bacteriana.

As alterações histopatológicas foram classificadas em uma escala de 0 a 4, conforme a presença e a gravidade das lesões:

- 0: ausência de alterações;
- 1: alteração leve, correspondente a menos de 25% da área do tecido;
- 2: alteração moderada, abrangendo entre 25% e 50% da área do tecido;
- 3: alteração grave, envolvendo mais de 50% da área do tecido;
- 4: alteração pronunciada, com necroses extensas e descamação do tecido.

Os níveis de alteração histopatológica variaram significativamente entre os grupos experimentais. Foram observadas vilosidades intestinais com necroses muito avançadas em alguns casos, enquanto outros apresentaram apenas alterações mínimas ou ausência de necroses nas vilosidades e nas paredes intestinais.

No grupo controle (Kappa 0,00%), todos os animais exibiram lesões teciduais classificadas nos graus 3 e 4, evidenciando o impacto severo da infecção. Por outro lado, no grupo tratado com Kappa 0,50%, apenas um animal foi qualificado com grau 4. Esse grupo já demonstrava menor nível de lesão intestinal em comparação ao controle. A análise histológica revelou vilosidades mais delgadas e menor exposição da submucosa, indicando menor perda epitelial. No grupo alimentado com Kappa 2,00%, não foi encontrado nenhum animal com o mais alto grau de lesão intestinal (grau 4). A maioria dos indivíduos desse grupo apresentou lesões mais brandas, classificadas como graus 1 e 2.

Tabela IX - Níveis de classificação das alterações histopatológicas de intestino de tilápia do Nilo, após desafio com a *Pseudomonas aeruginosa*

Níveis de farinha de <i>Kappaphycus alvarezii</i>					
Qualificação	Kappa 0,00%	Kappa 0,50%	Kappa 1,00%	Kappa 1,50%	Kappa 2,00%
0	0	0	0	0	0
1	0	1	2	1	2
2	0	3	1	2	4
3	3	2	2	3	1
4	4	1	2	1	0

Fonte: Elaborado pelo autor

4.8 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DAS VILOSIDADES INTESTINAIS E CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS CALICIFORMES

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) para o diâmetro longitudinal das vilosidades entre os grupos analisados. O grupo tratado com a dieta Kappa 0,50 apresentou um aumento significativo no tamanho das vilosidades, chegando a 140,87% em relação ao grupo controle. Além disso, foi constatado um aumento na largura das vilosidades nesse grupo, indicando uma melhoria estrutural do tecido intestinal (Tabela X).

Nos demais grupos, o aumento na concentração da dieta proporcionou um incremento progressivo no diâmetro longitudinal das vilosidades, em comparação com o grupo controle. Esse efeito foi acompanhado por um aumento proporcional na largura das vilosidades, o que reforçou a sua sustentação e firmeza. Essas mudanças estruturais não

apenas favorecem a estabilidade das vilosidades intestinais, mas também auxiliam na absorção eficiente dos nutrientes. Paralelamente, o aumento na largura das vilosidades demonstrou beneficiar a segregação do muco pelas células caliciformes, uma função essencial para a proteção e lubrificação do trato intestinal. Esse muco contribui para a expulsão de corpos estranhos do sistema digestivo de maneira eficaz e rápida.

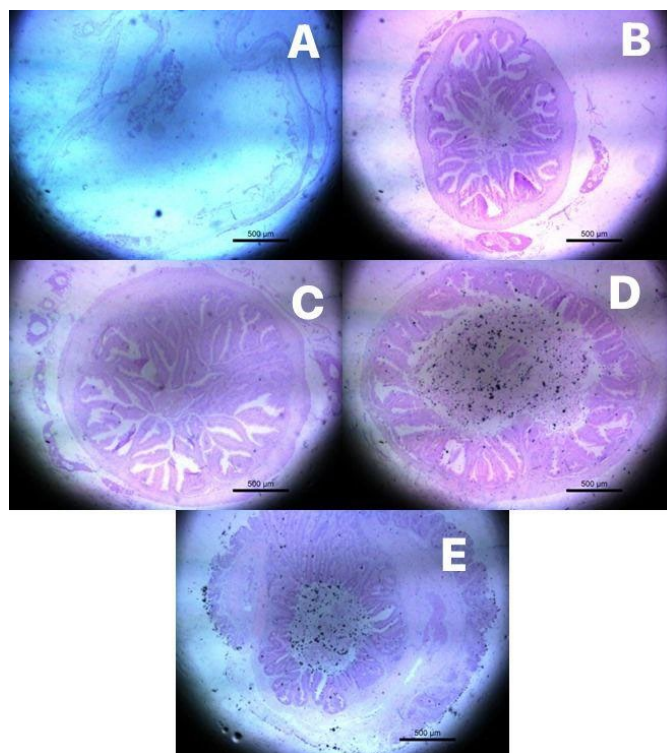
Por outro lado, verificou-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na quantidade de células caliciformes entre os grupos testados. No entanto, observou-se uma tendência decrescente na presença dessas células à medida que a concentração de *K. alvarezii* aumentava na dieta. Essa redução pode ser atribuída à ação dos metabólitos bioativos presentes na macroalga, que podem estar desempenhando um papel na regulação da produção de muco e na proteção das vilosidades intestinais.

Tabela X - Avaliação das dimensões das vilosidades intestinais e número de células caliciformes em μm da tilápia do Nilo alimentada com dietas contendo farinha de *Kappaphycus alvarezii* na dieta

Variável	Níveis de farinha de <i>Kappaphycus alvarezii</i>					p-value
	Kappa 0,00	Kappa 0,50	Kappa 1,00	Kappa 1,50	Kappa 2,00	
Qualificação	3.5 $\pm$ 0.55 ^a	1.75 $\pm$ 0.50 ^b	3.2 $\pm$ 0.84 ^{ab}	2.86 $\pm$ 1,07 ^{ab}	2.00 $\pm$ 0.71 ^b	0,0086
Longitude (μm)	205,75 $\pm$ 158,7 ^b	495,59 $\pm$ 116,88 ^a	491,96 $\pm$ 186,85 ^a	484,4 $\pm$ 238,56 ^a	427,79 $\pm$ 108,17 ^a	<0,001
Largura (μm)	84,16 $\pm$ 28,82 ^b	113,6 $\pm$ 22,81 ^a	115,61 $\pm$ 42,2 ^a	108,54 $\pm$ 40,47 ^a	79,99 $\pm$ 14,97 ^b	<0,001
Células Caliciformes	466,50 $\pm$ 298,91	422,80 $\pm$ 74,82	470,60 $\pm$ 115,11	387,80 $\pm$ 150,91	383,25 $\pm$ 90,92	0,8039

Valores médios com letras diferentes na mesma linha indica diferença significativa pelo teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

Nos cortes histológicos com escala de 500 μm (Figura 3), é possível observar o diâmetro do intestino anterior e as vilosidades de forma panorâmica. Na imagem 3A, observa-se o intestino do grupo controle, apresentando vilosidades necrosadas e acentuado desgaste devido à inoculação do patógeno. Na imagem 3B, pode-se visualizar um corte correspondente ao tratamento Kappa 0,50%, no qual as vilosidades estão intactas e firmes, evidenciando uma integridade estrutural significativamente superior. Já na imagem 3C, observa-se um corte referente ao tratamento Kappa 1,00%, onde as vilosidades se apresentam sólidas e mais amplas, refletindo um aumento no diâmetro do intestino.



999

1000 Figura 3 - Cortes do intestino anterior a 4,5 cm do estômago em exemplares de tilápia do
 1001 Nilo submetidos ao desafio com *Pseudomonas aeruginosa*. A: corte de intestino do
 1002 tratamento controle Kappa 0,00, B: corte do intestino do tratamento Kappa 0,50; C: corte
 1003 do intestino do tratamento Kappa 1,00; D: corte do intestino do tratamento Kappa 1,50;
 1004 E: corte do intestino do tratamento Kappa 2,00. Corado por H&E. Fonte: Do autor.

1005

1006 Na imagem 3D, referente ao tratamento Kappa 1,50%, observam-se vilosidades
 1007 bastante completas, com poucos danos causados pela bactéria *P. aeruginosa*. Na imagem
 1008 3E, as vilosidades mostram-se altamente íntegras e preservadas, e a análise com objetiva
 1009 de 4X possibilita a visualização detalhada das células caliciformes, que contribuíram
 1010 significativamente para a defesa e manutenção da integridade das vilosidades intestinais.
 1011 Na imagem 3F, é possível observar vilosidades com células caliciformes em maior
 1012 resolução, destacadas por setas que indicam sua localização específica.

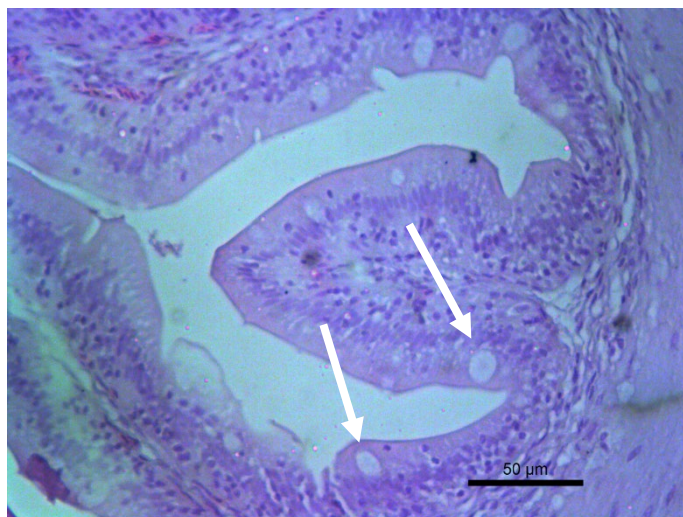


Figura 4 - Vilosidades intestinais, com células caliciformes. Imagem em 40X, tomada de Kappa 1,00%, corado com H&E. As setas indicam as células caliciformes. Fonte: Do autor.

4.9 AVALIAÇÃO DO FÍGADO DA TILÁPIA SOB DIFERENTES TRATAMENTOS COM *Kappaphycus alvarezii*

Os achados histopatológicos no fígado foram esclarecedores para a análise das lesões nos hepatócitos e nos sinusóides hepáticos, conforme demonstrado na Tabela X1. Adicionalmente, na Figura 5, é possível observar as condições das paredes hepáticas, os pontos necrosados e a presença de células melanomacrofágicas ao redor das vênulas, que desempenham papel na drenagem sanguínea.

No grupo controle (Kappa 0,00), identificaram-se mais sinais clínicos de lesões hepáticas e uma maior concentração de centros melanomacrofágicos em comparação aos grupos tratados com a dieta contendo a macroalga. As observações revelaram hemorragias, pontos de necrose e células de *Kupffer* em atividade defensiva contra *P. aeruginosa*. Essas lesões foram classificadas como grau 4, caracterizando-se como pronunciadas. Contudo, à medida que a concentração de macroalga na dieta aumentava, observou-se uma redução na gravidade das lesões hepáticas. Nos grupos Kappa 0,50; Kappa 1,00; Kappa 1,50; e Kappa 2,00, verificou-se uma preservação mais significativa da arquitetura hepática típica, com menor ocorrência de áreas necrosadas e concentração de centros melanomacrofágicos.

Os tecidos hepáticos dos grupos tratados com Kappa 1,50 e Kappa 2,00 apresentaram menor presença de centros melanomacrofágicos. Esse resultado pode ser atribuído ao fortalecimento da resposta imunológica, com maior eficácia dos neutrófilos, monócitos e linfócitos na fagocitose da *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela XI - Avaliação das alterações do fígado da tilápia do Nilo, pela *Pseudomonas aeruginosa*, alimentadas com a dieta contendo níveis crescentes de farinha de *Kappaphycus alvarezii*, durante 75 dias

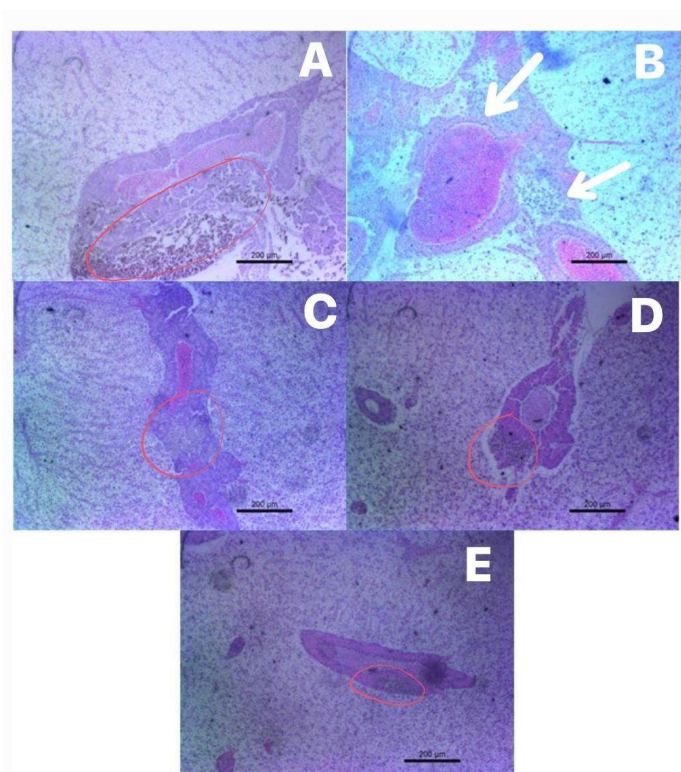
Qualificação	Níveis de farinha de <i>Kappaphycus alvarezii</i>				
	Kappa 0,00%	Kappa 0,50%	Kappa 1,00%	Kappa 1,50%	Kappa 2,00%
0	0	0	0	0	0
1	0	3	1	4	4
2	1	3	2	3	4
3	5	1	4	1	0
4	2	1	0	0	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 5, observam-se cortes histológicos do fígado das tilápias submetidas às diferentes concentrações da macroalga *K. alvarezii*. Na imagem 5A (Kappa 0,00 - controle), destaca-se grande concentração de centros melanomacrofágicos nas portas das veias centrolobulares e arteríolas lobulares, além da presença de pontos de necrose nos hepatócitos e nas veias centrais.

Na imagem 5B (Kappa 0,50), identifica-se uma veia lobular e centros melanomacrofágicos, os quais fagocitaram patógenos antes de o sangue seguir pela veia lobular. Já na imagem 5C (Kappa 1,00), observa-se uma área menos comprometida. Embora a veia lobular apresente inchaço, no canto inferior direito nota-se a presença de células defensivas acumuladas em resposta à infecção por *Pseudomonas aeruginosa*. Nessa região, o tamanho do centro melanomacrofágico indica resistência moderada e uma resposta imunológica ativa contra o patógeno. Na imagem 5D (Kappa 1,50), o fígado apresenta uma distribuição moderada de centros melanomacrofágicos, principalmente no canto inferior esquerdo. Esses centros estão estrategicamente localizados antes da entrada do sangue na veia. Por fim, na imagem 5E (Kappa 2,00), observa-se uma quantidade reduzida de centros melanomacrofágicos, concentrados em um ponto no canto inferior. Embora ainda exista inchaço moderado em uma das paredes, nota-se a atuação eficiente das células de *Kupffer*.

1065



1066

1067 Figura 5 - Cortes histológicos de fígado da tilápia do Nilo, alimentadas com dietas
1068 contendo níveis crescentes de farinha de *Kappaphycus alvarezii* e desafiada com
1069 *Pseudomonas aeruginosa*. Aumento 200 µm, Corados com H&E. A: corte de fígado do
1070 tratamento controle Kappa 0,00, B: corte do fígado do tratamento Kappa 0,50; C: corte
1071 do fígado do tratamento Kappa 1,00; D: corte do fígado do tratamento Kappa 1,50; E:
1072 corte do fígado do tratamento Kappa 2,00. As marcas ovaladas e setas indica o dano e a
1073 fagocitoses dos centros melanomacrofágicos. Fonte: Do autor.

1074

1075

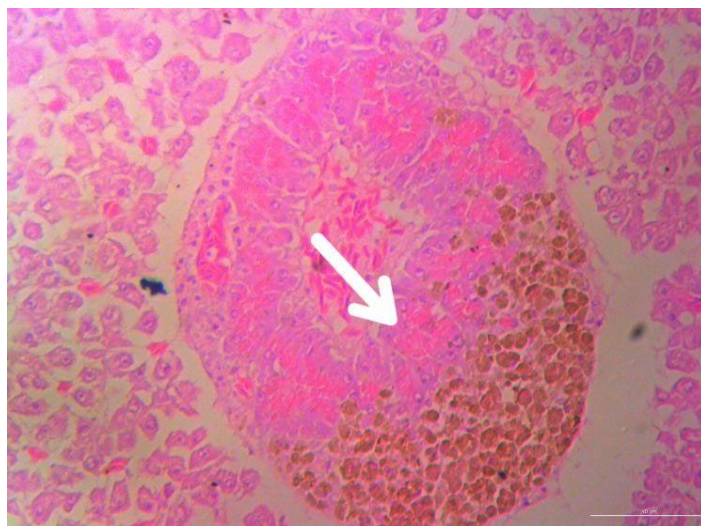


Figura 6 - Corte de fígado destacando os centros melanomacrofágicos. Vênula com aumento em 40X no microscópio corado com H&E, corte de fígado de peixe com tratamento em 0,50% de *Kappaphycus alvarezii*.

4.10 AVALIAÇÃO DO BAÇOS DA TILÁPIA SOB DIFERENTES TRATAMENTOS COM *Kappaphycus alvarezii*

Nas avaliações realizadas no baço, foram identificadas diferenças nos níveis de lesões provocadas pela *P. aeruginosa*. Observou-se que as lesões de grau 4, caracterizadas como muito pronunciadas, predominaram no grupo controle (Kappa 0,00), sendo registradas em quatro avaliações. Em contraste, nos demais grupos, as lesões ocorreram em menor proporção. Esse comportamento reflete o papel central do baço como o principal órgão linfático na circulação sanguínea, responsável pela filtração do sangue, pela eliminação de células que já cumpriram suas funções, bem como pela fagocitose de organismos estranhos ao corpo do animal (Tabela XII).

À medida que a concentração de *K. alvarezii* na dieta aumentou, observou-se uma redução progressiva nas lesões nesse órgão linfático. Essa redução pode ser atribuída ao fortalecimento dos linfócitos presentes na polpa branca do tecido conjuntivo modelado do baço, promovido pela adição da macroalga. Notavelmente, no grupo alimentado com a dieta Kappa 2,00, foi identificado um baço íntegro, sem alterações histológicas ou sinais de necrose, sendo a única avaliação com pontuação igual a zero, o que evidencia a eficácia dessa concentração em preservar a integridade do tecido esplênico.

Tabela XII - Avaliação das lesões causadas pela *Pseudomonas aeruginosa* no baço da tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de farinha de *Kappaphycus alvarezii*

Qualificação	Níveis de farinha de <i>Kappaphycus alvarezii</i>				
	Kappa 0,00%	Kappa 0,50%	Kappa 1,00%	Kappa 1,50%	Kappa 2,00%
0	0	0	0	0	1
1	1	1	1	3	2
2	1	2	2	3	3
3	1	3	4	1	1
4	4	2	1	1	1

Fonte: Elaboração do autor.

Níveis de qualificação do 0 até 4, como indicado nos materiais e métodos 4 e gravidade maior com necropsia abundante e descamação do tecido alvo que está em observação.

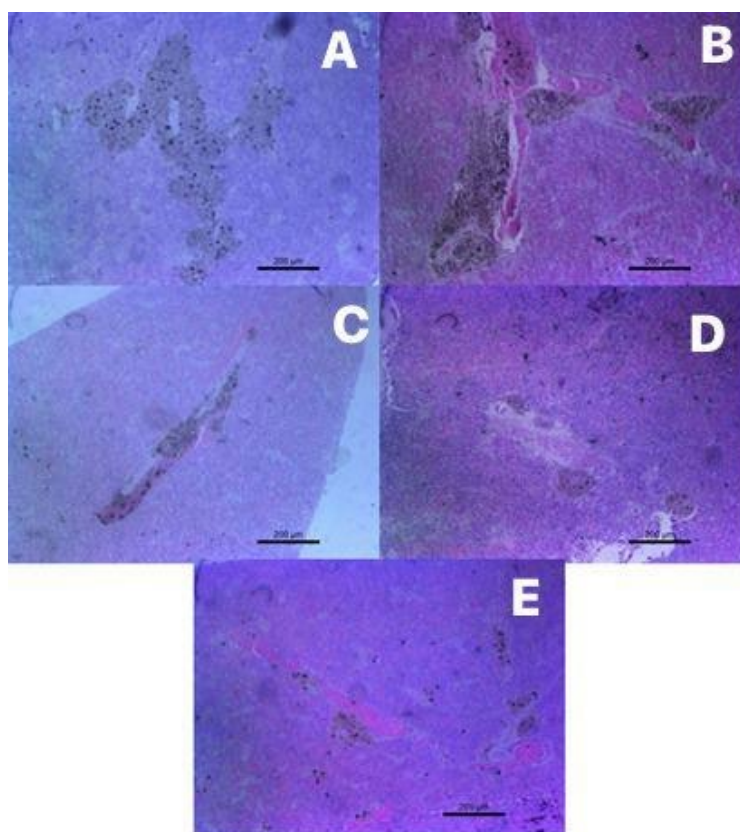


Figura 5 - Cortes histológicos de baço da tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de farinha de *Kappaphycus alvarezii* e desafiada com *Pseudomonas aeruginosa*. Aumento 200 µm, corados com H&E. A: corte do baço do tratamento controle Kappa 0,00; B: corte do baço do tratamento Kappa 0,50; C: corte do baço do tratamento Kappa 1,00; D: corte do baço do tratamento Kappa 1,50; E: corte do baço do tratamento Kappa 2,00. As marcas escuras indicam o dano e a fagocitoses dos centros melanomacrofágicos. Fonte: Do autor.

Nos cortes histológicos do baço de peixes submetidos a diferentes dietas com concentrações crescentes de *K. alvarezii* (Figura 7), são evidenciadas variações nos níveis de lesões e atividade dos centros melanomacrofágicos. Na imagem 7A, referente ao grupo controle (Kappa 0,00), observa-se uma lesão bastante pronunciada, classificada como grau 4. Essa imagem mostra uma alta concentração de células caliciformes atuando na defesa, bem como necrose significativa dos seios esplênicos. Em algumas áreas, os centros melanomacrofágicos não conseguiram preservar a integridade do tecido, resultando em danos severos. Já na imagem 7B, correspondente ao grupo tratado com Kappa 0,50, nota-se uma arteríola circundada por células fagocíticas melanizadas, prontas para combater patógenos presentes na polpa branca do baço. Essa resposta defensiva ilustra o potencial da dieta suplementada em estimular a fagocitose e reduzir os danos teciduais.

Na imagem 7C, que representa o grupo Kappa 1,00, identifica-se uma trabécula parcialmente envolvida por centros melanomacrofágicos. Devido à natureza proteolítica da *Pseudomonas aeruginosa*, há indícios de que a trabécula, em conjunto com a arteríola adjacente, tenha sofrido degradação. Ainda assim, a atuação dos centros melanomacrofágicos limitou o avanço da bactéria para o tecido do baço. A imagem 7D, referente ao grupo Kappa 1,50, exibe uma arteríola associada a nódulos linfáticos em processo de defesa ativa. Diferentemente da lesão identificada na imagem 7C, a integridade da arteríola é preservada, evidenciando uma resposta imune celular mais avançada e eficaz contra o patógeno.

Por fim, na Figura 7E, que representa o grupo tratado com Kappa 2,00, observa-se uma arteríola terminal com uma menor quantidade de centros melanomacrofágicos. Embora alguns pontos de necrose sejam visíveis no tecido do órgão, o padrão de lesão é classificado como grau 2, indicando uma defesa moderada, mas eficiente, frente à *Pseudomonas aeruginosa*.

5. DISCUSSÃO

5.1 PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS

A média de ganho de peso de 130,75 g das tilápias superou os valores reportados nos trabalhos de Furuya *et al.* (2005) e Boscolo *et al.* (2001), que obtiveram incrementos de peso, variando de 119,53 g a 122,86 g. No estudo de Furuya *et al.* (2005), a redução de 3% a 4% de proteína bruta na dieta de tilápias comprometeu o ganho de peso, enquanto Boscolo *et al.* (2001) utilizou ração peletizada comercial.

Nesta pesquisa, o ganho de peso diário foi, em média, de 0,89%, superando os valores de Furuya *et al.* (2005) e Boscolo *et al.* (2001), que registraram taxas de 0,48% e 0,31%, respectivamente, para tilápia do Nilo de linhagem tailandesa e nacional. Esses resultados indicam que o ambiente da pesquisa proporcionou um crescimento superior ao reportado nos estudos mencionados. No trabalho de Furuya *et al.* (2005), o menor ganho de peso também foi associado à falta de oxidação do esqueleto carbônico dos aminoácidos, o que limitou a formação de gordura e lipídios na dieta.

O fator de conversão alimentar (FCA) médio obtido foi de 1,48, em comparação com 1,23 relatado por Furuya *et al.* (2005). Esse valor foi alcançado ao reduzir o teor de proteína bruta da dieta para menos de 30%, o que impactou o crescimento. Boscolo *et al.* (2001), por sua vez, obtiveram fatores de conversão alimentar entre 1,31 e 1,67, utilizando ração comercial peletizada com 32% de proteína bruta, valores similares ao encontrado neste estudo.

Quanto ao teor de proteína consumida pelos peixes, observou-se que ele permaneceu dentro da faixa de aceitação para o desempenho das tilápias, conforme estabelecido por Rapatsa; Moyo (2016) e Polese (2021). Os autores enfatizam que a inclusão de *K. alvarezii* na dieta testada não teve efeito significativo no desempenho zootécnico das tilápias ($P>0,05$). Rapatsa; Moyo (2016), ainda destacam que a quantidade ideal de proteína na dieta das tilápias deve estar entre 30% e 35%. Neste estudo, a média foi de 32,34% de proteína bruta, mantendo-se dentro da faixa recomendada, sem substituir farinha de peixe por farinha de *K. alvarezii*, mas utilizando-a como complemento dietético.

Embora os níveis de proteína na farinha de *K. alvarezii* não superem os de outras fontes, como carne e ossos e penas (Tabela II), o teor de proteína da macroalga foi de apenas 5,83%, conforme relatado por Erwin (2015) e Polese (2021). Para atender às exigências de 30% a 35% de proteína pura necessárias para o crescimento ideal das tilápias, seria necessário complementar com, no mínimo, 29,17% de proteína de origem animal, podendo comprometer o desempenho e a palatabilidade da ração diária. Erwin (2015) também adverte que níveis acima de 10% de farinha de *K. alvarezii* comprometem a palatabilidade do alimento, resultando em mortalidade. Assim, a utilização da macroalga como substituto integral da farinha de peixe não é recomendada, mas seus ingredientes são aceitáveis para provocar efeitos secundários benéficos, como ações antimicrobianas e imunológicas.

Por fim, Segundo Erwin (2015), Rapatsa; Moyo (2016) e Polese (2021), a tilápia, sendo onívora, possui uma exigência proteica mínima de 30% em sistemas de confinamento, para garantir crescimento adequado e bom fator de conversão alimentar em sistemas comerciais de aquicultura. Assim, *K. alvarezii* não é viável como fonte primária de proteína devido ao baixo teor proteico, mas é recomendada como agente auxiliar no fortalecimento do sistema imunológico e no controle de patógenos.

5.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Nos parâmetros bioquímicos do sangue, a proteína foi a única variável que apresentou diferença significativa ($P < 0,05$), com valor de 0,0381, indicando uma variação de 3,20 a 3,74 mg/dL. Polese (2021) ressalta que tais resultados podem variar consideravelmente dependendo do ambiente ou da estação do ano em que os exames são realizados. Contudo, em seu estudo, Polese (2021) não observou diferenças significativas nos níveis de glicemia, proteína, triglicerídeos e colesterol. Essa ausência de variação pode ocorrer quando aditivos na dieta substituem parcialmente a farinha de peixe, sem comprometer os compostos lipídicos.

Por sua vez, Erwin (2015) concluiu que a inclusão de até 5% de farinha de *Kappaphycus. alvarezii* na dieta não impacta os parâmetros bioquímicos do sangue. Dessa forma, os tratamentos “controle” e os que utilizaram até 5% dessa macroalga garantiram boas taxas de crescimento, sem alterações nos níveis sanguíneos. No entanto,

concentrações mais altas de farinha de macroalga (10%, 15% e 20%) podem provocar variações significativas ($P<0,05$) nos níveis de glicemia, triglicerídeos e colesterol, devido à maior substituição da farinha de peixe. Erwin (2015) também observou que o aumento dessas proporções resulta em menor digestibilidade e menor consumo de ração pelos peixes.

Nesse contexto, Erwin (2015) destacou que a digestibilidade e a absorção de carboidratos foram reduzidas nos peixes submetidos aos testes. Isso ocorre porque as carboidrases, enzimas responsáveis por quebrar os carboidratos em açúcares simples, apresentam baixa eficiência nesse cenário. A capacidade das células epiteliais em absorver seletivamente substâncias como glicose, galactose e frutose varia conforme as concentrações disponíveis. A farinha de *K. alvarezii*, por conter alta concentração de compostos aglutinantes, quando misturada com outras rações de alta densidade, pode reduzir a palatabilidade e a digestibilidade nos peixes.

5.3 COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DO FILE

A inclusão de até 2,00% de farinha de *K. alvarezii* na dieta de tilápias demonstrou um aporte proteico insuficiente para substituir a farinha de peixe em termos de desempenho. Não houve diferença significativa na quantidade de proteína bruta entre os tratamentos. Por outro lado, Polese (2021), ao trabalhar com concentrações de 3%, 6% e 9% de farinha de *K. alvarezii*, observou resultados distintos, mas não superiores ao controle. Em concentrações acima de 3%, os resultados indicaram uma redução no crescimento e aumento da mortalidade, conforme mostrado por gráficos com tendência negativa.

Os valores apresentados na Tabela V mostram variações mínimas, mas relevantes no extrato etéreo, que apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. Segundo Furuya *et al.* (2005), foi identificado um efeito quadrático ($P<0,05$) dos tratamentos sobre o extrato etéreo na carcaça das tilápias. O menor valor de gordura na carcaça foi estimado com dietas contendo 27,50% de proteína digestível. Embora esse valor de proteína seja relativamente baixo, ele pode estar associado à menor utilização de

gordura devido à oxidação do esqueleto carbônico dos aminoácidos, o que é economicamente desfavorável.

Por outro lado, a taxa de eficiência proteica e retenção de nitrogênio foi considerada aceitável. Furuya *et al.* (2005) destacam que a Tilápia do Nilo é capaz de metabolizar aminoácidos sintéticos de forma eficiente. Estudos anteriores demonstraram que essa espécie utiliza bem peptídeos de cadeias curtas e longas, indicando boa adaptação enzimática para dietas suplementadas com esses compostos.

Para alimentação ou desempenho utilizando como proteína principal a macroalga *Kappaphycus alvarezii* em peixes, Shapawi *et al.* (2014) realizaram um estudo com o robalo asiático (*Lates calcarifer*), testando concentrações de 6% até 22% de farelo de macroalga vermelha, secado e processado pelos próprios autores. Os resultados mostraram que a dieta controle, em conjunto com a menor concentração de macroalga, de 6%, foi a que apresentou o rendimento desejado no desempenho dos robalos asiáticos. No entanto, Shapawi *et al.* (2014) observaram que, com valores nutricionais acima de 6% de macroalga na dieta, o desempenho dos peixes foi comprometido, indicando que a *K. alvarezii* não é uma boa opção como substituto da farinha de peixe. Essa limitação foi atribuída ao baixo aporte de aminoácidos essenciais, como metionina e fenilalanina, presentes na farinha de macroalga.

Os níveis de cinzas na composição dos filés das tilápias apresentaram diferenças significativas (Tabela V). Polese (2021) ressalta que a farinha de *K. alvarezii* deve ser lavada com abundante água doce antes do processamento para reduzir os resíduos minerais (cinzas). A macroalga tende a acumular grandes quantidades de sais minerais, como cálcio, fósforo, sódio, ferro e cobre, em sua superfície, especialmente quando o processo de lavagem é insuficiente. A presença elevada de cinzas nos músculos dos peixes é atribuída a esses minerais, que variam conforme o tratamento da farinha de macroalga.

5.4 CONTAGEM DE CÉLULAS DEFENSIVAS APÓS O DESEMPENHO DAS TILÁPIAS

As células de defesa mais relevantes nesta pesquisa são as do sistema imune inespecífico, ou sistema inato. Observou-se significância nas porcentagens dos monócitos, que apresentaram heterogeneidade de acordo com a dieta, sendo este um dado importante. Segundo Aurell; Frappier (2012), os peixes possuem mais de uma maneira de se defender ou se preparar, dependendo das condições ambientais em que se desenvolvem. Guimarães (2011) enfatiza que os níveis celulares das tilápias podem variar conforme o ambiente em que habitam. Em viveiros escavados, os leucócitos podem apresentar uma quantidade até 38,55% maior do que em tanques-rede, devido às diferenças nas condições de crescimento e à eutrofização da água, fator que pode impactar diretamente o desempenho dos peixes. No entanto, essas condições podem ser controladas pelo aquicultor.

Os números totais de leucócitos, trombócitos e linfócitos no sistema sanguíneo das tilápias podem ser elevados quando as condições da água são de baixa qualidade, uma vez que a exposição contínua a bactérias pode influenciar nos valores dos glóbulos brancos (Guimarães, 2011). Ainda de acordo com a pesquisa de Guimarães (2011), é normal observar níveis mais elevados de hemácias e leucócitos em tanques escavados e de lona, especialmente em situações de menor concentração de oxigênio dissolvido. Isso está relacionado ao estresse ambiental e à elevação da concentração de hemoglobina como uma estratégia adaptativa ao estresse, permitindo maior captação de oxigênio e defesa imunológica.

Portanto, o sistema imunológico inespecífico dos peixes é considerado a primeira linha de defesa contra os patógenos invasores (Sakthivel *et al.*, 2015). Os principais componentes do sistema imune inato são os macrófagos, monócitos, granulócitos e elementos humorais. Os polissacarídeos presentes na farinha de *K. alvarezii*, como k-carragenana e i-carragenana, podem ativar as células do sistema imunológico inato, como macrófagos e granulócitos, promovendo a produção de citocinas e outras moléculas de defesa, o que fortalece a resistência contra infecções bacterianas. Os imunoestimulantes podem ser administrados por injeção, por imersão ou através da alimentação, sendo esta última a forma mais eficaz para promover uma resposta imunológica ao longo de todo o ciclo de vida do peixe (Sakthivel *et al.*, 2015).

Além dos leucócitos do sistema imune inato (macrófagos, monócitos, neutrófilos e linfócitos NK), é importante também monitorar outras células de defesa, como os linfócitos T e B (Aurell; Frappier, 2012). No caso das tilápias em cultivo intensivo, como nos tanques plásticos com recirculação de água, os níveis tróficos aumentam, o que favorece o crescimento de bactérias. Este aumento pode ser administrado na filtração da água, o que leva a um aumento de até 45,58% nas células defensivas e auxiliares, como as células do sistema imune específico, que são responsáveis pela memória imunológica e controle das bactérias patogênicas.

Consoante Sakthivel *et al.* (2015), é fundamental utilizar imunoestimulantes, como a farinha de *K. alvarezii*, em cultivos de peixes. Caso contrário, os peixes em situações de estresse em tanques de terra podem ter suas células imunológicas sobrecarregadas, o que permite a replicação de bactérias patogênicas. Por isso, é importante adicionar imunoestimulantes quando se requer uma aquicultura intensiva, além de garantir uma boa filtração da água, tanto mecânica quanto biofiltros com cavidades eficientes, e utilizar probióticos para melhorar a flora intestinal e fortalecer as defesas intestinais dos peixes (Oshiro, 2015).

5.5 PARÂMETROS DOS DESAFIOS COM A *Pseudomonas aeruginosa*

O desafio com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, envolvendo o sistema imunológico dos peixes imunomodulados com a farinha de *Kappaphycus alvarezii*, revelou uma mortalidade estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A redução na mortalidade pode ser atribuída ao fato de os peixes permanecerem por um período inicial sem estressores, como manejo, transporte ou qualquer tipo de manipulação mecânica. Durante os primeiros 60 dias, os peixes foram alimentados diariamente com os respectivos tratamentos, garantindo condições adequadas para a assimilação dos compostos bioativos presentes na dieta. Esse período de estabilização, embora frequentemente desconsiderado por outros estudos, permitiu que as enzimas intestinais desenvolvessem defesas bactericidas. Além disso, os metabólitos da *K. alvarezii* tiveram a oportunidade de integrar-se ao sistema enzimático dos órgãos e fortalecer as células fagocitárias, contribuindo de maneira relevante para a imunidade dos peixes.

Segundo Ali *et al.* (2021), a septicemia causada por *Pseudomonas aeruginosa* é considerada uma das principais enfermidades que acometem peixes de cultivo em escala global. Em sua pesquisa, os autores observaram que todos os peixes tratados com essa bactéria apresentaram menor taxa de mortalidade quando suplementados com imunoestimulantes, em comparação com o grupo infectado e não tratado. Esses resultados confirmam a eficácia da administração de imunoestimulantes no fortalecimento do sistema imunológico dos peixes, promovendo o controle das infecções e a manutenção da saúde dos animais.

Além dos efeitos imunomoduladores, Sakthivel *et al.* (2015) relataram que a administração de extratos da farinha de *K. alvarezii*, na concentração de 30 mg/kg via injeção, resultou em aumento significativo da resistência dos peixes a infecções bacterianas, incluindo no caso do robalo-asiático (*Lates calcarifer*). Esses autores também testaram a inclusão da farinha de *K. alvarezii* na alimentação, observando um aumento expressivo da atividade enzimática nos intestinos dos peixes. Enzimas específicas apresentaram funções variadas, incluindo degradação e atividades bactericidas. Nesse contexto, os metabólitos da macroalga demonstraram a capacidade de degradar o peptidoglicano presente nas paredes celulares das bactérias, provocando sua ruptura e consequente destruição.

De acordo com Sapuri (2014), a *K. alvarezii* contém compostos bioativos fundamentais, como alcaloides, flavonoides, esteroides, taninos e saponinas. Esses compostos, considerados substanciais ou, por outros autores, denominados de metabólitos, desempenham funções defensivas no organismo dos peixes, atuando contra células patogênicas e inibindo a replicação de micro-organismos nocivos.

Entre os compostos bioativos mencionados, os taninos apresentam propriedades notáveis, pois possuem a capacidade de danificar membranas celulares bacterianas. Esses compostos ligam-se às paredes de peptidoglicano das bactérias, interrompendo a permeabilidade celular e causando a morte bacteriana (Siregar, 2012). Ainda segundo Siregar (2012), os esteroides também se destacam pelo potencial antibacteriano. Esses compostos são facilmente solúveis em lipídios, o que lhes permite penetrar com maior eficiência nas paredes das células bacterianas, interrompendo seu crescimento e protegendo as vilosidades intestinais e o trato gastrointestinal dos peixes.

As saponinas, por sua vez, são compostas por ativos reconhecidos pela formação de espuma ao entrarem em contato com o meio aquático, comportamento semelhante ao de um sabão. Segundo Ngajow *et al.* (2013), o mecanismo de ação das saponinas consiste na redução da tensão superficial, promovendo um aumento na permeabilidade celular. Essa propriedade facilita a liberação de compostos intracelulares e contribui para a desestabilização das células bacterianas. Assim, as saponinas difundem-se através da membrana externa e da parede celular bacteriana, ligando-se à membrana citoplasmática. Esse processo provoca a ruptura da membrana e a consequente redução da estabilidade da célula bacteriana. Ao danificar os peptidoglicanos, as saponinas demonstram uma potente ação bactericida, conforme descrito por Ngajow *et al.* (2013).

5.6 DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS

As contagens de células sanguíneas totais após o desafio com o patógeno *P. aeruginosa* apresentaram variações nos parâmetros celulares relacionados à imunidade inata e específica em função de cada concentração da dieta. Segundo Guimarães (2011), os valores de leucócitos são mais elevados em tanques escavados ou de lona, controlados pelo homem, do que em tanques-rede. Nas tilápias estudadas por esse autor, os leucócitos totais em μL de sangue apresentaram percentuais de 34,83%, 38,55% e 33,28% maiores em comparação às contagens observadas em tilápias cultivadas em tanques-rede.

Em paralelo a isso, no presente estudo, o patógeno *P. aeruginosa* foi utilizado em conjunto com a imunização dos peixes por meio da farinha de macroalga *K. alvarezii*, buscando validar a resposta imunoestimulante frente à bactéria. Segundo Oshiro (2015), ao tratar peixes com *K. alvarezii* como prebiótico e probiótico, observou-se que diferentes concentrações resultaram em níveis variados de defesa enzimática e celular, além de proporcionar memória imunológica contra patógenos oportunistas. Essa proteção estendeu-se não apenas ao sistema intestinal, mas também ao nível sanguíneo e aos órgãos.

Sakthivel *et al.* (2015) relatam que a administração de macroalgas vermelhas contendo k-carragena, em doses de 10-30 mg/kg, e i-carragena, em 30 mg/kg, via injeção intraperitoneal, aumentou a resistência de robalo-asiático (*Lates calcarifer*) contra infecções bacterianas. Resultados semelhantes foram observados em carpa-comum

(*Cyprinus carpio*) e garoupa (*Epinephelus coioides*). Segundo os autores, os imunoestimulantes podem ser aplicados por injeção, banho ou administração oral, sendo a alimentação a via mais viável para induzir resistência ao longo do tempo, melhorando o desempenho imunológico desde os estágios iniciais.

Os glóbulos brancos desempenham um papel essencial na resposta imunológica dos peixes. Segundo Sakthivel *et al.* (2015), durante os processos inflamatórios, os linfócitos se concentram nas áreas afetadas, enquanto os macrófagos realizam a fagocitose e transferem os resíduos fagocitados para os linfócitos auxiliares CD4. Estes ativam os linfócitos B, que se diferenciam em plasmócitos para produzir anticorpos específicos. Além disso, os macrófagos promovem a diapedese, facilitando a liberação de neutrófilos das artérias e veias, os quais fagocitam micro-organismos invasores. Esses processos, fundamentais para a imunidade inata e adaptativa, são aprimorados pela suplementação com *K. alvarezii*.

Ainda sobre os benefícios das macroalgas, Sakthivel *et al.* (2015) observaram que a inclusão de extratos de polissacarídeos na dieta de robalos-asiáticos estimulou significativamente o sistema imunológico celular. A farinha de *K. alvarezii* promoveu uma ativação robusta da atividade fagocítica, contribuindo para a defesa e a integridade dos órgãos dos peixes. O uso contínuo dessa macroalga resultou na proliferação de linfócitos em trutas-arco-íris e no aumento de glóbulos brancos em garoupas (*Epinephelus malabaricus*), indicando seu potencial imunoestimulante. Além disso, a presença de lisozima, uma enzima associada à Lise bacteriana, foi reforçada, ativando o sistema complemento e melhorando a fagocitose. Esses efeitos foram particularmente evidentes em carpas Jian (*Cyprinus carpio*) e corvinas-amarelas (*Pseudoscianena crocea*), 20 a 30 dias após o início da alimentação com a farinha de *K. alvarezii*.

Por sua vez, Rehan *et al.* (2024) constataram que o uso de óleo de *Origanum vulgare* em Tilápias-do-Nilo desafiadas com *Pseudomonas aeruginosa* resultou em aumentos significativos na contagem total de leucócitos, indicando a ativação do sistema imunológico. Esses autores também enfatizaram que aditivos alimentares, como macroalgas vermelhas, *Mentha piperita* (hortelã-pimenta), extratos de folhas de *Andrographis paniculata*, frutos oligossacarídeos e *Bacillus subtilis*, têm demonstrado melhorias nos parâmetros imunológicos das tilápias, como o aumento dos níveis de globulina no sangue e da resistência a doenças bacterianas.

Em sua pesquisa, Coronel (2016) realizou experimentos in vitro com 11 bactérias patogênicas Gram-negativas e Gram-positivas. Ele destacou que a composição bioquímica de *Kappaphycus alvarezii*, rica em carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos graxos, aminoácidos, esteroides e fenóis, além de metabólitos secundários como terpenoides, florotaninos e flavonoides, confere à alga vermelha propriedades antimicrobianas eficazes contra micro-organismos patogênicos. Em experimentos de inibição bacteriana, Coronel observou que a dieta suplementada com farinha de *K. alvarezii* inibiu o crescimento bacteriano a partir de concentrações de 312,5 mg/mL. Utilizando a técnica de disco-difusão em ágar, foi registrado um halo de inibição de 8,6 mm na concentração de 300 µg do extrato bruto de *K. alvarezii* contra isolados de *Vibrio harveyi* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Além disso, Coronel (2016) verificou que o extrato de *K. alvarezii* foi capaz de inibir 80% (4/5) das cepas de *Vibrio* testadas, incluindo *Vibrio harveyi*. A única exceção foi a *Vibrio alginolyticus*, cuja resistência foi associada à doença ice-ice, que afeta macroalgas vermelhas. Assim, Coronel sugeriu que a inatividade do extrato frente à *Vibrio alginolyticus* está diretamente relacionada à patogenicidade específica dessa bactéria para as macroalgas.

5.7 AVALIAÇÃO DAS LESÕES INTESTINAIS

No presente estudo, foram identificados diferentes níveis de alterações no intestino anterior, localizado a 4,5 cm do estômago, após o duodeno. Essas alterações foram observadas em relação à concentração de farinha de *K. alvarezii* na dieta, que contém compostos bioativos capazes de proteger as vilosidades intestinais. A proteção ocorre por meio da ruptura das paredes celulares das bactérias, o que reduz a necessidade de uma resposta imune exacerbada e contribui para a preservação da integridade do intestino.

Uma das observações trabalhadas com esta macroalga foi Lisboa (2021), na sua pesquisa relata que trabalhou com a bactéria *Streptococcus agalctiae*, e nas observações dos intestinos não suplementados com dietas com farinha de *K. alvarezii* houve aumento das células caliciformes, porém nos peixes com o suplemento da macroalga não houve padrão nessa observação.

Nesse contexto, Lisboa (2021) investigou os efeitos da suplementação de dietas com farinha de *K. alvarezii* em peixes expostos à bactéria *Streptococcus agalactiae*. Seus resultados mostraram que, nos intestinos de peixes sem o suplemento, houve um aumento significativo de células caliciformes. Em contrapartida, nos indivíduos suplementados, não se observou um padrão consistente nesse aspecto. Segundo Lisboa (2021), a presença elevada de células caliciformes é característica de peixes que não receberam aditivos imunoestimulantes. Isso se deve à ação de compostos como taninos, flavonoides, terpenoides, esteroides e saponinas presentes na macroalga, que rompem as paredes celulares bacterianas. Essa ação reduz a demanda funcional das células caliciformes, evitando sua replicação excessiva e, consequentemente, contribuindo para a saúde intestinal.

A relação entre as vilosidades intestinais e as células caliciformes foi aprofundada por Lisboa (2021) e Sakthivel *et al.* (2015). Ambos destacam que a quantidade dessas células pode variar conforme a exposição a patógenos oportunistas. Quando as vilosidades intestinais sofrem lesões devido à ação de microrganismos, as células caliciformes se multiplicam para reparar os danos e proteger a integridade intestinal. Contudo, a suplementação com *K. alvarezii* demonstrou prevenir lesões significativas, mantendo um número estável de células caliciformes. Essa estabilidade reflete a ação dos metabólitos da macroalga, que auxiliam na ruptura das bactérias e evitam danos às vilosidades.

Sakthivel *et al.* (2015) também relataram alterações histológicas no robalo asiático (*Lates calcarifer*) alimentado com dietas contendo *K. alvarezii* e submetido a injeção intraperitoneal. Essas alterações incluíram grandes seios venosos e arteríolas com alta concentração de linfócitos, indicando uma resposta inflamatória significativa. Essa inflamação, embora parte do processo imune, pode prejudicar a absorção de nutrientes e impactar negativamente a eficiência alimentar, comprometendo a saúde geral dos peixes.

Resultados semelhantes foram observados por Ali *et al.* (2021) ao estudar Tilápias-do-Nilo infectadas com *P. aeruginosa*. Essas tilápias apresentaram distensão abdominal, vesícula biliar aumentada e intestino necrosado. Os antibióticos utilizados no estudo foram eficazes no controle da bactéria em outras partes do corpo, mas não promoveram alterações favoráveis no intestino. Isso ocorreu devido à ausência de estímulos para a produção de enzimas intestinais ou a proliferação de compostos bioativos

essenciais, como os taninos e flavonoides presentes na farinha de *K. alvarezii*, que poderiam proteger as vilosidades e preservar a integridade intestinal.

Rehan *et al.* (2024) corroboram essas observações em um estudo com tilápia do Nilo desafiada com *P. aeruginosa*. Os resultados indicaram que a infecção gerou lesões no estômago e intestino. No entanto, o uso de óleo de *Origanum vulgare* demonstrou efeitos positivos, como a melhora das comunidades microbianas intestinais e a redução da inflamação. Os autores atribuíram esses benefícios às propriedades antimicrobianas e sinérgicas do florfenicol, carvacrol e timol presentes no óleo, que neutralizaram os impactos do patógeno e mantiveram a funcionalidade normal do trato gastrointestinal.

5.8 AVALIAÇÃO MORFOMETRICA DAS VILOSIDADES INTESTINAIS E CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS CALCIFORMES DA TILÁPIA DO NILO

A tilápia do Nilo submetida a diferentes dietas durante 75 dias - Kappa 0,00 (controle), Kappa 0,50, Kappa 1,00, Kappa 1,50 e Kappa 2,00% - apresentou variações significativas no crescimento das vilosidades intestinais. O grupo Kappa 0,50 destacou-se como a mais eficaz, promovendo um aumento de até 140,9% no comprimento das vilosidades em relação ao controle, além de maior largura. Já a dieta Kappa 2,00 obteve a segunda melhor performance, apresentando vilosidades mais longas, íntegras e com menor quantidade de células calciformes em comparação aos demais tratamentos.

Em contraste, estudos prévios, como o de Sakthivel *et al.* (2015), apresentaram resultados distintos. Nesse estudo, a duração da imunização foi limitada a 15 dias, resultando em um incremento modesto no comprimento das vilosidades, de apenas 1,7%. Além disso, verificou-se um número elevado de células calciformes, possivelmente devido à insuficiência de metabólitos essenciais para o fortalecimento e proteção das vilosidades contra o desafio imposto pela espécie *Vibrio*.

Por outro lado, a pesquisa conduzida por Ali *et al.* (2021) não teve uma preparação prévia das tilápias antes do desafio com *P. aeruginosa*, o que resultou em taxas de mortalidade elevadas tanto no grupo controle quanto nos diferentes tratamentos. O estudo empregou injeções intraperitoneais de antibióticos, comparando grupos tratados

a cada 24 e 72 horas. Os resultados indicaram menor mortalidade no grupo tratado com injeções a cada 72 horas.

Adicionalmente, Rehan *et al.* (2024) relataram um experimento com duração de 28 dias, no qual administraram óleo de *Origanum vulgare*. Esse tempo, considerado insuficiente para o fortalecimento e o crescimento adequados das tilápias, resultou em mortalidades tanto no controle quanto nos grupos tratados com diferentes doses do óleo. Embora tenha havido algum impacto nas respostas defensivas dos peixes, os resultados não apresentaram significância estatística, limitando as conclusões sobre a eficácia da abordagem.

5.9 AVALIAÇÃO DO FÍGADO DA TILÁPIA DO NILO SOB OS DIFERENTES TRATAMENTOS COM A FARINHA DE *Kappaphycus alvarezii*

Os achados histopatológicos do fígado foram fundamentais para avaliar diferentes qualificações relacionadas ao estado dos hepatócitos, sinusóides hepáticos, vênulas e arteríolas dos centros lobulares do fígado dos peixes. Observou-se que as necroses e os centros melanomacrofágicos desempenharam papel relevante na fagocitose das bactérias presentes. De acordo com Rehan *et al.* (2024), as enzimas ALT e AST atuam como biomarcadores cruciais para avaliar a saúde do fígado e a condição geral dos organismos. Em situações de estresse, como infecção, exposição a xenobióticos ou fatores ambientais adversos, os níveis dessas enzimas, assim como de ureia e creatinina séricas, tendem a aumentar.

A pesquisa conduzida por Rehan *et al.* (2024) indicou que níveis elevados de ALT e AST podem sinalizar doenças hepáticas. Este estudo também investigou os centros melanomacrofágicos e as necroses hepáticas, evidenciando que, com a inclusão progressiva do óleo de *Origanum vulgare* na dieta de tilápias desafiadas com *Pseudomonas aeruginosa*, houve uma redução significativa das alterações hepáticas. O *carvacrol*, principal componente do óleo de *Origanum vulgare*, foi apontado como responsável por reduzir de maneira expressiva as atividades de ALT e AST, protegendo o fígado contra esteatose hepática e lesões hepáticas.

Por outra parte, pesquisas como Ali *et al.* (2021), explica que a *P. aeruginosa* é uma bactéria oportunista que um dos alvos imediatos desta bactéria é o fígado provocando enterite hemorrágica, fígado aumentado e congestionado. Nos achados hepáticos histopatológicos dos peixes não infectado apresentou arquitetura normal do tecido hepático, ausência que quaisquer alterações inflamatórias ou degenerativas. Ali *et al.* (2021) demonstraram que a *P. aeruginosa* é uma bactéria oportunista que atinge rapidamente o fígado, provocando enterite hemorrágica, aumento e congestão hepática. Em suas análises histopatológicas, os peixes não infectados apresentaram arquitetura normal do tecido hepático, sem alterações inflamatórias ou degenerativas. Já os peixes infectados, não tratados, mostraram degeneração vacuolar maciça, necrose focal (com hepatócitos necróticos), picnose e fragmentação nuclear das células hepáticas. Adicionalmente, observaram-se congestão dos sinusóides hepáticos e vasos sanguíneos dilatados, além de infiltrado inflamatório abundante. Peixes tratados com cefotaxima apresentaram apenas vacuolização focal leve. No entanto, aqueles submetidos a tratamento diário demonstraram degeneração vacuolar difusa, necrose e infiltração linfocítica, enquanto o tratamento a cada 72 horas resultou em vacuolização hepática difusa moderada e ausência completa de reações inflamatórias no fígado.

Conforme Ribeiro (2011), em estudos com *Prochilodus argenteus*, peixes teleósteos são ferramentas biomarcadoras importantes devido ao seu papel no topo da cadeia alimentar e à exposição direta ao ambiente aquático. Nestes organismos, o fígado é o principal órgão envolvido na detoxificação de compostos xenobióticos, tornando-se alvo frequente de respostas biomarcadoras em análises de patogenicidade em sistemas aquícolas e estudos de impacto ambiental em rios e cachoeiras. Ribeiro (2011) também destaca que, diante de infecções, os centros melanomacrofágicos podem apresentar-se concentrados ou disseminados no tecido hepático, funcionando como células de *Kupffer* que fagocitam agentes bacterianos. Esse fenômeno pode indicar a capacidade do organismo de resistir ou sucumbir a patógenos.

Além disso, condições de estresse físico, como transporte ou manejo inadequado, podem levar à liberação de cortisol, comprometendo o sistema imunológico. Esse hormônio pode permitir que bactérias previamente controladas pelo sistema imunológico se disseminem, atingindo os macrófagos e, eventualmente, o fígado através do intestino. Dessa forma, a infecção hepática pode ser um reflexo do equilíbrio entre o sistema imunológico e a capacidade patogênica da bactéria.

**5.10 AVALIAÇÃO DO BAÇO DA TILÁPIA DO NILO SOB OS
DIFERENTES TRATAMENTOS COM A FARINHA DE *Kappaphycus
alvarezii***

As avaliações histopatológicas do baço demonstraram sua importância como órgão linfático central na circulação sanguínea, responsável pela filtração de células envelhecidas e pela liberação de linfócitos NK e macrófagos para a fagocitose de células estranhas. Essa atividade resulta na formação de centros melanomacrofágicos, que desempenham papel fundamental na neutralização de corpos estranhos, como destacado por Ribeiro (2011).

Sakthivel *et al.* (2015) reforçam que as investigações sobre o baço em teleósteos têm se concentrado nos compartimentos fundamentais do sistema imunitário, como linfócitos e macrófagos. No estudo com *K. alvarezii* em robalo-asiático (*Lates calcarifer*), observou-se que os centros melanomacrofágicos e linfócitos eram evidentes tanto em peixes alimentados com a dieta controle quanto nas dietas suplementadas com macroalgas vermelhas. Segundo os autores, a imunidade humoral, mediada pelos metabólitos da *K. alvarezii*, intervém no sistema adaptativo, possibilitando a fagocitose não apenas de bactérias, mas também de leucócitos e outras células que completaram seu ciclo de vida.

Lisboa (2021), em sua pesquisa com Tilápias-do-Nilo suplementadas com *K. alvarezii*, destacou que os centros melanomacrofágicos no baço são aglomerações pigmentadas de macrófagos que defendem o organismo contra micro-organismos e auxiliam na destruição de eritrócitos envelhecidos. Ribeiro (2011) complementa que o baço permite apenas a saída de células viáveis, enquanto arteríolas esplênicas necrosadas ou circundadas por centros melanomacrofágicos indicam a presença de patógenos fortes, como bactérias proteolíticas. Nesses casos, macrófagos e linfócitos atuam rapidamente no tecido do baço, particularmente na polpa branca, para combater o patógeno que entra pelos sinusóides esplênicos.

A pesquisa de Ali *et al.* (2021), com *P. aeruginosa* em tilápia do Nilo tratadas com cefotaxima sódica, revelou que essa bactéria oportunista afeta peixes imunocomprometidos, causando septicemia sistêmica. Clinicamente, os peixes apresentaram alta mortalidade, lesões hemorrágicas na pele, distensão abdominal (ascite)

e exoftalmia. Internamente, o baço mostrou-se comprometido, com elevada carga de linfócitos e centros melanomacrofágicos, obstruindo os sinusóides esplênicos e provocando necrose nas paredes vasculares, o que agravou a condição dos peixes.

Rehan *et al.* (2024), em um estudo com tilápia do Nilo desafiadas com *Pseudomonas aeruginosa* e suplementadas com óleo de *Origanum vulgare*, relataram alterações significativas no baço. O exame post-mortem revelou esplenomegalia, aumento da vesícula biliar e ascite no abdômen. A análise bacteriológica confirmou a presença de *P. aeruginosa*. Lesões patológicas no fígado e no baço foram mais pronunciadas nos grupos não tratados, enquanto os grupos suplementados apresentaram redução nas alterações, com destaque para a diminuição dos centros melanomacrofágicos esplênicos.

Os resultados de Rehan *et al.* (2024) sugerem que os centros melanomacrofágicos desempenham um papel essencial na resposta imunitária contra infecções bacterianas. A suplementação dietética com óleo de *Origanum vulgare* promoveu uma melhora no estado imunitário dos peixes, reduzindo a gravidade das lesões no baço. De forma semelhante, os grupos suplementados com farinha de *K. alvarezii* demonstraram que concentrações mais altas da macroalga resultaram em menor impacto da bactéria nos órgãos, incluindo o baço.

Em todos os grupos que receberam suplementação de *K. alvarezii*, observou-se a presença de centros melanomacrofágicos. Entretanto, os metabólitos da macroalga reforçaram o sistema imunológico, permitindo uma resposta fagocitária mais eficiente contra as bactérias, em comparação ao grupo controle (Kappa 0,00). Nesse grupo, os centros melanomacrofágicos estavam mais evidentes e concentrados ao redor das trabéculas esplênicas e arteríolas danificadas pela ação bacteriana.

6. CONCLUSÃO

A inclusão de farinha da macroalga *K. alvarezii* até 2% na dieta de juvenis de Tilápia do Nilo não promoveu melhorias significativas no desempenho produtivo desses peixes. Contudo, o impacto imunológico dos componentes presentes na farinha da macroalga revelou-se notável, especialmente pela influência em células do sistema imunológico, como macrófagos, monócitos, neutrófilos e linfócitos.

1648 Juvenis de tilápia alimentados com dietas suplementadas com farinha de *K.*
1649 *alvarezii* apresentaram órgãos vitais, como fígado, baço e intestino, mais preservados em
1650 comparação aos peixes do grupo controle. A inclusão da macroalga na dieta promove
1651 benefícios importantes para a saúde e resiliência dos peixes diante de desafios
1652 patogênicos.

1653

7. RECOMENDAÇÃO

Recomenda-se a utilização da farinha da macroalga *Kappaphycus alvarezii* como aditivo em dietas para Tilápia do Nilo. A inclusão de até 2,00% da farinha de *K. alvarezii* mostrou-se suficiente para promover imunização e manter a saúde dos peixes em recintos aquícolas. Isso porque o estado de saúde dos peixes é um fator crucial para o crescimento, enquanto a robustez do sistema imunológico garante maior taxa de sobrevivência. Assim, o uso desse aditivo é uma estratégia eficaz para aliar desempenho produtivo à resiliência sanitária no cultivo de tilápias.

8. REFERÊNCIAS

- AJIZAH, Aulia. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* terhadap ekstrak daun psidium guajava l. **Bioscientiae**, v. 1, n. 1, 2018.
- ALI, Nadia Gabr *et al.* Controlling *Pseudomonas aeruginosa* infection in *Oreochromis niloticus* spawners by cefotaxime sodium. **Aquaculture**, v. 544, p. 737107, 2021.
- AMAL, M. N. A., ZAMRI-SAAD, M. Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A Review. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**. v. 34, n. 2, p. 195-206. 2011.
- ARAI, Hiroyuki. Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 103, 2011.
- ASLAN, Laode M. **Budidaya rumput laut**. Kanisius, 1998.
- AZEVEDO, TMP de *et al.* Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, n. 1, p. 41-49, 2006.
- BALASUBRAMANIAN, Deepak *et al.* A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 1, p. 1-20, 2013.
- BOBBARALA, Varaprasad; NAIDU, Chandrasekhar K. An Alternative Approaches for the Control of Sorghum Pathogens Using Selected Medicinal Plants Extracts. **Intech open book series**, 2012.
- BARROSO, Renata Melon *et al.* **Dimensão socioeconômica da tilapicultura no Brasil**. 2018.
- BOSCOLO, Wilson Rogério *et al.* Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1391-1396, 2001.

- 1707 BOTELLO-LEÓN, Aroldo *et al.* Characterization of duckweed and water hyacinth and
 1708 their effect on the apparent digestibility in tilapia. **Revista MVZ Córdoba**, v. 29, n. 2, p.
 1709 e3468-e3468, 2024.
- 1710
- 1711 BRUM, Aline *et al.* Histological changes in Nile tilapia fed essential oils of clove basil
 1712 and ginger after challenge with *Streptococcus agalactiae*. **Aquaculture**, v. 490, p. 98-
 1713 107, 2018.
- 1714 CALINOWSKI, Marina Cristina *et al.* Análise dos efeitos do EDTA e AMPEP sobre o
 1715 crescimento de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) quando submetida à
 1716 exposição ao cobre. 2014.
- 1717
- 1718 CUSHNIE, TP Tim; LAMB, Andrew J. Antimicrobial activity of
 1719 flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.
- 1720
- 1721 DADDAOUA, Abdelali; KRELL, Tino; RAMOS, Juan-Luis. Regulation of glucose
 1722 metabolism in *Pseudomonas*: the phosphorylative branch and entner-doudoroff enzymes
 1723 are regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain. **Journal of Biological**
 1724 **Chemistry**, v. 284, n. 32, p. 21360-21368, 2009.
- 1725
- 1726 DE SOUZA CORNÉLIO, Joana Paula. Os benefícios do uso de aditivos na alimentação
 1727 e saúde de peixes: uma revisão descritiva. **Revista Ibero-Americana de Humanidades,**
 1728 **Ciências e Educação**, v. 1, p. 478-493, 2023.
- 1729
- 1730 DA SILVA, Fabiane Oliveira Martins *et al.* Botânica forense: definição e estudos de
 1731 casos. **Biodiversidade**, v. 22, n. 2, 2023.
- 1732
- 1733 DOGETT, Robert G.; ADUAN, Robert P. *Pseudomonas aeruginosa: clinical*
 1734 **manifestations of infection and current therapy. (No Title)**, 1979.
- 1735
- 1736 DOS SANTOS, Eolando *et al.* EXPORTAÇÃO DA TILÁPIA: as dificuldades e os
 1737 benefícios Na exportação da tilápi brasileira no comércio e exterior. **Revista do CEDS**,
 1738 v. 3, n. 12, 2023.
- 1739
- 1740 EL-BAHAR, Helmy Mohamed *et al.* Virulence genes contributing to *Aeromonas*
 1741 *hydrophila* pathogenicity in *Oreochromis niloticus*. **International Microbiology**, v. 22,
 1742 p. 479-490, 2019.
- 1743
- 1744 EURELL, Jo Ann; FRAPPIER, BRIAN L. Histologia veterinária de
 1745 Dellmann. **Tradução: Fernando Gomes do Nascimento**, 2012.
- 1746

- 1747 FAO 2005-2024. Cultured Aquatic Species Information Programme *Oreochromis*
 1748 *niloticus*. Programa de información de especies acuáticas. Text by Rakocy, J. E. In: FAO
 1749 Fisheries and Aquaculture Division [online]. Rome. Updated . [Cited 20 May 2024].
- 1750
- 1751 FRANCO, Camila Santos. Avaliação da hematologia, morfologia intestinal e
 1752 desempenho de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com β -glucano
 1753 e submetidas a estresse de manejo. 2023.
- 1754
- 1755 FUENTEFRIA, Daiane Bopp et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de
 1756 resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da**
 1757 **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 470-473, 2008.
- 1758
- 1759 FURUYA, Wilson Massamitu et al. Exigência de proteína para alevino revertido de
 1760 tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p.
 1761 1912-1917, 2000.
- 1762
- 1763 FURUYA, Wilson Massamitu et al. Aplicação do conceito de proteína ideal para redução
 1764 dos níveis de proteína em dietas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista**
 1765 **Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1433-1441, 2005.
- 1766
- 1767 Furuya, Wilson Massamitu, and Valéria Rossetto Barriviera Furuya. "Nutritional
 1768 innovations on amino acids supplementation in Nile tilapia diets Inovações sobre o uso
 1769 de aminoácidos industriais em dietas para a tilápia do Nilo." 2010.
- 1770
- 1771 FURUYA, Wilson Massamitu, et al. Digestible lysine requirement of Nile tilapia from
 1772 86 to 227 g fed arginine to lysine balanced diets. 2013.
- 1773
- 1774 FURUYA, Wilson Massamitu. Nutrição de tilápias no Brasil. **Varia Scientia Agrárias**,
 1775 v. 3, n. 1, p. 133-150, 2013.
- 1776
- 1777 FURUYA, Wilson Massamitu et al. Estimation of the dietary essential amino acid
 1778 requirements of colliroja *Astyanax fasciatus* by using the ideal protein concept. **Latin**
 1779 **american journal of aquatic research**, v. 43, n. 5, p. 888-894, 2015.
- 1780
- 1781 FURUYA, Wilson Massamitu; CRUZ, Thais Pereira da; GATLIN III, Delbert Monroe.
 1782 Amino acid requirements for Nile tilapia: An update. **Animals**, v. 13, n. 5, p. 900, 2023.
- 1783

- 1784 GANESAN, Abirami R.; TIWARI, Uma; RAJAURIA, Gaurav. Seaweed nutraceuticals
1785 and their therapeutic role in disease prevention. **Food Science and Human Wellness**, v.
1786 8, n. 3, p. 252-263, 2019.
- 1787
- 1788 GIBSON-CORLEY, Katherine N.; OLIVIER, Alicia K.; MEYERHOLZ, David K.
1789 Principles for valid histopathologic scoring in research. **Veterinary pathology**, v. 50, n.
1790 6, p. 1007-1015, 2013.
- 1791
- 1792 GONÇALVES, Bianca Souza; GOULART, Nathália Souza Silva. Principais aspectos da
1793 *pseudomonas aeruginosa*: revisão bibliográfica. 2021.
- 1794
- 1795 GONZÁLEZ GONZÁLEZ, Erick Ottón et al. **Efecto de la harina de *Moringa moringa***
1796 **oleífera en el crecimiento de Alevines de Tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus***. 2023.
1797 Trabalho de Conclusão de Curso. La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa
1798 Elena, 2023.
- 1799
- 1800 GUIMARÃES, João Menezes et al. Perfil hematológico de tilápias (*Oreochromis*
1801 *niloticus*) cultivadas em Pernambuco. 2011.
- 1802
- 1803 HERNÁNDEZ, Martha; GASCA-LEYVA, Eucario; MILSTEIN, Ana. Polyculture of
1804 mixed-sex and male populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with the Mayan
1805 cichlid (*Cichlasoma urophthalmus*). **Aquaculture**, v. 418, p. 26-31, 2014.
- 1806
- 1807 ISHIKAWA, Nilton Massuo; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; LOMBARDI, J. V.
1808 Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe *Oreochromis*
1809 *Niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, p. 54-63, 2008.
- 1810
- 1811 Koneman EW *et al.* Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 2008.
- 1812
- 1813 KÖHLER, Thilo et al. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*:
1814 respective contributions of OprD and efflux systems. **Antimicrobial agents and**
1815 **chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 424-427, 1999.
- 1816
- 1817 KUBITZA, Fernando. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. F.
1818 Kubitza, 1999.
- 1819
- 1820 LA, CONTRIBUCIÓN A.; LA, ALIMENTARIA Y.; TODOS, NUTRICIÓN PARA. El
1821 estado mundial de la pesca y la acuicultura. **ROMA: FAO**, 2016.

- 1822
- 1823 LIANG, Haihua et al. Identification of mutants with altered phenazine production in
1824 *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of medical microbiology**, v. 60, n. 1, p. 22-34, 2011.
- 1825
- 1826 LIMA L. C., RIBEIRO L. P., LEITE R. C., MELO D. C. Estresse em peixes. **Rev**
1827 **BrasReprod Anim**, Belo Horizonte, v.30, n.3/4, p.113-117, jul./dez. 2006. NOGA, EJ.
1828 **Fish disease, diagnosis and treatment**. St. Louis: Mosby, 1996.
- 1829
- 1830 MANDELL, G. L. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious
1831 Diseases. 2000.
- 1832 Mayhall CG. Hospital Epidemiology and Infection Control. 1 Ed. Lippincott Williams &
1833 Wilkins. (1996).
- 1834
- 1835 MERÍN GUZMÁN, Janeth. **RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN LA TILAPIA**
1836 ***Oreochromis niloticus* CULTIVADA EN UN SISTEMA HIPERINTENSIVO DE**
1837 **BIOFLOC QUIMIOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO Y SUMINISTRADO CON**
1838 **MICROALGAS**. 2023. Dissertação de Mestrado. Centro de Investigaciones Biológicas
1839 del Noroeste, SC.
- 1840
- 1841 MARROQUIN ARROYAVE, Esteban. **Efecto de la inclusión de ingredientes no**
1842 **tradicionales en la alimentación de la tilapia nilótica (*oreochromis niloticus*) sobre**
1843 **parámetros hematológicos y bioquímica sanguínea**. 2018. Tese de Doutorado.
1844 Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 1845
- 1846 Murray P. (1999). Manual of Clinical Microbiology. 9 Ed. Whashington: Washington:
1847 ASM Press
- 1848
- 1849 NAGARANI, N.; KUMARAGURU, A. K. Evaluation of anti-inflammatory, antidiabetic,
1850 cytotoxic activity of *Kappaphycus alvarezii*. 2013.
- 1851
- 1852 NGAJOW, Mercy; ABIDJULU, Jemmy; KAMU, Vanda S. Pengaruh antibakteri ekstrak
1853 kulit batang matoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara in
1854 vitro. **Jurnal Mipa**, v. 2, n. 2, p. 128-132, 2013.
- 1855
- 1856 NURHAYATI, Awik Puji Dyah; ABDULGANI, Nurlita; FEBRIANTO, Rachmat. Uji
1857 toksisitas ekstrak *Eucheuma alvarezii* terhadap artemia salina sebagai studi pendahuluan
1858 potensi antikanker. **Akta Kimindo**, v. 2, n. 1, p. 41-46, 2006.
- 1859

- 1860 OCHOA, Sara A. *et al.* Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*
 1861 resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. **Boletín**
 1862 **médico del Hospital Infantil de México**, v. 70, n. 2, p. 136-150, 2013.
- 1863
- 1864 OKAMURA, D. *et al.* Efeito da vitamina C sobre o hematócrito e glicemia de alevinos
 1865 de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em transporte simulado. **Arquivo Brasileiro**
 1866 **de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 883-888, 2007.
- 1867
- 1868 OETTERER, M. **Industrialização do pescado cultivado**. Guaíba: Agropecuária, 2002.
 1869 200p
- 1870
- 1871 OLIVEIRA, L. K., BAUMGARTNER, L. A., CARDOSO, A. D. S., DUARTE, P.,
 1872 BLATT, T., RIBEIRO, A., ... & HISANO, H. (2023). Parâmetros hematológicos de
 1873 tilápias do Nilo cultivadas em sistema bioflocos com diferentes frequências alimentares e
 1874 proteína dietética subótima. In: INTERNATIONAL FISH CONGRESS & FISH EXPO
 1875 BRASIL, 5., 2023, Foz do Iguaçu.[Anais]. Foz do Iguaçu: Fundep, Unioeste, 2023.
- 1876
- 1877 OLIVEIRA, Luciana Kelly, *et al.* "Parâmetros hematológicos de tilápias do Nilo
 1878 cultivadas em sistema bioflocos com diferentes frequências alimentares e proteína
 1879 dietética subótima." In: INTERNATIONAL FISH CONGRESS & FISH EXPO BRASIL,
 1880 5., 2023, Foz do Iguaçu.[Anais]. Foz do Iguaçu: Fundep, Unioeste, 2023., 2023.
- 1881
- 1882 ÖZEN, Asli I.; USSERY, David W. Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw
 1883 the line with *Azotobacter*?. **Microbial ecology**, v. 63, p. 239-248, 2012.
- 1884
- 1885 PECHÈRE, Jean-Claude; KÖHLER, Thilo. Patterns and modes of β -lactam resistance in
 1886 *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical microbiology and infection**, v. 5, p. S15-S18, 1999.
- 1887
- 1888 PEIXE, BR. Anuário brasileiro da piscicultura. **São Paulo: Associação Brasileira de**
 1889 **Piscicultura**, 2023.
- 1890
- 1891 PEREIRA, Marcelo Menezes de Britto et al. **Uso do farelo de *Ulva fasciata* como**
 1892 **ingrediente em dietas para larvas de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus***. 2023. Tese
 1893 de Doutorado. UFRA/Campus Belém.
- 1894
- 1895 PIERCE, Kenneth V.; MCCAIN, Bruce B.; WELLINGS, S. R. Pathology of hepatomas
 1896 and other liver abnormalities in English sole (*Parophrys vetulus*) from the Duwamish
 1897 River estuary, Seattle, Washington. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 60, n.
 1898 6, p. 1445-1453, 1978.

- 1899 PORTO, Emilia de Paiva et al. Respostas à seleção de características de desempenho em
1900 tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 9, p. 745-752, 2015.
- 1901
- 1902 PRABHA, V.; PRAKASH, D. J.; SUDHA, P. N. Analysis of bioactive compounds and
1903 antimicrobial activity of marine algae *Kappaphycus alvarezii* using three solvent
1904 extracts. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 1,
1905 p. 306, 2013.
- 1906
- 1907 PUPO, Halan Deny Dal. Diversidade da microbiota gram negativa em sistemas de cultivo
1908 de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2006.
- 1909
- 1910 PUSHPARAJ, A.; RAUBBIN, R. S.; BALASANKAR, T. Antibacterial activity of
1911 *Kappaphycus alvarezii* and *Ulva lactuca* extracts against human pathogenic bacteria. **Int**
1912 **J Curr Microbiol App Sci**, v. 3, n. 1, p. 432-436, 2014.
- 1913
- 1914 RAJ, N. Sundar et al. *Aeromonas veronii* caused bilateral exophthalmia and mass
1915 mortality in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) in India. **Aquaculture**, v.
1916 512, p. 734278, 2019.
- 1917
- 1918 RAJAURIA, Gaurav. Seaweeds: a sustainable feed source for livestock and aquaculture.
1919 In: **Seaweed sustainability**. Academic Press, 2015. p. 389-420.
- 1920
- 1921 RAMOS, Gabriela de Albuquerque. **Relatório de Estágio Supervisionado**
1922 **Obrigatório-Laboratório de Aquicultura e Sustentabilidade**. 2022. Trabalho de
1923 Conclusão de Curso. Brasil.
- 1924
- 1925 RANZANI-PAIVA, Maria José Tavares et al. Effects of an experimental challenge with
1926 *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*
1927 (Linnaeus, 1757). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 945-953,
1928 2004.
- 1929
- 1930 RAPATSA, Mmaditshaba M.; MOYO, Ngonidzashe AG. Evaluation of *Imbrasia*
1931 *belina* meal as a fishmeal substitute in *Oreochromis mossambicus* diets: Growth
1932 performance, histological analysis and enzyme activity. **Aquaculture Reports**, v. 5, p.
1933 18-26, 2017.
- 1934
- 1935 RIBEIRO, Heder Jose. Avaliação histopatológica, molecular e bioquímica do fígado,
1936 baço e centros melanomacrofágicos do peixe Teleósteo *Prochilodus argenteus* como
1937 biomarcadores de impacto ambiental no rio São Francisco. 2011.
- 1938
- 1939 REHAN, Mariam Metwally et al. Utilization of *Origanum* oil as a health promoter in
1940 Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Pseudomonas*
1941 *aeruginosa*. **Aquaculture**, v. 584, p. 740683, 2024.
- 1942
- 1943 ROBINSON, Trevor et al. Kandungan organik tumbuhan tinggi. 1995.
- 1944
- 1945 SAKTHIVEL, M. et al. Immunostimulatory effects of polysaccharide compound from
1946 seaweed *Kappaphycus alvarezii* on Asian seabass (*Lates calcarifer*) and it's resistance
1947 against *Vibrio parahaemolyticus*. **J Mar Biol Oceanogr**, v. 4, p. 2, 2015.

- 1948
- 1949 SANTOS, Euler Erlanger Ribeiro dos et al. Internacionalização em PME: análise da
- 1950 cadeia de piscicultura no processo de exportação de pescado no município de Rio Preto
- 1951 da Eva. 2023.
- 1952
- 1953 SANTOS, Carlos Eduardo Carvalho dos. Análise econômica do ciclo de produção de
- 1954 tilápia em tanque rede em Santa Fé do Sul/SP. 2023.
- 1955
- 1956 SAPUTRI, ASTRID MEGA et al. **Pengaruh alga merah (*Kappaphycus alvarezii*)**
- 1957 **Terhadap Jumlah Total Bakteri Dan Nilai Organoleptik Pada Ikan Nila**
- 1958 **(*Oreochromis niloticus*)**. 2014. Tese de Doutorado. UNIVERSITAS AIRLANGGA..
- 1959
- 1960 SCHALCH, Sergio Henrique Canello et al. Eficácia do diflubenzuron no controle de
- 1961 *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus*
- 1962 (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. **Acta Scientiarum. Animal**
- 1963 **Sciences**, v. 27, n. 2, p. 297-302, 2005.
- 1964
- 1965 SCORVO FILHO, João Donato et al. A tilapicultura e seus insumos, relações
- 1966 econômicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 112-118, 2010..
- 1967
- 1968 SHAPAWI, Rossita Shapawi; NIK SITI, Z. S.; SENOO, S. Improving dietary red
- 1969 seaweed *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex. P. Silva meal utilization in Asian seabass
- 1970 *Lates calcarifer*. 2015.
- 1971
- 1972 SHIZUO OWATARI, Marco; LATERÇA MARTINS, Maurício; PEDREIRA
- 1973 MOURIÑO, José Luiz. Lesões cerebrais e perfil hematoimunológico em *Oreochromis*
- 1974 *niloticus* após ingestão de ração infectada com *Streptococcus agalactiae*. **Revista**
- 1975 **Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 16, n. 4, 2022.
- 1976
- 1977 SCHWAIGER, Julia et al. The use of histopathological indicators to evaluate
- 1978 contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**,
- 1979 v. 6, p. 75-86, 1997.
- 1980
- 1981 SILVA, Tacilene Luzia da. **Atividade sinérgica do timol e agentes antimicrobianos**
- 1982 **frente à *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e seus efeitos sobre a biossíntese**
- 1983 **de biofilme e piocianina**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de
- 1984 Pernambuco.
- 1985
- 1986 SIREGAR, Angelina Ferawaty; SABDONO, Agus; PRINGGENIES, Delianis. Potensi
- 1987 antibakteri ekstrak rumput laut terhadap bakteri penyakit kulit *Pseudomonas aeruginosa*,
- 1988 *Staphylococcus epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*. **Journal of marine research**, v. 1,
- 1989 n. 2, p. 152-160, 2012.
- 1990

- 1991 SOUSA, Priscila Carla Lima de. Métodos reprodutivos da tilápia nilótica (*Oreochromis*
1992 *niloticus*), a importância do melhoramento genético: uma revisão de literatura. 2023.
- 1993
- 1994 TASRUDDIN, Tasruddin; ERWIN, Erwin. The Addition of Flour *Kappaphycus alvarezii*
1995 in Commercial Feed towards Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Performance. **Jurnal**
1996 **Perikanan dan Kelautan**, v. 5, n. 2, 2016.
- 1997
- 1998 TAVARES-DIAS, Marcos; RUAS DE MORAES, Flávio. Hematological parameters for
1999 the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively
2000 bred. **Hidrobiológica**, v. 16, n. 3, p. 271-274, 2006.
- 2001
- 2002 TAVARES-DIAS, M., et al. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado
2003 de saúde de peixes em cultivo. In: SARAN NET, A.; MARIANO, W. dos S.; SÓRIA,
2004 SFP (Org.). Tópicos especiais em saúde e criação animal. São Carlos, SP: Pedro & João
2005 Editores, 2009. p. 43-80., 2009.
- 2006
- 2007 TAVARES-DIAS, Marcos, et al. Características hematológicas de teleósteos brasileiros:
2008 IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). *Ciência Rural*, 2002, vol. 32, p.
2009 693-698.
- 2010
- 2011 TAVARES-DIAS, Marcos; MATAQUEIRO, Maria Isabel. Características
2012 hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887
2013 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. *Acta Scientiarum, Biological*
2014 *Sciences*, 2004, vol. 26, no 2, p. 157-62.
- 2015
- 2016 THOMAS, John et al. Pathogenecity of *Pseudomonas aeruginosa* in *Oreochromis*
2017 *mossambicus* and treatment using lime oil nanoemulsion. **Colloids and Surfaces B:**
2018 **Biointerfaces**, v. 116, p. 372-377, 2014.
- 2019
- 2020 TORTAS, Luís Miguel. **Caracterização de Integções de classe 1 em *Pseudomonas***
2021 ***aeruginosa***. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro (Portugal).
- 2022
- 2023 VALENCIA, J. H.; MONTEJO, G.; CARRILLO, L. Manual elaboração de alimento
2024 alternativo para la producción de tilapia. **Recuperado el**, v. 6, 2014.
- 2025
- 2026 WEBBER, Vanessa et al. Otimização da extração de carragenana obtida de
2027 *Kappaphycus alvarezii* através da metodologia de superfície de resposta. In: **Congresso**
2028 **Brasileiro de Polímeros–Foz do Iguaçu, PR**. 2009.
- 2029
- 2030 XIMENES, Luciano Feijão; VIDAL, Maria De Fatima. Pesca e Aquicultura:
2031 Piscicultura. 2023.

2032

2033 YUNUS, Y.; ARISANDI, Apri; ABIDA, Indah Wahyuni. Daya hambat ekstrak metanol
2034 rumput laut (*Euchema spinosum*) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*. **Jurnal**
2035 **Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 99-
2036 105, 2009.

2037