

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANTONIO ERNESTO MEISTER LUZ MARQUES

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE RAÇÕES PRODUZIDAS COM A BIOMASSA
RESIDUAL DE MICROALGAS UTILIZANDO OS PEIXES *Rhamdia quelen* E
Oreochromis niloticus

CURITIBA

2018

ANTONIO ERNESTO MEISTER LUZ MARQUES

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE RAÇÕES PRODUZIDAS COM A BIOMASSA
RESIDUAL DE MICROALGAS UTILIZANDO OS PEIXES *Rhamdia quelen* E
Oreochromis niloticus

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Genética, no Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Margarete Cestari.

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Marques, Antonio Ernesto Meister Luz

Avaliação da toxicidade de rações produzidas com a biomassa residual de microalgas utilizando os peixes *Rhamdia quelen* e *Oreochromis niloticus*. / Antonio Ernesto Meister Luz Marques. – Curitiba, 2018.

94 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Marta Margarete Cestari

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Ácidos graxos. 2. Biomarcadores. 3. Biomassa. 4. Carotenoides. 5. Peixe. I. Título. II. Cestari, Marta Margarete. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 589.3



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ANTONIO ERNESTO MEISTER LUZ MARQUES** intitulada: **Avaliação da toxicidade de rações produzidas com a Biomassa Residual de microalgas utilizando os peixes *Rhamdia quelen* e *Oreochromis niloticus***, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Março de 2018.

MARTA MARGARETE CESTARI
Presidenta da Banca Examinadora

RAFAEL ERNESTO BALEN
Avaliador Externo

FLAVIO HENRIQUE TINCANI OSORIO
Avaliador Externo

WANESSA ALGART RANSDORF
Avaliador Externo

IZONETE CRISTINA GUILOSKI
Avaliador Externo

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Dra. Marta Margarete Cestari, por toda a amizade durante todos esses anos no Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental.

Aos Professores José Vargas e André Bellini, pela parceria com o NPDEAS e a possibilidade de desenvolver esse trabalho em conjunto.

Ao Prof. Dr. Fábio Meurer do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos da Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina, pela parceria realizada e por todos os esforços empregados.

À Prof. Dr. Helena Cristina Silva de Assis e a Letícia Pereira pela amizade e por toda ajuda na realização deste trabalho.

Ao Doutor Rafael Ernesto Balen, por toda a sua amizade, ajuda, paciência, empenho e trabalho durante todos esses anos de amizade.

Aos membros da banca, Doutora Izonete Cristina Guiloski, Professora Doutora Wanessa Algarte Ramsdorf, um exemplo de dedicação e competência em suas atividades de pesquisa, além todo o conhecimento passado nos primórdios dos anos como estagiário. Ao Doutor Flávio Tincani pela nossa amizade frente a muitas conversas e discussões.

Aos meus queridos amigos de laboratório em especial, Gustavo, Juliana, Emanuele, Gabriela, Ana Carol, que transformam o laboratório em um ótimo ambiente!

A Taynah Vicari, Laís Oya, Laercio Piacini, Rodrigo Disner e Mariana Torres, um especial obrigado com muito amor e carinho, por todos os nossos dias juntos conversando e tornando alegre os momentos mais difíceis que nós passamos durante essa etapa das nossas vidas.

Aos estagiários e técnicos que fizeram parte do laboratório durante esses anos.

Aos meus especiais e queridos amigos da graduação. Em especial ao Vinicius, Fábio, Tiago e Luis que pelas nossas muitas conversas, tornaram esses muitos momentos juntos, durante o doutorado, mais divertido, engraçado e inspirador.

À minha amada, admirável e inspiradora Camila da Costa Senkiv, que sempre me surpreende por toda a força e determinação durante todos esses anos

juntos. Agradeço por todos o apoio, ajuda, carinho, companheirismo e, principalmente, por todos os dias que você continua iluminando a minha vida.

Aos meus queridos pais Regina e Paulo, por todo o amor, carinho, dedicação e apoio durante toda uma vida.

“Quando a educação não é libertadora, o sonho do oprimido é ser o opressor.”

Paulo Freire

RESUMO

As microalgas são produtoras de diversos compostos destacando-se o potencial de substituir o petróleo no fornecimento de combustíveis, matéria-prima para indústria química e grande capacidade para desenvolvimento de alimentos. A produção de microalgas através de reatores compactos tem se mostrado uma grande promessa nesta área. As microalgas *Acutodesmus obliquus* (*Scenedesmus obliquus*), são cultivadas em fotobiorreatores de sistema fechado (FBSF) construídos com tubos de PVC transparente. As microalgas são processadas para a retirada da porção lipídica, gerando uma biomassa residual de microalgas (RAB) ao final da produção. Essa RAB pode ser utilizada na produção de ração animal e é uma das alternativas para a utilização deste resíduo. Nesta tese buscou-se verificar o risco toxicológico da utilização da RAB pura e quando adicionada em rações nas proporções de adição de 1%, 2% e 3%, para isso foram utilizados biomarcadores bioquímicos e genéticos em duas espécies de peixes de grande utilização em pisciculturas, *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) e *Rhamdia quelen* (bagre conhecido popularmente como Jundiá). As duas RABs utilizadas neste trabalho são oriundas dos FBSF utilizando dois meios de cultivo diferentes, a RAB-A cresceu em meio Chu e a RAB-B cresceu em meio biodigerido de dejetos suíno [5%]. Os peixes foram submetidos ao ensaio, agudo, com duração de 96h, onde ocorreu a alimentação das RABs puras para as duas espécies, e ensaios subcrônicos, com duração de 60 dias, onde os peixes foram alimentados com rações produzidas com a suplementação das RABs (1%, 2%, e 3%). Os resultados demonstraram que as RABs apresentam redução dos níveis de lipoperoxidação no tecido hepático e de danos genéticos em células sanguíneas, hepáticas e cerebrais, também aumentaram a atividade da acetilcolinesterase cerebral e muscular. As RABs apresentam boas perspectivas para a sua utilização na produção de rações, as duas espécies apresentaram respostas positivas com as alimentações nos ensaios agudos e subcrônicos, mostrando que as microalgas apresentam um potencial benéfico para a alimentação, mesmo após o seu processamento para extração de lipídios.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Biomarcadores. Biomassa de microalgas. Carotenoides. Peixes.

ABSTRACT

The production of microalgae through compact reactors has shown great promise in this area. The microalgae *Acutodesmus obliquus* (*Scenedesmus obliquus*), are cultivated in closed-system photobioreactors (FBSF) constructed with transparent PVC tubes, the microalgae are processed to remove the lipid portion, generating a residual microalgae biomass (RAB) at the end of production. This RAB still presents a large part of the elements of the *in natura* microalgae, which are recognized as beneficial in food, so its use in the production of animal feed is an alternative. The aim of this thesis was to verify the toxicological potential of pure RAB and when added in 1%, 2% and 3% rations using biochemical biomarkers and genetic biomarkers in two fish species of significant use in fish farms, *Oreochromis niloticus* (Tilapia Nile) and *Rhamdia quelen* (catfish commonly known as Jundiá). The two RABs used in this work are from the FBSF using two different culture media, RAB-A was grown in Chu medium and RAB-B was grown in biodigested pig manure (5%) medium. The fish underwent two types of tests, acute, with a duration of 96 hours, where pure RAB feeding was carried out for both species, and subchronic tests, with a duration of 60 days, where the fish were fed with rations produced with the supplementation of RABs. The results showed that RABs generally present responses such as reduction of lipoperoxidation levels, increased activity of cerebral acetylcholinesterase, and may reduce damage to genetic material in tissues such as erythrocytes, liver tissue and brain. The RABs present good prospects for their use in feed production, both species presented positive responses with feeds in the acute and subchronic tests, showing that microalgae present a beneficial potential for feeding, even after their processing for lipid extraction.

Keywords: Biomarkers. Biomass of microalgae. Carotenoids. Fatty acids. Fish.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
1.1	MODELO DE ESTADO.....	15
1.1.1	<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>	16
1.1.2	<i>RHAMDIA QUELEN</i>	17
1.2	BIOMARCADORES	17
1.2.1	BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	18
1.2.2	BIOMARCADORES GENÉTICOS	22
2.	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3.	CAPÍTULOS	26
3.1	CAPÍTULO 1: RESPOSTAS AGUDA DE BIOMARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS DOS PEIXES <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> E <i>RHAMDIA QUELEN</i> SUBMETIDOS À ALIMENTAÇÃO POR BIOMASSA RESIDUAL DA MICROALGA <i>ACUTODESMUS OBLIQUUS</i>	27
3.1.1	Introdução.....	28
3.1.2	Material e Métodos	29
3.1.2.1	Cultivo das Algas, extração lipídica e determinação dos pigmentos	29
3.1.2.2	Alimentação dos peixes	30
3.1.2.3	Biomarcadores Bioquímicos	31
3.1.2.4	Biomarcadores Genéticos	33
3.1.2.5	Análise estatística	34
3.1.3	Resultados.....	35
3.1.3.1	Análise Bromatológica	35
3.1.3.2	Determinação da clorofila	35
3.1.3.3	Índice Hepatosomático (IHS)	35
3.1.3.4	Biomarcadores Bioquímicos	36
3.1.3.5	Biomarcadores Genéticos	39
3.1.4	Discussão	41
3.1.5	Conclusão.....	44

3.2	CAPÍTULO 2: UTILIZAÇÃO CRÔNICA DA BIOMASSA RESIDUAL FRACIONADA EM 1%, 2% E 3% DE <i>ACUTODESMUS OBLIQUUS</i> NA COMPOSIÇÃO DE RAÇÃO PARA PEIXES DA ESPÉCIE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> : UMA ABORDAGEM INTEGRANDO BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS	46
3.2.1	Introdução.....	47
3.2.2	Material e Métodos	48
3.2.2.1	Cultivo, extração lipídica e determinação dos pigmentos em microalgas	48
3.2.2.2	Produção da ração e regime dos peixes	49
3.2.2.3	Biomarcadores Bioquímicos	50
3.2.2.4	Biomarcadores Genéticos	51
3.2.2.5	Análise estatística.....	53
3.2.3	Resultados.....	53
3.2.3.1	Determinação da clorofila e composição da RAB.....	53
3.2.3.2	Biomarcadores Bioquímicos	54
3.2.3.3	Biomarcadores Genéticos	57
3.2.4	Discussão	59
3.2.5	Conclusão.....	62
3.3	CAPÍTULO 3: DIETAS CONTENDO BIOMASSA RESIDUAL DE MICROALGAS PROTEGEM OS PEIXES CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO E OS DANOS AO DNA	64
3.3.1	Introdução.....	65
3.3.2	Material e Métodos	66
3.3.2.1	Determinação dos pigmentos da RAB.....	66
3.3.2.2	Biomarcadores bioquímicos e genéticos	67
3.3.2.3	Análise estatística.....	69
3.3.3	Resultados.....	70
3.3.4	Discussão	73
3.3.5	Conclusão.....	75
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE 1 - CERTIFICAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (CEUA)	94

1 INTRODUÇÃO

O aumento da preocupação mundial com o ambiente, principalmente devido às alterações climáticas, leva à necessidade de desenvolvimento de alternativas para a utilização de energias não renováveis (BRENNAN; OWENDE, 2010; AZQUETA et al. 2015; FAO, 2017). Em nossa sociedade, chegamos a um momento em que é necessário desenvolver tecnologias sustentáveis para suprir a demanda energética tanto atual como futura. Fontes renováveis precisam garantir a sustentabilidade do processo de produção de energia e de alimentos (RADMANN; COSTA, 2008; ENZING et al. 2014). No caminho para a criação das novas tecnologias para a redução dos impactos econômicos e ambientais, podem ser a chave para um futuro promissor. O consumo atual de petróleo está 100.000 vezes mais rápido que a capacidade de reposição natural. Com a limitação dos estoques de combustíveis fósseis e a sua utilização contribuindo para o aumento dos níveis de CO₂ atmosférico, o resultado será o esgotamento de recursos e o aumento do efeito estufa, que é reconhecido atualmente como maléfico para a humanidade (SATYANARAYANA et al. 2011).

Os primeiros passos para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis já foram dados. A criação dos biocombustíveis de primeira geração (ex: etanol e biodiesel de oleaginosas) marca esse momento na história do Brasil com a utilização do Alcool Hidratado (1979) na frota de veículos nacionais e com a introdução e utilização do biodiesel (MEURER et al. 2012). Atualmente, as biorrefinarias tem como base de produção as culturas terrestres (soja, milho, ...) gerando os biocombustíveis líquidos: bioetanol e o biodiesel, os quais competem por recursos ecológicos, com a matéria prima destinada a produção de alimentos, extração de seus componentes e o seu processamento, sendo necessário desenvolver biorrefinarias que não constituam uma carga ambiental (CESÁRIO et al. 2018), assim, fugindo da utilização de *commodities*.

Contudo, enfrentamos uma dificuldade na obtenção dos biocombustíveis em relação aos combustíveis fósseis, que são obtidos em grande escala e com baixo custo. A produção de biocombustíveis requer uma eficiência energética compensatória, onde o balanço na obtenção da energia seja positivo. Sistemas onde existe multigeração de coprodutos tornam essa conquista plausível. O melhoramento,

a otimização e o controle desses tipos de sistemas são aspectos cruciais para alcançar bons resultados (VARGAS et al. 2014).

Para substituir os biocombustíveis de primeira geração, competidores de áreas agriculturáveis, é necessário estar dentro das condições dispostas no Ato dos Padrões de Combustíveis Renováveis (SISSINE, 2007), que outorga às microalgas a candidatura mais promissora para a produção de biocombustíveis de segunda geração, onde não há competição por áreas agriculturáveis e água potável, evitando concorrência por esses recursos (BEAL et al. 2015).

As microalgas, apresentam uma grande diversidade de espécies e são a base da cadeia alimentar nos mares e rios. Como formam um grupo extremamente diversificado, conseguem habitar diferentes ambientes (SATYANARAYANA et al. 2011). As microalgas são, entre o fitoplâncton, o maior grupo de eucariotos unicelulares, que vivem de forma individual, agregada ou filamentosa em todos os ambientes aquáticos (METTING, 1996). Elas são responsáveis por mais de 50% da atividade fotossintética primária no planeta (CHISTI, 2007), consequentemente disponibilizando cerca da metade do oxigênio atmosférico.

O grande interesse no cultivo em massa de microalgas é devido aos muitos produtos que são capazes de produzir, dentre os quais o biocombustível. O interesse nesse biocombustível à base de microalgas pode atrair pesquisas inovadoras e investimento em biotecnologias, o que poderá motivar o empreendedorismo nessa nova tecnologia. Uma visão geral da biotecnologia em microalgas é essencial para fornecer um bom plano de fundo com perspectivas para a compreensão e desenvolvimento de pesquisas, pois esta biotecnologia apresenta uma gama enorme de bioprodutos que poderão ser promissores nesse mercado (RICHMOND; HU, 2013).

Essencialmente, as microalgas são as principais fornecedoras de energia nos ecossistemas aquáticos, pois transformam nutrientes inorgânicos em moléculas orgânicas energéticas (MURDOCK; WETZEL, 2009). Como são as produtoras primárias no ambiente aquático, são eficientes no processo fotossintético, apresentando requisitos nutricionais simples, juntamente com características biotecnológicas de importância, como crescimento rápido, cultivo em larga escala e obtenção de diversas biomoléculas (SÁNCHEZ et al. 2008). Além disso, apresentam um mercado amplo em produtos derivados, sendo a suplementação na alimentação

humana já bem estabelecida e uma das principais utilizações das microalgas (CAMPO, DEL et al. 2007; SATYANARAYANA et al. 2011; CESÁRIO et al. 2018), e também já foram testadas como fonte de alimentos sob mais aspectos do que os produtos alimentares tradicionais (*commodities*) (PULZ; GROSS, 2004; GUEDES et al. 2011; RICHMOND; HU, 2013; BECKER et al. 2013; KOMOLAFE et al. 2014).

A produção de biodiesel através da extração de óleo de microalgas tem sido recentemente considerada uma matéria-prima em potencial (PATNAIK; MALLICK, 2015). As microalgas podem ser cultivadas em sistemas abertos, porém sofrem muita interferência do ambiente e, normalmente, é utilizada uma mistura de espécies para comportar essas condições (PARK et al. 2011). A produção da monocultura da microalga *Acutodesmus obliquus* (*Scenedesmus obliquus*) está sendo realizada em fotobiorreatores de sistema fechado (FBSF), o qual maximiza o cultivo destas microalgas com o melhor aproveitamento da luz solar e com o objetivo de alta produtividade dentro de um volume fixo (SATYANARAYANA et al. 2011). Dentro dos fotobiorreatores com sistema fechado, há uma redução drástica da evaporação durante o cultivo das microalgas, sendo esse sistema o mais plausível para atuar na produção microalgas em terras e localidades onde não são possíveis as plantações tradicionais, logo não irão competir por áreas de produção de alimentos. Os processos para obtenção da biomassa gerada nos FBSF apresentam condições para a recuperação da água utilizada, melhorando ainda mais a eficiência nesse sistema.

Um ponto central na utilização das microalgas é o desenvolvimento de metodologias para o seu emprego com a padronização de todos os processos de produção como o cultivo, a separação/floculação, a obtenção da biomassa seca, a extração dos lipídios e a utilização da biomassa residual (SATYANARAYANA et al. 2011; PATNAIK; MALLICK, 2015). A valorização dos coprodutos como o óleo extraído para a produção de biocombustíveis e da biomassa residual para suplementação ou substituição de componentes nas rações, podem permitir o desenvolvimento sustentável e econômico dos cultivos de microalgas (WALSH et al. 2018).

Consideradas como parte de uma dieta saudável, as microalgas contêm diversos ácidos graxos (Tabela 1) como o ômega-3 (ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), proteínas, aminoácidos, pigmentos, vitaminas e minerais (CHRISTAKI et al. 2011; RASALA; MAYFIELD, 2015). Também servem como reservatório de compostos biologicamente ativos, apresentando estruturas e

funções únicas (YAMAGUCHI, 1996). Os ingredientes potencialmente ativos, incluindo o β -caroteno, a astaxantina, a luteína, as ficobiliproteínas, diversos pigmentos e fibras insolúveis extraídas das espécies de *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Porphyridium* e *Scenedesmus*, são relatadas por seus efeitos antioxidantes, cardioprotetores, hepatoprotetores, anti-inflamatórios e anti-hiperlipidêmicos (CAMPO, DEL et al. 2007; PLAZA et al. 2009; LORDAN et al. 2011; BEAL et al. 2015; CESÁRIO et al. 2018).

TABELA 1: COMPOSTOS INSATURADOS DA MICROALGA *Acutodesmus obliquus*

COMPOSIÇÃO	QUANTIDADE (%)
Ácido miristoleico	1,59 ± 0,01
Ácido Z-10-pentadecanóico	0,59 ± 0,03
Ácido palmitoleico	3,24 ± 0,04
Ácido Z-10-heptadecenoico	0,55 ± 0,02
Ácido elaídico	3,65 ± 0,03
Ácido oleico	18,30 ± 0,03
Ácido linolelaídico	1,47 ± 0,01
Ácido linoleico	1,48 ± 0,01
Ácido γ -linolênico	10,00 ± 0,02
Ácido linolênico	16,67 ± 0,02
Ácido Z-11-eicosenóico	2,84 ± 0,01
Ácido Z-11,14-eicosadienóico	0,28 ± 0,06
Ácido Z-8,11,14-eicosatrienóico	1,26 ± 0,06
Lipídios totais	61,92

Fonte: (ESCORSIM et al. 2018).

Apesar das microalgas apresentarem um grande potencial para agregarem valor nutricional em alimentos e rações (CUSTÓDIO et al. 2014), elas não ganham a devida importância na alimentação ou na substituição de ingredientes. As características da biomassa como cor, cheiro e sabor acabam limitando a sua utilização em alimentos, pois apenas pequenas quantidades podem ser adicionadas antes de alterar a consistência, o sabor e a aparência dos alimentos. As vendas diretas para o consumo podem ser encontradas no chamado mercado de alimentos saudáveis, onde é vendido o pó de algas encapsulado. Contudo, na alimentação animal, a utilização é mais recente, demonstrando grande adequabilidade em

suplementar ou substituir fontes convencionais de proteína como o farelo de soja, a farinha de peixe e o farelo de arroz. Um mercado em crescimento é o da utilização de microalgas para a aquicultura, estimando-se que cerca de 30% da produção mundial atual seja destinada para aplicação em rações animais (BECKER, 2007).

Embora tenha reconhecimento o valor nutricional da biomassa do gênero *Scenedesmus*, a demanda atual do mercado é maior do que a capacidade de sua produção (FRADIQUE et al. 2010; KUMAR et al. 2015). A biomassa de microalgas desse gênero são frequentemente utilizadas como aditivo alimentar combinando-se com outras fontes proteicas (MUSTAFA; NAKAGAWA, 1995; CERÓN et al. 2008; RICHMOND; HU, 2013; NORAMBUENA et al. 2015) e sua utilização *in natura* já está bem estabelecida (PABST et al. 1976; KRISHNAKUMARI et al. 1981; LAZO et al. 2000; RADMANN; COSTA, 2008; CUSTÓDIO et al. 2014; CHIATTONI et al. 2015; KUMAR et al. 2015), podendo, mesmo após a extração de óleo, ser usada na piscicultura para enriquecer nutricionalmente a ração.

Após a extração do óleo, o material remanescente, conhecido como a Biomassa Residual de Algas (RAB), pode ser aproveitado para a suplementação, como um ingrediente alternativo, na alimentação animal (BALEN et al. 2015). É importante ressaltar que as tecnologias de extração devem trabalhar para preservar a funcionalidade dos vários componentes celulares (como proteínas, vitaminas, lipídios, carboidratos, ácidos graxos), pois não degradar os diversos produtos existentes é um passo importante para a exploração de todos os compostos (WANG et al. 2014).

1.1 MODELO DE ESTADO

Os modelos de estado são organismos utilizados em diversos estudos para avaliar as condições gerais geradas por xenobióticos no ambiente a que ele está exposto. Os organismos devem apresentar respostas preferencialmente sensíveis frente ao agente estressor e, além da sua abundância no ambiente, deve apresentar uma boa capacidade de adaptação aos ambientes laboratoriais (PANDRANGI et al. 1995).

Entre os organismos, podem existir diferenças nos padrões de metabolização de diferentes substâncias. Essa variação faz com que as respostas dos organismos não sejam idênticas frente as mesmas condições, influenciando na metabolização de

diferentes substâncias. Os modelos utilizados são definidos como organismos que conseguem informar as condições do ambiente no qual estão inseridos, através do seu comportamento, sua presença ou ausência, respostas fisiológicas, efeitos sobre órgãos, tecido, células e metabolismo (PANDRANGI et al. 1995; OOST et al. 2003). Sendo assim, o bioindicador é um organismo ou uma população que contém uma série de informações sobre as qualidades do ambiente que habitam ou sobre uma parte dele (MARKERT, 2008; ŁUCZYŃSKA et al. 2018).

Peixes são modelos ideais para utilizar em avaliações para teste de novas substâncias, pois apresentam respostas semelhantes aos dos vertebrados superiores, podendo informar diferentes tipos de alterações que essas substâncias possam causar, sendo elas benéficas ou não, além de representarem um importante elo na cadeia alimentar (GIULIO, DI; HINTON, 2008; RAMSDORF et al. 2012; BACOLOD et al. 2017). A sua utilização dos peixes é cada vez mais frequente, a importância da sua utilização é a observação e detecção de problemas de forma precoce, onde os efeitos de uma substância é observada antes de atingir o ambiente (OOST et al. 2003).

1.1.1 *OREOCHROMIS NILOTICUS*

A espécie *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Perciformes: Cichlidae), popularmente conhecida como a Tilápia do Nilo, é um peixe estuarino com grande capacidade de adaptação a diferentes tipos de ambientes, suportando transições da água doce até águas marinhas. Essa plasticidade é uma característica que permite a avaliação de diversos ambientes com apenas uma espécie (BACOLOD et al. 2017).

Ainda é considerada como a segunda espécie de peixe mais consumida mundialmente, com ampla produção mundial, sendo bem adaptada a sistemas de produção (MCANDREW et al. 2016). Apresenta um hábito onívoro e se adapta com facilidade a vários tipos de alimentação. Também apresenta altas taxas de fecundidade com capacidade de reprodução em todas as estações. A espécie *O. niloticus* é amplamente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos, programas de monitoramento ambiental e testes laboratoriais (SHIAU; LIANG, 1995; WU et al. 2003; DANTZGER et al. 2018; SANTANA et al. 2018).

1.1.2 RHAMDIA QUELEN

A espécie *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Siluriformes: Heptapteridae), conhecido popularmente como Jundiá, é um peixe de água doce, onívoro, amplamente distribuído que ocorre desde a região central da Argentina até o sul do México (SILVERGRIP, 1996). Tem preferência por ambientes lênticos com fundo de areia e lama, vivendo em poços fundos dos rios ou em lagos (GOMES et al. 2000). É a principal espécie cultivada na porção meridional da América do Sul, devido à rápida taxa de crescimento durante os meses quentes e pela capacidade de suportar invernos rigorosos (PEREIRA et al. 2006; SALHI; BESSONART, 2012).

R. quelen é uma espécie que precisa de atenção no seu pré-transporte, pois é uma etapa onde o estresse pode ocasionar maiores problemas do que o transporte em si, requerendo muita atenção e podendo ser recomendada a utilização de substâncias sedativas (SACCOL et al. 2018). A espécie *R. quelen* também é amplamente utilizada na pesquisa toxicológica (BARCELLOS et al. 2004; KAIZER et al. 2009; RAMSDORF et al. 2009; PRETTO et al. 2010; TSUDA et al. 2010; PAMPLONA et al. 2011; GHISI et al. 2011; SALHI; BESSONART, 2012; KREUTZ; BARCELLOS, 2012; BALDISSEROTTO et al. 2014; PIANCINI et al. 2015; GHELFI et al. 2016; GUILOSKI; STEIN PIANCINI; et al. 2017), atuando como um reconhecido bioindicador.

1.2 BIOMARCADORES

O termo biomarcador, junção de “marcador biológico”, refere-se a uma série de indicações que são possíveis de serem observadas e quantificadas nos processos biológicos. Existem várias definições que se sobrepõem respeitosamente (STRIMBU; TAVEL, 2010). A Organização Mundial da Saúde (WHO), caracteriza biomarcadores como qualquer substância, estrutura ou processo que possa ser medido no animal ou em seus produtos e consiga prever a incidência ou o resultado de alguma diversidade que esteja ocorrendo com o indivíduo (WHO, 2001). Os biomarcadores, podem ser classificados como uma medida funcional da exposição a substâncias teste ou a xenobióticos, que são expressadas ao nível de organização biológica sub-individual (ADAMS et al. 2001). Recentemente, biomarcador pode ser atribuído como

um sinal clínico, saudável ou não, sozinho ou em combinação com outros biomarcadores e fatores, que em conjunto mostram o estado clínico do animal (WATT, 2018).

As respostas obtidas dentro de um conjunto de biomarcadores podem ser utilizadas para demonstrar a potencialidade da reação das substâncias com os organismos testados, assim essas respostas podem ser benéficas ou não, de modo que são amplamente utilizadas em testes laboratoriais, testando diferentes compostos ou mesmo em ensaios ecotoxicológicos, para a avaliação de xenobióticos presentes no ambiente. Como pode-se observar, quando ocorre uma alteração no equilíbrio homeostático dos mecanismos antioxidantes um desbalanceamento nesse sistema pode ocorrer, resultando no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ocasionando danos oxidativos em macromoléculas (LIVINGSTONE, 1998). Ao utilizar uma abordagem multi-biomarcadores, é possível obter uma resposta integrada e determinar uma relação com as possíveis causas e consequências aos organismos. Essa integração traz maior confiabilidade aos resultados e é essencial nas avaliações de causa e efeito (YAMAMOTO et al. 2016; SANTANA et al. 2018).

1.2.1 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Todos os animais apresentam uma diversidade de enzimas para a realização de biotransformação, os quais geralmente estão presentes em grande quantidade no órgão responsável pelo processamento dos alimentos nos vertebrados, o fígado. A maior função dessas enzimas é a conversão de xenobióticos orgânicos hidrofóbicos e lipossolúveis em compostos hidrossolúveis. As enzimas de primeira fase atuam oxidando, reduzindo ou hidrolisando os compostos por meio da introdução ou modificação de um grupamento funcional (-OH, -COOH, etc.). As enzimas de segunda fase atuam introduzindo uma molécula polar (glutathiona, sulfato, aminoácido). A biotransformação afeta a disposição, a toxicidade (diminuindo ou aumentando) e o tempo de permanência de uma substância ou xenobiótico no organismo (LIVINGSTONE, 1998)

A utilização de enzimas extraídas de órgãos como o fígado, cérebro para avaliação em estudos de toxicologia em peixes, é altamente relevante para monitorar as funções vitais, como a capacidade de biotransformação e excreção desses

organismos (BEGUM, 2005). Alterações nas atividades de enzimas presentes no fígado de peixes podem ser consideradas como biomarcadores sensíveis em estudos de toxicologia, predizendo respostas precoces de organismos possivelmente contaminados e servindo como uma ferramenta para avaliações de substâncias e para questões ambientais no campo da ecotoxicologia (DANTZGER et al. 2018). As atividades das enzimas antioxidantes e o nível de radicais livres podem estar correlacionados a várias condições fisiológicas ou patológicas, sendo possível observar a alteração da atividade de enzimas antioxidantes, em diferentes tipos de testes (ALIKO et al. 2018).

A redução dos efeitos prejudiciais das ROS pode ser efetuada por dois tipos de defesa antioxidante. A defesa antioxidante não enzimática que inclui os compostos com propriedades antioxidantes intrínsecas, como as vitaminas C e E, a glutathiona e o β -caroteno. As defesas puramente enzimáticas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as peroxidases (GPx), as quais vão exercer uma função protetora direta por eliminação dos radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, convertendo-os em espécies com menor teor de reatividade. As SODs catalisam a dismutação do radical superóxido (O_2^-) para o peróxido (H_2O_2), e a CAT e as peroxidases vão reduzir o H_2O_2 para $2H_2O$. As reações de oxirredução são parecidas, SOD e CAT utilizam substratos diferentes, O_2^- para a SOD e H_2O_2 para a CAT e as peroxidases, sendo necessárias diferentes reduções, dependendo das suas especificidades (Figura 1). As SODs atuam primeiramente na redução univalente de O_2 , convertendo em H_2O_2 , que, por sua vez, deve ser eliminado pela CAT ou peroxidases. Dessa forma, a SOD e a CAT atuam, em conjunto, como a primeira linha das defensas antioxidantes (SCANDALIOS, 2005).

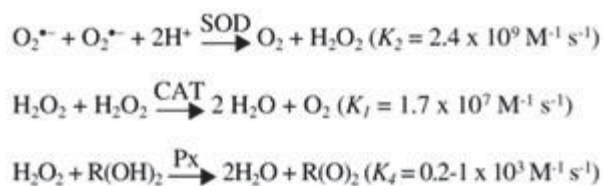
O papel da superóxido dismutase (SOD) como defesa antioxidante é amplamente documentado (GARDNER et al. 2002). As SODs foram isoladas e caracterizadas em diversos organismos. As classes consistem em SODs com Cu (II) mais Zn (II) no sítio ativo (Cu / ZnSOD), a outra classe com Mn (III) (MnSOD), uma terceira classe com Fe (III) (FeSOD) e uma quarta classe com Ni (II / III) (NiSOD). Cu/ZnSODs são geralmente encontradas no citoplasma de células eucarióticas, nos cloroplastos e em alguns procariotas. As MnSODs são encontradas em procariotas e em mitocôndrias. As FeSODs são encontradas em procariotas, algas e em alguns cloroplastos de plantas superiores (SCANDALIOS, 2005). Foram encontradas

NiSODs em *Streptomyces*. Ao contrário da maioria dos outros organismos que têm apenas um de cada tipo de SOD nos vários compartimentos celulares, as plantas têm múltiplas formas de cada tipo codificadas por mais de um gene, indicativo de que as plantas têm defesas antioxidantes muito mais complexas (TOUATI, 1988; FINK; SCANDALIOS, 2002). A dismutação de $O_2^{\cdot-}$ para $O_2 + H_2O_2$ pela SOD não é simples, pois o H_2O_2 resultante pode reagir com íons metálicos, dando origem ao OH^{\cdot} altamente tóxico. Felizmente, a CAT complementa a sequência degradando o H_2O_2 para O_2 e H_2O (SCANDALIOS, 2005).

A catalase (CAT) é, em sua maioria, localizada em peroxissomas, onde muitas das enzimas produtoras de H_2O_2 residem. Portanto, a CAT exibe um K_m alto para H_2O_2 , podendo atuar no H_2O_2 produzido antes deste se difundir para outras partes da célula. A CAT é uma enzima tetramérica contendo heme-proteico e é encontrada em todos os organismos aeróbicos. Devido à sua ampla distribuição, conservação evolutiva e a capacidade rápida de degradação do H_2O_2 , acabou sendo proposto que a CAT desempenha um papel de grande importância evolutiva nos organismos, para permitir que vivam em ambientes aeróbicos (SCANDALIOS, 2005).

Glutathione Peroxidase (GPx) é uma enzima citosólica antioxidante contendo selênio que catalisa a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 e peróxidos lipídicos em água e álcoois lipídicos e, por sua vez, oxida a glutathione para o dissulfeto de glutathione (FANUCCHI, 2014). O peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos são desintoxicados para não serem convertidos em radicais OH^{\cdot} e radicais peróxidos lipídicos, por metais de transição (Fe_2^+). Considera-se que o sistema GPx/glutathione é uma defesa importante no estresse oxidativo. Quatro isoformas já foram caracterizadas, GPx-1 (GPx celular) é onipresente e reduz H_2O_2 e peróxidos de ácidos graxos; GPx2 (GPx gastrointestinal) é localizado em células epiteliais gastrointestinais; GPx-3 (GPx extracelular) é a única no compartimento extracelular, de grande importância para mamíferos e GPx-4 (GPx hidropéroxido de fosfolipídios), ligada à membrana, reduzindo lipídios esterificados (TABET; TOUYZ, 2007).

FIGURA 1: TANDEM DA SEQUÊNCIA DE REAÇÕES ENTRE SOD, CAT E PEROXIDASES.



FONTE: Scandalios 2005.

A glutathiona é um tripeptídeo composto por glicina, cisteína e ácido glutâmico (SKAPER, 2017). A conjugação de glutathiona é um importante mecanismo de desintoxicação. A glutathiona (GSH) é encontrada na maioria dos tecidos, especialmente em altas concentrações no fígado, e desempenha um papel extremamente importante na proteção de hepatócitos, eritrócitos, células espermáticas e em outros tipos celulares. A GSH está envolvida em reações enzimáticas e não-enzimáticas. Nas reações não enzimáticas, atua como eliminador de baixo peso molecular dos xenobióticos eletrofílicos e compete com DNA, RNA e proteínas na captura de eletrófilos (WATSON, 2015; GUPTA, 2016). Já as reações enzimáticas, que envolvem a GSH, são catalisadas pela enzima glutathiona-S-transferase (GST) (OOST et al. 2003). Os conjugados de glutathiona formados no fígado são excretados intactos na bile ou são convertidos em ácidos mercaptúricos nos rins, que são altamente solúveis em água para serem excretados pela urina. A glutathiona-S-transferase também catalisa reações de nitratos orgânicos com a glutathiona. Os nitratos são reduzidos a nitrito, que por sua vez interagem com as aminas e resultam na formação de nitrosaminas cancerígenas. O esgotamento da glutathiona acaba por predispor a hepatotoxicidade e mutagenicidade (GUPTA, 2016).

A peroxidação lipídica ocorre em condições de estresse oxidativo afetando as membranas celulares lipoproteínas e outras moléculas que contenham lipídios. Os lipídios de membrana representam, na maioria das vezes, um substrato ao ataque oxidativo (JANCIC; STOSIC, 2014). Geralmente, a peroxidação lipídica ocorre quando um radical hidroxílico retira um elétron de um ácido graxo insaturado, criando um radical lipídico instável, que pode reagir com oxigênio, formando um radical peroxil de ácido graxo. Isso pode induzir uma reação com outro ácido graxo insaturado formando hidroperóxido de ácido graxo e um novo radical lipídico, propagando assim a reação e a lesão. Ciclos repetidos de peroxidação lipídica podem causar danos graves às

membranas celulares (KAPLOWITZ; DELEVE, 2013). A indução de ROS e a peroxidação lipídica podem levar a mudanças importantes na função da membrana, como a modificação do potencial membrana (despolarização), liberação de cálcio e divisão mitocondrial e ativação de caspases-3, fragmentação de DNA e apoptose (BERTIN; AVERBECK, 2006).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima responsável por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, é sintetizada no tecido nervoso, músculos e em células hematopoiéticas. Nos tecidos excitáveis, a expressão da AChE é regulada pelo desenvolvimento específico do tecido e a enzima fica localizada na superfície extracelular do nervo e do músculo (HELLER BROWN; LAIKEN, 2012). As moléculas de acetilcolina (ACh) são liberadas na fenda sináptica para a transmissão do impulso nervoso, as AChs que não se ligam imediatamente com um receptor, ou as liberadas depois de reagir com um receptor, são hidrolisadas quase que instantaneamente (menos de 1 ms) pela AChE. Aproximadamente 50% da ACh liberada é hidrolisada em colina e acetato antes de atingir o receptor. A colina é reabsorvida pelo terminal nervoso para ser reutilizada na síntese da ACh (BITTNER; MARTYN, 2013). A AChE encontrada na junção neuromuscular da musculatura esquelética é sintetizada pelos músculos. A rapidez da catálise da acetilcolina liberada é essencial na junção neuromuscular esquelética, permitindo que a próxima descarga de acetilcolina liberada possa desencadear um novo potencial excitatório pós-sináptico (SQUIRE, 2009).

1.2.2 BIOMARCADORES GENÉTICOS

O ensaio cometa (*Single-Cell Gel Eletrophoresis*), é uma ferramenta eficaz na investigação de mutágenos ambientais em células animais, capaz de detectar danos em células individualizadas (SPEIT; HARTMANN, 1999). A técnica é simples com resultados confiáveis, mas que demanda uma mão de obra intensa para garantir a sua reprodutibilidade e o desenvolvimento de novas abordagens. O ensaio cometa é muito utilizado em biomonitoramento e nas avaliações ecotoxicológicas, para estimativa de danos ao material genéticos (AZQUETA et al. 2009), podendo escolher o tecido que será estudado de acordo com o tipo de interação que o contaminante pode exercer (HARIRI et al. 2018).

Dentro das abordagens do ensaio cometa, a principal vantagem está relacionada com a forma como os xenobióticos atuam diferencialmente em tecidos específicos, sendo possível determinar o tecido alvo da substância genotóxica, pois a análise permite que seja feita uma avaliação das células individualizadas do tecido alvo (PANDRANGI et al. 1995). Os principais tecidos utilizados são: tecido sanguíneo, devido a facilidade de coleta, transporte do material e por ficarem em contato com todos os outros tecidos do organismo; o tecido hepático, amplamente utilizado por ser o principal órgão de metabolização; e tecido cerebral, por ser um dos tecidos que mais sofrem danos causados pelo estresse oxidativo e a formação de espécies reativas de oxigênio EROs (BELPAEME et al. 1998; AGNIHOTRI et al. 2015).

A técnica do ensaio cometa requer a utilização de nucleóides, mas não precisa de células em proliferação, permitindo a avaliação de qualquer tipo de tecido celular que se possa obter uma suspensão de células individualizadas, incluindo tipos celulares diferenciados que podem ser *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo* (KOPPEN et al. 2017). A utilização do ensaio cometa versão alcalina (pH>13), permite a avaliação de diversos tipos de danos ao DNA, como o dano de simples fita, dano em dupla fita e os sítios alcalilábeis (AZQUETA et al. 2015; KOPPEN et al. 2017)

O micronúcleo é utilizado como teste para a avaliação de danos citogenéticos há mais de 50 anos (HEDDLE et al. 1983). É uma técnica capaz de avaliar diversas classes de xenobióticos (BOLOGNESI et al. 2006). O teste do micronúcleo se tornou uma das metodologias mais utilizadas para a avaliação de danos cromossômicos estruturais ou numéricos em diferentes sistemas. Micronúcleos (MN) são pequenas massas de cromatina que não estão ligadas ao núcleo principal, formadas durante a mitose e que permanecem no citoplasma após o final da divisão. Podem ser formados por um fragmento acêntrico de cromossomo ou um cromossomo inteiro perdido durante a metáfase/anáfase, induzidos por danos clastogênicos ou disfunção do fuso, respectivamente, podendo a expressão do dano ao DNA estar separada temporalmente da sua aparição (BOLOGNESI; CIRILLO, 2014).

A adaptação para o teste do MN feita por Carrasco et al. (1990), classifica diferentes alterações morfológicas nucleares. Posteriormente, a correlação dessas alterações, como *blebbed* correlacionada com a formação de MN, pode informar que as diferentes morfologias observadas podem resultar de processos diferentes, sendo eles genotóxicos ou citotóxicos (BOLOGNESI et al. 2006). Em seu trabalho

Stankevičiūtė et al. (2016) lista algumas das possibilidades para a formação das alterações, como ação clastogênica, dificuldade de expulsão de DNA amplificado incorretamente, relação com aneuploidias que podem desencadear MN, falhas na eritropoiese e eliminação de danos citogenéticos por apoptose, ocorrendo em diferentes taxas para cada espécie.

A formação de micronúcleos em peixes é utilizada em trabalhos de vários laboratórios para avaliar a genotoxicidade utilizando substâncias químicas em condições laboratoriais ou em trabalhos de campo (RAMSDORF et al. 2012; OSS et al. 2013; HARABAWY; MOSLEH, 2014; FATIMA et al. 2014). O teste do MN tem obtido sucesso na avaliação de genotoxicidade ou citotoxicidade em peixes. O maior tecido hematopoiético em peixes é o rim cefálico e, a produção secundária, pode ser atribuída a diversos órgãos como o baço, áreas periportal do fígado, submucosa intestinal e timo; ocorrência ocasional de hematopoesse em brânquias, cérebro e gônadas (AGIUS; ROBERTS, 2003). O sangue periférico vai receber eritrócitos normais e os eritrócitos com alterações dos diversos órgãos hematopoiéticos, podendo ser facilmente identificados (UDROIU, 2006; OMAR et al. 2012). A utilização do MN é recomendada para a avaliação precoce de substâncias xenobióticas (HUSSAIN et al. 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade de rações produzidas com a RAB da espécie *Acutodesmus obliquus* utilizando biomarcadores bioquímicos e de genotoxicidade órgão-específicos (sangue, fígado e cérebro), em duas espécies de peixes *Oreochromis niloticus* e *Rhamdia quelen*.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Verificar a toxicidade de um tratamento agudo (96h) nas espécies *Rhamdia quelen* e *Oreochromis niloticus* alimentadas com dois tipos de RAB pura.
- 2) Comparação entre as respostas da espécie *Oreochromis niloticus* quando suplementada com dois tipos de RAB produzidas com meio sintético e biodigerido, nas concentrações de 1%, 2% e 3% por um período subcrônico de 60 dias.
- 3) Comparação das respostas na espécie *Rhamdia quelen* quando suplementada com a RAB produzida em meio sintético, nas concentrações de 1%, 2% e 3% por um período subcrônico de 60 dias.

3 CAPÍTULOS

Esta tese é formada por 3 capítulos referentes, cada um, aos artigos propostos na sua concepção. O primeiro capítulo é sobre a resposta de uma alimentação aguda (96h) de duas RABs puras em duas espécies de peixes. O segundo capítulo trata da resposta a alimentação enriquecida com dois tipos de RABs em três diferentes composições na espécie *Oreochromis niloticus* por um período de 60 dias. O terceiro capítulo é sobre a resposta da espécie *Rhamdia quelen*, em estágio juvenil, tratada com rações enriquecidas com um tipo de RAB em três diferentes concentrações por um período de 60 dias. As referências bibliográficas estão dispostas ao final do documento.

3.1 CAPÍTULO 1: RESPOSTAS AGUDA DE BIOMARCADORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS DOS PEIXES *Oreochromis niloticus* E *Rhamdia quelen* SUBMETIDOS À ALIMENTAÇÃO POR BIOMASSA RESIDUAL DA MICROALGA *Acutodesmus obliquus*.

Autores:

^{1,2}Antonio Ernesto Meister Luz Marques; ³Leticia da Silva Pereira Fernandes; ^{1,2}Mariana de Almeida Torres; ^{1,2}Gustavo Souza Santos; ³Helena Cristina Silva de Assis; ^{2,4}André Bellin Mariano; ^{2,5}José Viriato Coelho Vargas; ^{1,2}Marta Margarete Cestari¹.

¹ Lab. Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

² Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS)

³ Lab. Toxicologia Ambiental, Departamento de Farmacologia (UFPR).

⁴ Departamento de Engenharia Elétrica (UFPR).

⁵ Departamento de Engenharia Mecânica (UFPR).

Resumo

Diversos estudos visando a aplicabilidade de microalgas cultivadas em fotobiorreatores para a produção de biocombustíveis estão sendo desenvolvidos. Visando reduzir os impactos provocados pela extração e uso de combustíveis fósseis. Durante o processamento das microalgas, a biomassa é submetida à extração lipídica, gerando uma biomassa residual de microalgas (RAB). A RAB, por sua vez, possui potencial para enriquecimento na nutrição animal, apontando um possível uso alternativo. Neste cenário, objetivou-se avaliar a toxicidade aguda da RAB quando utilizada como fonte de alimento em peixes. Testou-se a RAB da microalga *Acutodesmus obliquus*, sendo a RAB-A cultivada em meio sintético (Chu) e a RAB-B em meio composto por efluente de suinocultura biodigerido [5%]. Para os ensaios (96h), utilizou-se peixes das espécies *Oreochromis niloticus* e *Rhamdia quelen*, alimentados duas vezes ao dia *ad libitum* e separados em 3 grupos por espécie: Controle, alimentação com ração comercial; RAB-A – Alimentado integralmente da RAB cultivada em meio CHU; e RAB-B - Alimentado integralmente da RAB cultivada em meio oriundo da biodigestão. Ao final dos experimentos, os peixes foram anestesiados, para coleta de sangue periférico, e eutanasiados por secção medular para a coleta dos tecidos. Analisou-se o Índice Hepatosomático (IHS); biomarcadores bioquímicos: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), lipoperoxidação (LPO) em fígado e acetilcolinesterase (AChE) em cérebro e músculo; biomarcadores genéticos: ensaio de difusão do DNA em eritrócitos, ensaio cometa (sangue, fígado e cérebro) e micronúcleo píceo com alterações morfológicas nucleares. Os resultados mostram redução do IHS nas duas espécies nos grupos RAB-A e RAB-B, alimentados com as

RABs. Para os biomarcadores bioquímicos na espécie *O. niloticus*, foram observadas redução da SOD e LPO para a RAB-A e RAB-B. Na espécie *R. quelen*, houve redução da CAT no grupo RAB-A, redução de SOD para RAB-A e RAB-B e aumento da AChE para RAB-B. Nos biomarcadores genéticos, para *O. niloticus*, não houve alterações. Para *R. quelen* houve redução dos danos ao tecido cerebral para RAB-A e RAB-B. Os resultados demonstram que as RABs responderam rapidamente ao ensaio agudo com capacidade de redução da LPO e de dano cerebral, sendo promissoras quanto ao seu uso como suplemento alimentar e em relação ao seu potencial antioxidante.

Palavras-chave: Ração animal. Microalga. Biomassa residual de microalgas.

Biomarcadores. Tilápia do Nilo. Bagre cinza.

3.1.1 Introdução

As microalgas, produtores primários do ambiente aquático, além de serem a base da teia alimentar aquática, servindo como alimento direto e indireto para diversos organismos, são fortemente cotadas como alternativa para substituir a produção de biocombustíveis de primeira geração (BEAL et al. 2015). Além disso, o uso das microalgas está em expansão, pois estas estão sendo destinadas para a produção de biocombustíveis ou, para atuar na substituição de ingredientes escassos (RICHMOND; HU, 2013). Os biocombustíveis atuais, como o etanol e biodiesel, utilizam biorrefinarias para o processamento das safras e acabam competindo por recursos que impactam na economia como na competição por água, energia e áreas destinadas a produção de alimentos. Todavia, é necessário desenvolver um modelo que não necessite de áreas agriculturáveis, impactando de forma reduzida o ambiente no seu processamento (CESÁRIO et al. 2018). Sistemas utilizando microalgas conseguem otimizar o aproveitamento da captura de energia e produção de compostos com grande eficiência, apresentando uma diversidade de produtos com alto valor agregado a um custo ambiental reduzido (ENZING et al. 2014; VARGAS et al. 2014).

O emprego das microalgas está voltado ao seu consumo direto, na obtenção de carotenoides, antioxidantes e suplementação de ração animal (CESÁRIO et al. 2018). Como as microalgas apresentam diversos compostos de interesse, conjugar a produção de biocombustíveis com a utilização da biomassa residual é um dos objetivos a ser alcançado no desenvolvimento dessa tecnologia. A utilização das

microalgas na aquicultura está ligada ao seu valor nutricional, principalmente pela composição de aminoácidos, ácidos graxos, carotenoides, entre outros compostos, que não são supridos nas rações tradicionalmente produzidas por *commodity* agrícolas (METTING, 1996). O emprego de biomassa residual de microalgas (RAB) em rações para peixes também é um potencial mercado para aproveitamento destes composto e está começando a apresentar resultados voltados para esta área (ABOMOHRÁ et al. 2014; BALEN et al. 2015). Contudo, é necessário investigar as espécies utilizadas para avaliar se possuem atividade toxicológica quando inserida na suplementação de rações.

O Jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), é uma espécie endêmica da América do Sul, apresenta boas taxas de crescimento, característica que faz dela alvo para produção em pisciculturas (PEREIRA et al. 2006). A Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), é o ciclídeo mais cultivado mundialmente em pisciculturas (FAO, 2017), apresenta grande capacidade adaptativa, facilidade no cultivo, crescimento rápido, além de um mercado em expansão devido a qualidade da sua carne. Ambas as espécies são amplamente utilizadas em experimentação laboratorial (Boscolo et al. 2001; Meurer et al. 2012, 2002; Bombardelli and Hayashi 2005; Çavaş and Ergene-Gözükara 2005; Salhi and Bessonart 2012; Becker et al. 2013; Piancini et al. 2015; Klingelfus et al. 2015; Balen et al. 2015; Pereira et al. 2016; Guiloski et al. 2017a, b; Michelato et al. 2018; Saccol et al. 2018).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da utilização da RAB, na alimentação de peixes e verificar a resposta em curto período de alimentação (96 horas), em animais criados em pisciculturas e utilizados para consumo humano (*R. quelen* e *O. niloticus*) através de biomarcadores bioquímicos e genéticos, para investigar se, após a suplementação com RAB, ocorrem efeitos tóxicos nos organismos.

3.1.2 Material e Métodos

3.1.2.1 Cultivo das Algas, extração lipídica e determinação dos pigmentos

O cultivo de microalgas aconteceu em fotobiorreatores tubulares (BALMANT et al. 2009), contando com bombas para circulação dos meios e compressores para

aeração (ar atmosférico). A microalga *Acutodesmus obliquus* (*Scenedesmus obliquus*) foi cultivada em dois diferentes meios de cultivo: A - Meio Sintético Chu; B- Meio composto da biodigestão do efluente oriundo de suinocultura na proporção de 5%. Após cultivo, as microalgas do meio sintético foram floculadas com sulfato de ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) [0.5 g l^{-1}], centrifugadas em centrífuga industrial com modo semi-contínuo, vazão de 4 l.h^{-1} e rotação de 3000rpm. O material centrifugado foi seco por 24h em uma temperatura de 60° C . Para a extração dos lipídios, foi utilizado hexano em reator soxhlet por 7h. A remoção do solvente ocorreu por evaporação a 60° C durante 72h. Para as microalgas que cresceram no meio oriundo da suinocultura, não houve floculação, sendo realizada diretamente a etapa de centrifugação em modo semi-contínuo com vazão de 4 l h^{-1} em rotação de 3000 rpm. O material centrifugado foi seco por 24h (60° C). Para a extração dos lipídios, foi utilizado hexano aquecido a temperatura de 50° C por 2h, em reator com agitação. A remoção do solvente foi feita por evaporação a 60° C durante 72h. Após evaporação, o material obtido, RAB, foi denominada como RAB-A para o meio sintético e RAB-B para o meio composto da biodigestão do efluente oriundo da suinocultura.

Para a determinação dos pigmentos de clorofila (*a* e *b*) e carotenoides totais, foi utilizado o método proposto por He et al. (2015) para a análise das RABs. A extração dos pigmentos foi realizada em triplicata, adicionando $500\mu\text{g}$ de cada RAB (A e B) em tubos protegidos da luz. A diluição ocorreu por adição de 3 ml de etanol 99,1% P.A. e foi deixada em banho maria (60° C) com agitação por 40 min. Em seguida os tubos foram deixados por 15 min a temperatura de 0° C . Então, foram centrifugadas em $1700 \times g$ (10° C) por 5 min. O sobrenadante foi analisado por absorvância a 665, 659 e 470 nm em espectrofotômetro, utilizando etanol 99,1% P.A. como substância padrão.

3.1.2.2 Alimentação dos peixes

Para os testes, foram utilizados 45 exemplares de cada espécie *Rhamdia quelen* (Jundiá), obtidos de uma piscicultura em Toledo, Paraná (Brasil) e *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) oriundos de criadouro localizado na cidade de Garuva, estado de Santa Catarina (Brasil), totalizando 90 peixes. Os peixes foram aclimatados por um período mínimo de 45 dias em condições de alimentação,

temperatura e qualidade da água idêntica e, após este tempo, foram submetidos aos ensaios de 96 horas com as duas RABs sendo fornecidas como única fonte de alimentação. Foram realizadas análises bromatológicas nas duas RABs (A e B) (Tabela 1).

Os peixes da espécie *O. niloticus* (59,71g ± 12,69g), foram separados em três grupos de 15 exemplares cada, em 3 tanques de 250l e mantidos à temperatura média de 27° C (±1 °C). O sistema contou com uma taxa de renovação de água de 200 l dia⁻¹. Os peixes da espécie *R. quelen* (58,36g ± 16,68g), foram separados em três grupos de 15 exemplares cada, em 3 tanques de 250l e mantidos à temperatura média 27 °C (±1 °C). O sistema contou com uma taxa de renovação de água de 200 l dia⁻¹. Os grupos foram denominados de RAB-A; RAB-B e Controle (Ração comum) para cada espécie. Não houve mortalidade durante o período experimental.

A alimentação foi oferecida duas vezes ao dia, por um período de 96h, respeitando o conceito *ad libitum* para as quantidades disponibilizadas em cada grupo. Após este período, os peixes foram anestesiados com Benzocaína (100 mg l⁻¹) (GONTIJO et al. 2003) e eutanasiados por secção medular para a coleta dos tecidos. O fígado de cada peixe foi pesado para o cálculo do Índice Hepatosomático (IHS) utilizando a fórmula $IHS = PF/PT \times 100$, onde PF representa o peso (g) do fígado e PT representando o peso total do peixe (LLORET; PLANES, 2003).

3.1.2.3 Biomarcadores Bioquímicos

As amostras dos órgãos coletados para as análises bioquímicas (cérebro, músculo e fígado) foram mantidas sob refrigeração (-80 °C) até o processamento.

Um fragmento do cérebro (± 50 mg) e músculo axial (± 100 mg) foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio (0.1 M, pH 7.5) na proporção 1:10 (peso: volume). O homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 20 min a 4° C. Os sobrenadantes foram aliquotados para avaliar a atividade da Acetilcolinesterase (AChE) e análise de proteína total.

Uma porção do fígado (± 100 mg) foi homogeneizada em tampão fosfato de potássio (0.1 M, pH 7) na proporção 1:10 (peso: volume) e centrifugado a 15.000 x g por 30 min a 4° C. Os sobrenadantes foram aliquotados para a análise da atividade da superóxido dismutase (SOD), da catalase (CAT), da glutathione peroxidase (GPx),

da glutationa S-transferase (GST) e para verificar os níveis de peroxidação lipídica (LPO) e proteína total.

Para mensurar a atividade da AChE cerebral e muscular, foi utilizada a técnica descrita por Ellman et al. (1961) e modificada para microplaca por Silva de Assis (1998). O método consiste no desenvolvimento de uma reação colorimétrica com iodeto de acetiltiocolina (ATC) e 5,5-Dithiobis-2 nitrobenzoato (DTNB) na presença de AChE, que pode ser mensurada por espectrofotometria a 405 nm. A atividade foi monitorada durante 3 minutos com intervalos de 15 segundos e foi expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

A atividade da SOD foi mensurada pela metodologia descrita por Gao et al. (1998), que é baseada na habilidade da SOD em inibir a auto oxidação do pirogalol, que pode ser mensurada a 440 nm. A quantidade de SOD que consegue inibir a reação de auto oxidação do pirogalol em 50% é igual a 1 (U) unidade de SOD, assim, a atividade da SOD foi expressa em U de SOD $\cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

A atividade da CAT foi mensurada como descrito por Aebi (1984), onde é considerada como base o consumo de peróxido de hidrogênio exógeno (H_2O_2) pela CAT, gerando H_2O e O_2 . Esta reação pode ser medida por espectrofotometria a 240 nm. A leitura da absorbância foi realizada a cada 15 segundos durante 1 minuto e a atividade foi expressa em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

A atividade da GPx foi mensurada pelo método proposto por Hafeman, Sunde e Hoekstra (1974), de acordo a absorbância a 340 nm que sofre um decréscimo ocasionado pela redução de GSSG (glutaciona oxidada) em GSH, na presença de NADPH, promovido pela GR (glutaciona redutase). A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional a produção de GSSG, pela GPx, na presença de H_2O_2 e a unidade da atividade foi expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

A atividade da GST foi mensurada segundo o método descrito por Keen, Habig e Jakoby (1976), o método é baseado na catalisação da reação de conjugação do CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a glutaciona reduzida (GSH), pela GST, formando um tioéter que pode ser medido pelo aumento da absorbância a 340 nm e a atividade foi expressa em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

Os níveis da LPO foram mensurados pela avaliação da concentração de hidroperóxido de lipídio pelo ensaio FOX (JIANG et al. 1992), medido por

espectrofotometria a 570 nm. A unidade de concentração de hidroperóxidos de lipídio utilizada foi nmol. mg de proteína⁻¹.

A concentração de proteína total foi quantificada usando o método de Bradford a 595 nm, usando uma curva padrão de albumina bovina (BRADFORD, 1976).

3.1.2.4 Biomarcadores Genéticos

O ensaio cometa com as amostras de fígado, cérebro e sangue foi realizado segundo a técnica descrita por Speit and Hartmann (1999), com modificações para eritrócitos por Cestari et al. (2004) e Ferraro et al. (2004) e adaptado para os tecidos hepático e cerebral, por Ramsdorf et al. (2009). As lâminas foram montadas com 5 µl da diluição de 1:50 sangue/soro bovino fetal (FBS). Para os tecidos, uma alíquota de 10 µl, do homogeneizado de tecido em 500 µl de FBS, foi utilizada. As amostras de sangue e tecidos foram misturadas com 120 µl de agarose com baixo ponto de fusão (0,5%). Essa mistura foi adicionada sobre lâminas para microscopia previamente cobertas com agarose normal (1,5%) e então cobertas com lamínula e colocadas sob refrigeração por 5 min. Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram mergulhadas em solução de lise composta por NaCl (2.5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0.8%), N-lauryl sarcosinato (10%), Triton X-100 (1%) e DMSO (10%) por um período mínimo de 24 horas na ausência de luz com refrigeração (4° C).

Após o processo de lise, as lâminas foram imersas em solução de NaOH (300 mM) e EDTA (200 mM), pH > 13 por 25 min para a desespiralização do DNA e corrida eletroforética a 300 mA e 25 V (1 V cm⁻¹) por 25 min. As lâminas foram neutralizadas com solução composta por 0.4 M tris, pH 7.5 por 5 min (3x) e após secas, foram fixadas com etanol 96% por 5 min. Para a análise, 30 µl do corante brometo de etídio foi utilizado com concentração de 0,02 g mL⁻¹ e a análise feita em microscopia de epifluorescência (Leica DM LS2) a 400x de magnificação em teste cego. Foram analisados 100 nucleóides por lâmina e os danos foram classificados de acordo com Collins et al. (1995). Cometas com a cabeça muito pequena ou não existente e cauda muito difusa, não foram considerados na análise por estarem associados com morte celular (FRENZILLI et al. 2009).

O ensaio de difusão foi realizado segundo descrito por Singh (2000). A montagem, lise e as soluções utilizadas na preparação do material sanguíneo seguiram a mesma metodologia descrita no ensaio cometa, até antes da desespiralização. As lâminas foram deixadas por 12 min em pH > 13 no tampão para desespiralização do DNA e neutralizadas logo após com solução Tris (0,4 M pH 7.5) por 5 min (3x). Após secas, foram fixadas com etanol 96% por 5 min. Para a análise, 30 µl do corante brometo de etídio foi utilizado com concentração de 0,02 g mL⁻¹ e a análise feita em microscopia de epifluorescência (Leica DM LS2) a 400x de magnificação em teste cego. Foram analisados 100 nucleóides por lâmina.

A metodologia utilizada para o teste do micronúcleo písceo foi desenvolvida por Heddle (1973) e Schmid (1975) com algumas alterações segundo Ferraro et al. (2004). Para o teste do micronúcleo písceo e alterações morfológicas nucleares (NMA), uma lâmina por animal foi preparada, contendo o esfregaço do sangue. Após secar, as lâminas foram fixadas em etanol 95% por 30min. As lâminas foram coradas com Giemsa 10% em tampão fosfato com pH 6.8 por 12 min. Para cada peixe foram analisados 2000 eritrócitos com membrana plasmática intacta. As NMA foram classificadas segundo descrito por Carrasco et al. (1990) com *blebbed*, *notched*, *lobed* e *vacuolated*. A soma de todas as alterações e micronúcleos corresponde ao número de alterações totais.

3.1.2.5 Análise estatística

Os valores da análise de clorofila e carotenoides foram expressos em média ± desvio padrão. Para os dados dos biomarcadores, a normalidade e homocedasticidade foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e Barlett, sendo a presença de *outliers* analisada pelo teste de Grubbs (Alpha = 0,05). Para os dados paramétricos foram realizadas análises de variância (ANOVA) seguidas do pós-teste de Newman-Keulls (p <0,05) e os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. Para os dados não paramétricos foram realizadas análises utilizando o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn (p <0,05) e os resultados foram apresentados em mediana ± quartis mínimos e máximos.

3.1.3 Resultados

3.1.3.1 Análise Bromatológica

TABELA 1: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA RAB-A E RAB-B

Nutrientes	RAB-A	RAB-B
MS (%)	93,247	94,676
CZ (%)	38,784	8,999
EE (%)	1,347	0,520
PT (%)	25,069	42,798
EB (kcal kg ⁻¹)	2937,210	4573,420

MS (matéria seca); CZ (cinzas / matéria mineral); EE (extrato etéreo); PT (proteína bruta); EB (energia bruta)

3.1.3.2 Determinação da clorofila

As quantificações de clorofilas (*a* e *b*) nas RAB (A e B) de *A. obliquus* (TABELA 2), mostraram que a RAB-A apresentou quantidade maior de pigmentos de clorofila, enquanto que na RAB-B a quantidade de carotenoides totais foi superior.

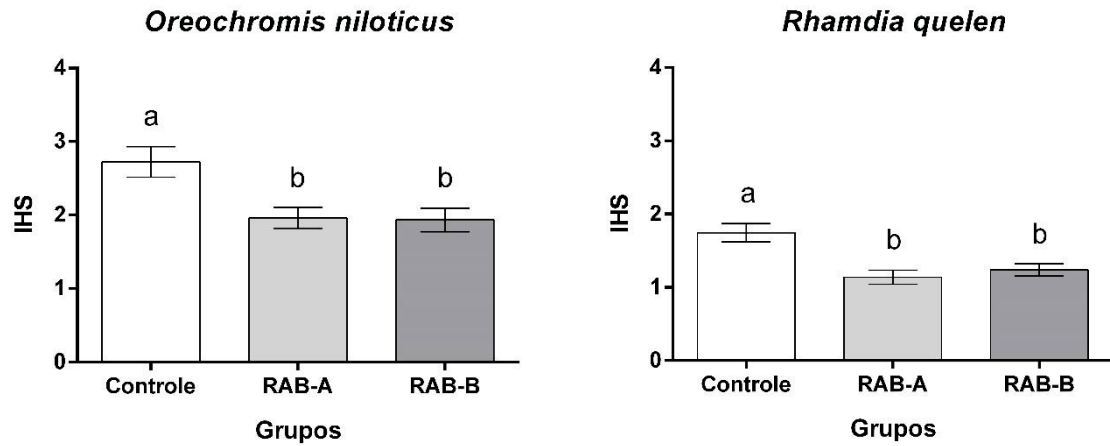
TABELA 2: QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS E CAROTENOIDES TOTAIS.

	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila <i>a+b</i>	Carotenoides
RAB - A	23,55 ± 3,42 mg/l	6,07 ± 2,33 mg/l	29,62 mg/l	0,84 ± 0,31 mg/l
RAB - B	15,33 ± 1,26 mg/l	5,47 ± 0,39 mg/l	20,80 mg/l	1,27 ± 0,08 mg/l

3.1.3.3 Índice Hepatosomático (IHS)

Os resultados para o índice hepatossomático (Figura 1), mostram uma redução do índice para os dois grupos alimentados com RAB nas duas espécies.

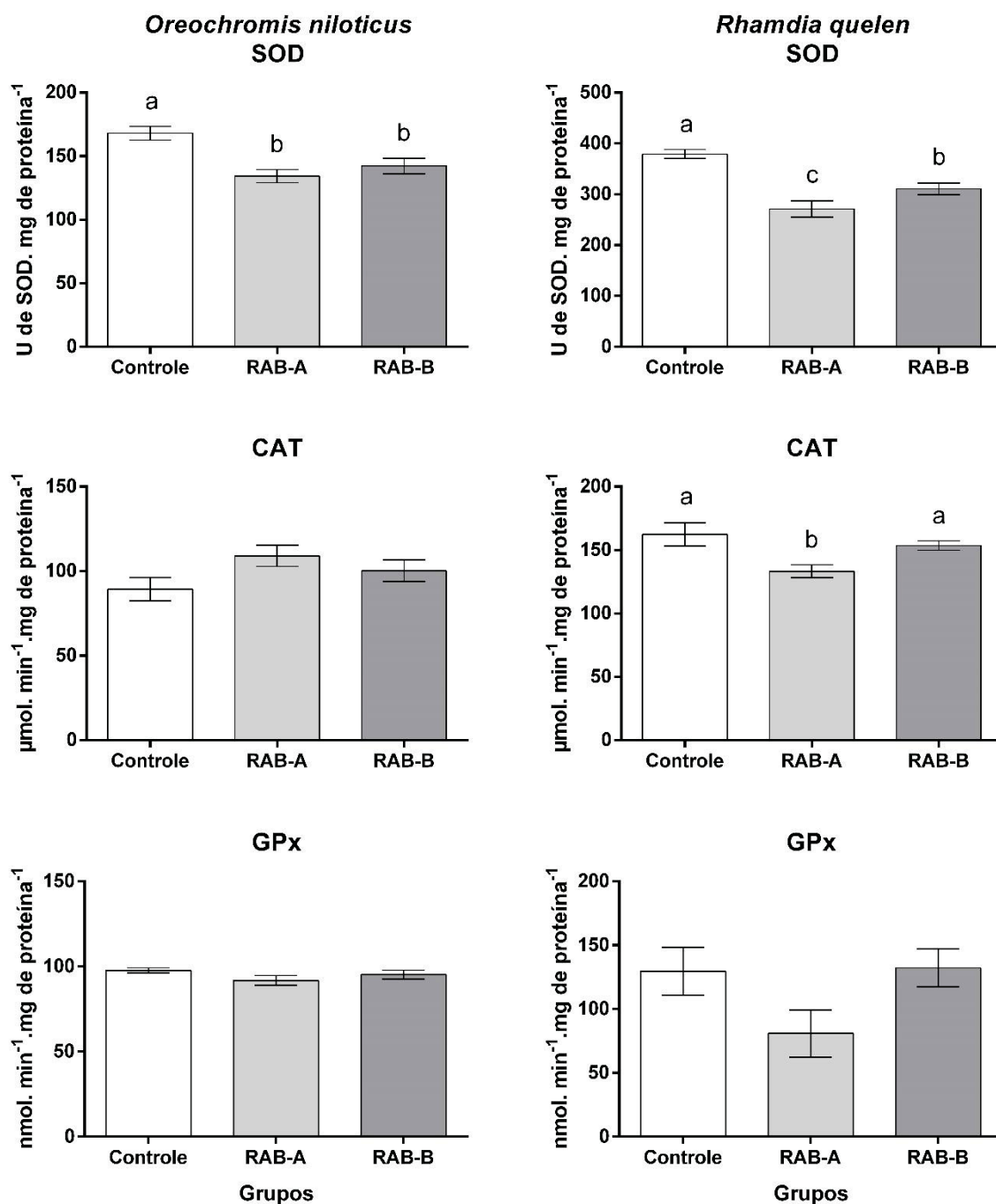
FIGURA 1: ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO (IHS) DE *Oreochromis niloticus* E *Rhamdia quelen* ALIMENTADOS POR 96h COM RAÇÃO COMERCIAL (Controle), RAB-A E RAB-B. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS ($p < 0,05$). GRÁFICOS COM MÉDIA E DESVIO PADRÃO.



3.1.3.4 Biomarcadores Bioquímicos

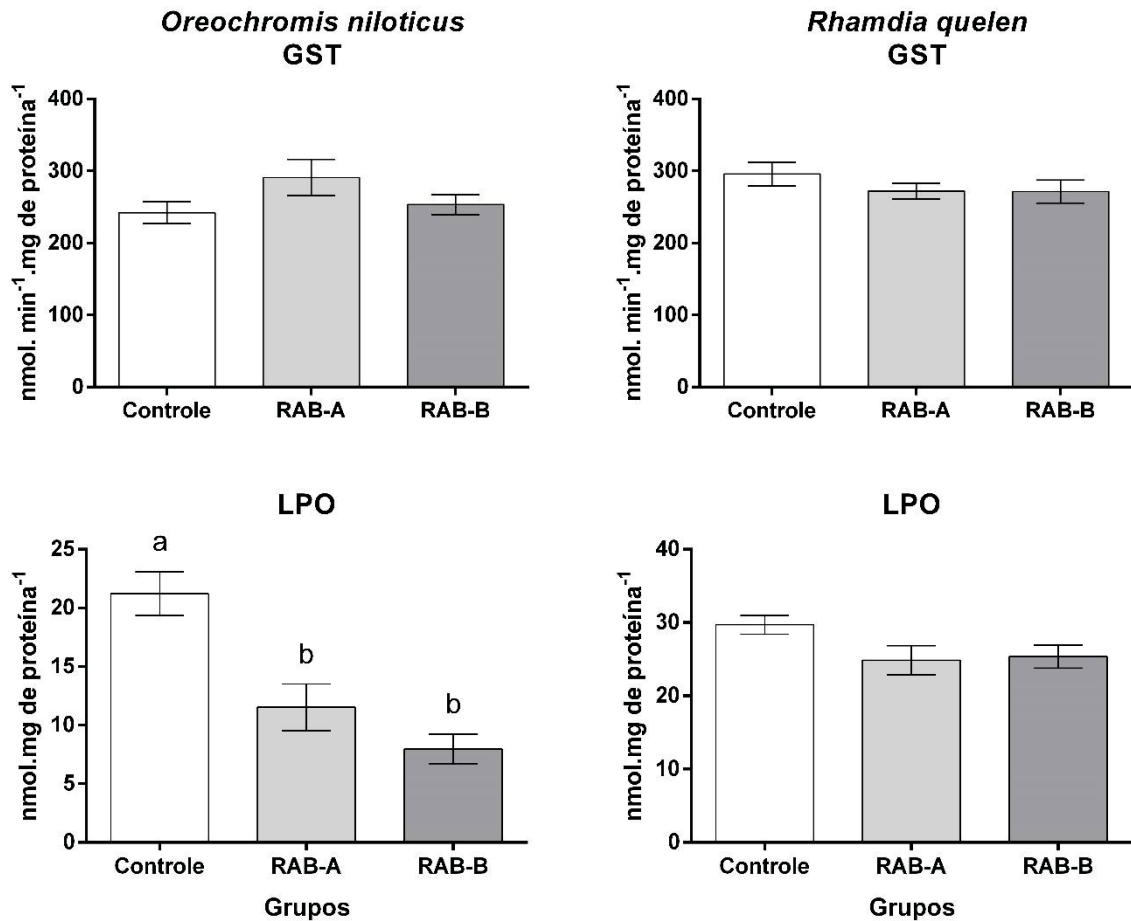
Como resultado, foi observado que a atividade da enzima SOD apresentou redução nos grupos RAB-A e RAB-B de *O. niloticus* e *R. quelen*. Para a CAT, não houve alteração para a espécie *O. niloticus*, mas para a espécie *R. quelen*, o grupo RAB-A apresentou redução, enquanto que para a GPx não houve alteração em relação ao grupo controle (Figura 2).

FIGURA 2: ATIVIDADES DAS ENZIMAS SOD, CAT E GPX EM TECIDO HEPÁTICO DE *Oreochromis niloticus* E *Rhamdia quelen* ALIMENTADOS POR 96h COM RAÇÃO COMERCIAL (Controle), RAB-A E RAB-B. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS ($p < 0,05$). GRÁFICOS COM MÉDIA E ERRO PADRÃO.



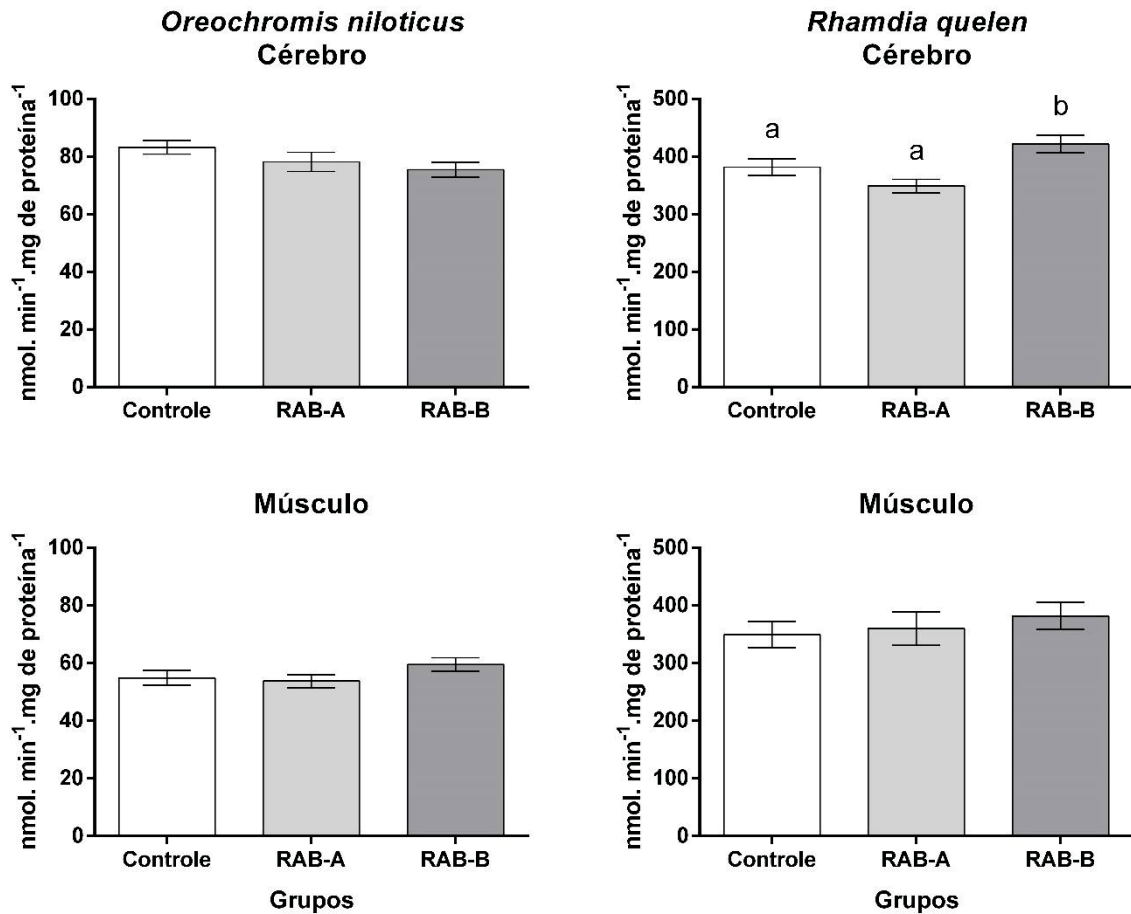
Para a enzima GST, não houve alteração da sua atividade nas duas espécies. Contudo, houve redução nos níveis de LPO nos dois grupos (RAB-A e RAB-B), alimentados com as duas RABs, para a espécie *O. niloticus*, enquanto que para a espécie *R. quelen*, não foi observada alteração na quantificação da LPO (Figura 3).

FIGURA 3: ATIVIDADE DA ENZIMA GST E A QUANTIFICAÇÃO DA LPO EM TECIDO HEPÁTICO DE *Oreochromis niloticus* E *Rhamdia quelen* ALIMENTADOS POR 96h COM RAÇÃO COMERCIAL (Controle), RAB-A E RAB-B. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS ($p < 0,05$). GRÁFICOS COM MÉDIA E ERRO PADRÃO.



Os resultados da enzima AChE mostraram um aumento da atividade cerebral no grupo RAB-B da espécie *R. quelen*, mas não houve diferença para *O. niloticus* (Figura 4). No músculo das duas espécies de peixes alimentadas com as RABs, não foi observada alteração em relação ao grupo controle.

FIGURA 4: ATIVIDADE DA ENZIMA AChE EM TECIDO CEREBRAL E MUSCULAR DE *Oreochromis niloticus* E *Rhamdia quelen* ALIMENTADOS POR 96h COM RAÇÃO COMERCIAL (Controle), RAB-A E RAB-B. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS ($p < 0,05$). GRÁFICOS COM MÉDIA E ERRO PADRÃO.



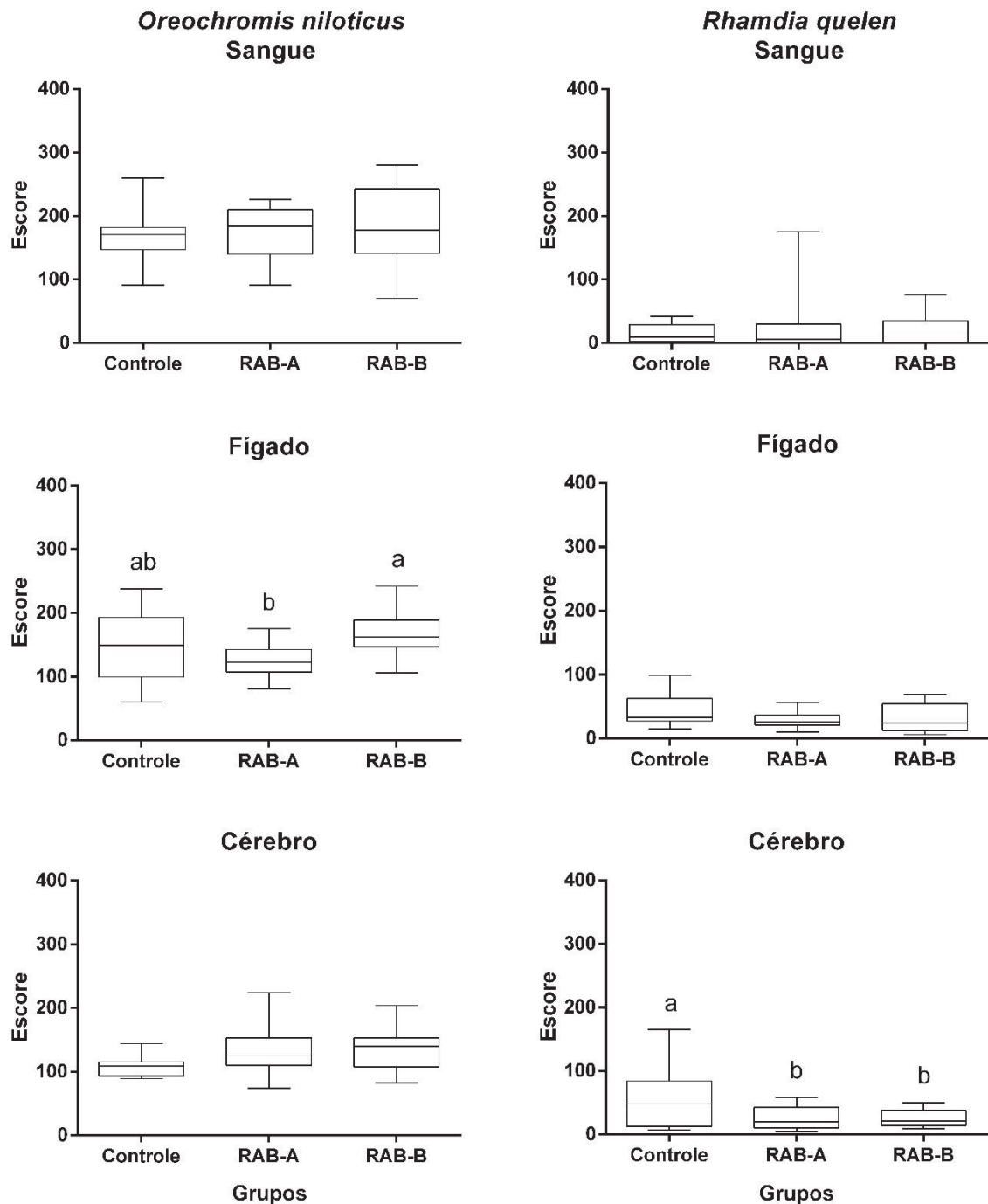
3.1.3.5 Biomarcadores Genéticos

No ensaio de difusão do DNA, para avaliação das frequências de células normais, necróticas e apoptóticas, não foram observadas alterações nas frequências de eritrócitos com alterações entre todos os grupos analisados para as duas espécies de peixes.

Os resultados do ensaio cometa mostraram que na espécie *O. niloticus*, os tecidos sanguíneo e cerebral não apresentaram diferença entre os grupos. Já para o tecido hepático, foi possível observar redução de danos no grupo RAB-A em relação ao grupo RAB-B, mas sem diferença do nível de danos em relação ao grupo controle. Para a espécie *R. quelen*, os níveis de danos para os tecidos sanguíneo e hepático

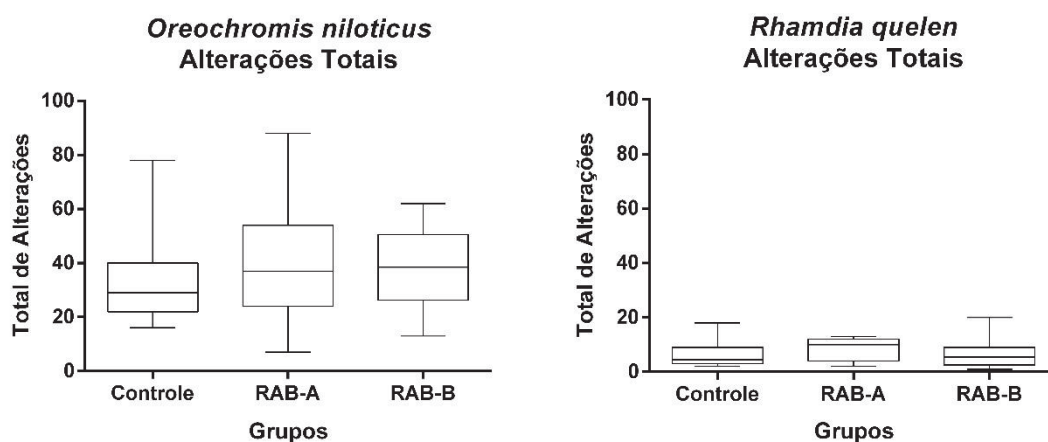
não apresentaram alterações, porém, ocorreu redução dos danos no tecido cerebral dos dois grupos alimentados com as duas biomassas (RAB-A e RAB-B) (Figura 5).

FIGURA 5: NÍVEIS DE DANOS AO DNA (ESCORE) NOS TECIDOS SANGUÍNEO, HEPÁTICO E CEREBRAL DE *Oreochromis niloticus* E *Rhamdia quelen* ALIMENTADOS POR 96h COM RAÇÃO COMERCIAL (Controle), RAB-A E RAB-B. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS ($p < 0,05$). GRÁFICOS COM MEDIANA E QUARTIS.



Para o Teste do Micronúcleo Písceo (Figura 6), foi observado que não há diferença na frequência de alterações totais analisadas nos eritrócitos das espécies *R. quelen* e *O. niloticus* para todos os grupos analisados. As alterações morfológicas nucleares também foram analisadas separadamente, não apresentando diferenças entre os grupos.

FIGURA 6: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES EM ERITRÓCITOS PERIFÉRICOS DE *Oreochromis niloticus* E *Rhamdia quelen* ALIMENTADOS POR 96h COM RAÇÃO COMERCIAL (Controle), RAB-A E RAB-B. FORAM AVALIADOS 2.000 ERITRÓCITOS COM MEMBRANAS INTEGRAS POR ANIMAL. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS ($p < 0,05$). GRÁFICOS COM MEDIANAS E QUARTIS.



3.1.4 Discussão

As microalgas apresentam uma vantagem notável na sua produção, não demandar da utilização de terras agriculturáveis neste processo, evitando competir com a área de produção de alimentos. Microalgas são capazes de produzir diversos compostos como proteínas, ácidos graxos, pigmentos (BEAL et al. 2015). Proporcionam grande capacidade para suprir a demanda como matéria prima para biocombustíveis (PATNAIK; MALLICK, 2015), além de permitir a sua utilização em múltiplas opções de processamento com a mesma biomassa (CHISTI, 2007). A facilidade e competitividade da utilização das microalgas pode estar no aprimoramento da extração dos compostos de interesse para cada utilidade, com consequente redução dos custos e melhor aproveitamento dos compostos naturalmente produzidos. A sua composição pode variar de acordo com diversos

fatores durante a sua produção, como a temperatura, pH, disponibilidade luminosa, proporção dos nutrientes (CESÁRIO et al. 2018).

Atualmente, existe uma grande demanda por proteínas de fontes alternativas para a formulação de rações para peixes (SHI et al. 2017). Uma grande variedade de microalgas são produtoras de ácidos graxos de interesse para a saúde, como o ômega-3 e ômega-6, a sua produtividade é eficiente no meio ambiente, conseguindo suprir grande parte das necessidades na cadeia alimentar (CESÁRIO et al. 2018). Porém, a absorção de compostos antioxidantes pode variar de acordo com o metabolismo de cada animal, podendo influenciar nas respostas interindividual dos danos ao DNA ou efeitos protetivos, como no caso dos carotenoides (AZQUETA; COLLINS, 2012). A suplementação de carotenoides na alimentação resulta em efeitos protetivos e antioxidantes (COLLINS, 2001). Outro potencial pigmento oriundo das microalgas é a clorofila, apresentando potencial antimutagênico, antígenotóxico e antioxidante (ROCA et al. 2016), também vem demonstrando outros efeitos protetores, além dos antioxidantes, como mecanismos que podem interagir na prevenção do câncer ao induzir apoptose em células cancerosas (FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007). As diferentes clorofilas *a* e *b* atuam na proteção contra o estresse oxidativo, sendo a clorofila *a* mais eficiente do que a clorofila *b* (ROCA et al. 2016). Efeitos da utilização de clorofilas na desintoxicação também foram observados quando ocorreu a remoção de dioxinas excretadas pela matéria fecal em trabalho publicado por Chen et al. (2017).

A utilização de microalgas para o reforço do sistema imune e melhora da saúde em geral é corroborada em trabalhos onde a alimentação é suplementada, principalmente, com microalgas da espécie *Spirulina platensis*. A utilização de espirulina 0,5% na ração para *O. niloticus*, fez a taxa de crescimento aumentar, melhorou a absorção nutricional, assim como proporcionou melhora na resistência a doenças (ABDEL-TAWWAB; AHMAD, 2009). Estudos que avaliaram a recuperação da saúde de peixes, utilizaram controles positivos, para demonstrar os efeitos da alimentação suplementada por microalgas. Abdelkhalek et al. (2017) trabalhando com *O. niloticus*, alimentados por 28 dias com uma dieta suplementada por 0,5% e 1% de *S. platensis* na ração, observaram o efeito de recuperação dos danos causados pelo estresse oxidativo e peroxidação lipídica nos peixes expostos à deltamitrina [1,46 µg/l]. Khalil et al. (2017), utilizando como controle positivo atrazina [2-cloro-4-etilamino-6-

isopropil-amino-s-triazina], em peixes da espécie *Cyprinus carpio*, observaram o aumento da capacidade imune inata e adaptativa, dos peixes alimentados com 1% de *S. platensis* adicionados na ração por um período de 40 dias. Sayed et al. (2017) expondo bagres da espécie *Clarias gariepinus* à contaminação por nitrato de chumbo $Pb(NO_3)_2$, também observou a recuperação dos animais, principalmente pela redução da peroxidação lipídica e redução dos danos causados ao DNA, decorrentes do estresse oxidativo, com alimentação constituída por 0,25% e 0,5% de *S. platensis* em um período de 2 e 4 semanas. Segundo Shi et al. (2017), que utilizaram uma biomassa de *Chlorella* na substituição de até 50% da porção proteica da ração de *Carassius auratus gibelio*, constataram que a sua utilização é uma alternativa que melhorou as condições nutricionais proporcionando um aumento de rendimento no crescimento desses animais.

A utilização da RAB é uma das estratégias de mercado para conseguir diversificar a utilização das microalgas e tornar viável a produção em larga escala desse produto (WALSH et al. 2018). A RAB pode ser utilizada para a produção de *Artemia* (ABOMOHRÁ et al. 2014), ou em peixes, como foi utilizado neste trabalho. As RABs podem apresentar diferenças nas suas composições em decorrência dos métodos de extração aplicados, sendo importante avaliar a necessidade de destino dessa RAB, para poder aprimorar essas alterações que possam ter ocorrido e assim destinar o produto final com maior eficiência (BEAL et al. 2015; ESCORSIM et al. 2018). Correções e aprimoramentos para a utilização das RABs não foram necessários para este trabalho, as RABs foram utilizadas após o processamento para a extração de lipídios e conforme consta a composição observada nas Tabelas 1 e 2.

O índice hepatossomático (IHS) é uma variável relacionada à reserva de energia, podendo ser influenciado por diversos fatores. O aumento do índice é geralmente ligado a ambientes contaminados, que exigem grande atividade hepática, causando uma hipertrofia (PORTER; JANZ, 2003; YANG; BAUMANN, 2006; AL-GHAIS, 2013). Também é utilizado como medida para o armazenamento de energia, refletindo a qualidade e disponibilidade de alimento (CANTAFARO et al. 2017; JIA et al. 2018). A redução do acúmulo de reservas no fígado era esperada, devido à baixa capacidade energética das RABs, utilizadas puras na alimentação. A redução do IHS é interessante para grandes produtores, pois está ligada aos custos de produção,

onde a deposição de gordura no fígado não é o interesse (INGEBRIGTSEN et al. 2014).

Avaliar os efeitos bioquímicos e genotóxicos é fundamental para avaliar possíveis interações relacionadas à contaminação (ANDRADE et al. 2004). Comumente, a atividade da enzima AChE é associada a contaminantes, por estes reduzirem a sua atividade. Contudo, o aumento da atividade dessa enzima pode estar associada a restauração da sua função (CATTANEO et al. 2011). O aumento da atividade da AChE proporciona uma maior velocidade de remoção da acetilcolina (ACh) dos receptores, deixando livre a fenda sináptica (ROMANI et al. 2003). A atuação da clorofila e seus derivados podem apresentar propriedades atuantes no mecanismo de desintoxicação impedindo que atinjam a sua forma ativa (ROCA et al. 2016).

Possivelmente, a utilização da biomassa integral, sem passar por processos de extração, providenciaria efeitos semelhantes ou acima dos que foram observados, sendo uma alternativa em futuros experimentos. A fim de confirmar por completo a capacidade benéfica aos peixes, testes com a biomassa integral ou as RABs da microalga *A. obliquus*, podem ser experimentados como os demonstrados por (KHALIL et al. 2017; SAYED et al. 2017), onde a utilização de microalgas se deu frente a um controle positivo. Neste trabalho, uma resposta benéfica rápida, da ingestão das RABs, pode ser observada, mostrando que esses compostos apresentam um futuro promissor.

3.1.5 Conclusão

Neste trabalho, foi testada a alimentação por duas RABs obtidas da microalga *A. obliquus*. As biomassas passaram por extração lipídica, e as duas espécies alimentadas, por um período de 96h, demonstraram efeitos benéficos decorrentes da ingestão da RAB-A e RAB-B. Os principais efeitos observados foram a redução dos danos de membrana para a espécie *O. niloticus* e a redução dos danos ao DNA no tecido cerebral da espécie *R. quelen*. É possível observar um efeito inicial benéfico nas duas espécies, mostrando que as RABs ainda contêm muitas das substâncias produzidas pelas microalgas e que são de interesse na alimentação, como carotenoides e clorofilas.

Agradecimentos

Os agradecimentos vão para toda a equipe dos laboratórios da Universidade Federal do Paraná (UFPR), que trabalharam neste estudo. Laboratório de Tecnologia em Aquicultura; Laboratório de Toxicologia Ambiental; Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável e Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental. Os autores também agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro e CAPES pelo fornecimento da Bolsa.

3.2 CAPÍTULO 2: UTILIZAÇÃO CRÔNICA DA BIOMASSA RESIDUAL FRACIONADA EM 1%, 2% E 3% DE *Acutodesmus obliquus* NA COMPOSIÇÃO DE RAÇÃO PARA PEIXES DA ESPÉCIE *Oreochromis niloticus*: UMA ABORDAGEM INTEGRANDO BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS

Autores:

^{1,2}Antonio Ernesto Meister Luz Marques; ³Rafael Ernesto Balen; ⁴Letícia da Silva Pereira Fernandes; ²Cintya Marques Motta; ⁴Helena Cristina Silva de Assis; ³Fábio Meurer; ^{2,5}André Bellin Mariano; ^{2,6}José Viriato Coelho Vargas; ^{1,2}Marta Margarete Cestari

¹ Lab. Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

² Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS)

³ Lab. Tecnologia em Aquicultura, Departamento de Zoologia (UFPR).

⁴ Lab. Toxicologia Ambiental, Departamento de Farmacologia (UFPR).

⁵ Departamento de Engenharia Elétrica (UFPR).

⁶ Departamento de Engenharia Mecânica (UFPR).

Resumo

As microalgas são grandes produtoras de compostos de interesse comercial e uma das principais fontes de ácidos graxos poli-insaturados, suprimindo toda uma cadeia trófica com esse composto. A utilização de microalgas para a produção de biocombustíveis é uma nova alternativa à utilização de combustíveis fósseis. Na sua utilização, a biomassa de algas pode ser processada para a extração de lipídios, gerando uma biomassa residual de algas (RAB) que pode ser utilizada na suplementação de rações para peixes. Neste trabalho, foram utilizadas duas biomassas de microalgas da espécie *Acutodesmus obliquus* crescidas em diferentes meios de cultivo; meio sintético Chu (A) e 5% do meio composto da biodigestão do efluente oriundo de suinocultura (B). As rações produzidas continham 1%, 2% e 3% da RAB (A) e 1%, 2% e 3% da RAB (B). Uma ração base foi utilizada para o grupo controle (0%). Foram utilizados 15 exemplares de *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo), em cada grupo. Durante o período de experimentação (60 dias) a alimentação, com as diferentes rações, foi disponibilizada três vezes ao dia (*ad libitum*). Após o experimento, a avaliação foi feita utilizando biomarcadores: Bioquímicos - acetilcolinesterase (AChE) em cérebro e músculo; catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD) e lipoperoxidação (LPO) em fígado; Genéticos: difusão de DNA e micronúcleo Písceo com alterações morfológicas nucleares (MN) em eritrócitos e ensaio cometa em eritrócitos, hepatócito e tecido cerebral. As RABs foram analisadas para determinar a quantidade de clorofila e carotenoides, além de uma análise bromatológica. Os resultados da RAB (A) indicaram aumento da atividade da AChE cerebral nos grupos contendo 2% e 3%, na AChE muscular, SOD, CAT, GPx e GST não apresentaram

alteração. Na LPO houve redução para todos os grupos (1%, 2% e 3%). Na difusão e ensaio cometa não houve alteração em eritrócitos, no fígado ocorreu um aumento de dano no grupo 3% e no cérebro houve redução dos danos ao DNA nos grupos com 1% e 2%. Foi observado um aumento da frequência da alteração *Blebbled* no grupo 3% da RAB-A. Nos resultados para a RAB (B), não houve alteração na atividade da AChE cerebral e muscular. Houve redução da SOD e CAT no grupo 3%, as atividades da GPx e GST não foram alteradas. Para a LPO, houve redução no grupo 3%. Difusão do DNA, ensaio cometa e MN não apresentaram alterações. A utilização das RABs na produção de ração é uma das alternativas para trabalhar com os resíduos da produção de biocombustíveis e vem demonstrando que é possível a sua utilização nesse aspecto.

Palavras Chave: Genotoxicidade. Estresse Oxidativo. Tilápia do Nilo. Biomarcadores. Ração para Peixes.

3.2.1 Introdução

A produção de microalgas está em grande expansão no mercado mundial. O investimento na produção de biocombustíveis por microalgas está em alta, apesar do declínio mundial do preço dos combustíveis, sendo uma alternativa que apresenta grande capacidade de evolução. As microalgas também apresentam um mercado direcionado para produtos alimentares, nutracêuticos e cosméticos (WALSH et al. 2018). Além disso, são vendidos componentes de alto valor agregado para a indústria (ENZING et al. 2014). As moléculas produzidas por microalgas naturalmente apresentam alta eficiência durante a sua utilização, diferindo das produzidas sinteticamente, por sua isomeria, que acaba prejudicando na sua eficiência (HALLMANN, 2007).

Peixes podem ser tratados como bioindicadores que através de respostas biológicas apresentam os efeitos ocasionados pelo ambiente em que estão (OOST et al. 2003). Assim, o emprego da biomassa residual na fabricação de alimentos para a produção de peixes é uma possibilidade que permite a junção da avaliação através das respostas biológicas e permite a confirmação que a produção de ração com esse coproduto pode valorizar ainda mais o mercado e a utilização de microalgas na alimentação (BEAL et al. 2015; BALEN et al. 2015; MO et al. 2018).

A criação e o consumo de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) está em expansão na última década (FADL et al. 2017), pois além da sua grande capacidade

de produção, ela é extensivamente utilizada em experimentação para avaliação de usas condições em geral (ÇAVAŞ; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003, 2005; LIMA et al. 2006; GRISOLIA et al. 2009; OMAR et al. 2012; BACOLOD et al. 2017; DANTZGER et al. 2018).

A utilização de processos sustentáveis na produção de energia, pode, juntamente com coprodutos de alto valor agregado, serem aliados na produção de alimentos saudáveis. Dessa forma, neste trabalho buscamos avaliar a possibilidade da utilização de RABs na composição da ração de Tilápia, a fim de avaliar a segurança da sua utilização e os possíveis efeitos aos peixes. Como a RAB passa por processos de extração lipídica envolvendo solventes orgânicos, é importante assegurar que não ocorra perda da qualidade dos nutrientes nela contidos e nem da saúde dos organismos testados.

3.2.2 Material e Métodos

3.2.2.1 Cultivo, extração lipídica e determinação dos pigmentos em microalgas

O cultivo autotrófico de microalgas ocorreu em fotobiorreatores tubulares compactos com volume total de 10 m³ (BALMANT et al. 2009), apresentando sistema de bombas para circulação dos meios e um sistema de compressores para aeração por ar atmosférico, necessário para a fotossíntese. A microalga *Acutodesmus obliquus* (*Scenedesmus obliquus*) foi cultivada em dois diferentes meios de cultivo: A - Meio Sintético Chu; B- Meio composto da biodigestão do efluente oriundo de suinocultura (5%). Após cultivo, as microalgas do cultivo A foram coletadas e floculadas com o sulfato de ferro heptahidratado (FeSO₄.7H₂O) [0.5 g l⁻¹]. Na etapa seguinte foi realizada a centrifugação em centrífuga industrial em modo semi-contínuo com vazão de 4 l.h⁻¹ com rotação de 3000rpm. A secagem do material centrifugado ocorreu por 24h (60 °C). A extração dos lipídios foi realizada com hexano em reator soxhlet por 7h e a remoção do solvente ocorreu por evaporação a 60 °C por 72h. Para as microalgas do cultivo B, após o cultivo, não houve a etapa de floculação, sendo realizada diretamente a centrifugação e secagem do material por 24h (60 °C). A extração a quente dos lipídios foi realizada com hexano em temperatura de 50° C por 2h, em reator com agitação. A remoção do solvente foi realizada por evaporação a 60 °C por

72h. O material remanescente foi a RAB, que para o meio de cultivo sintético foi denominada como RAB-A e para o meio composto da suinicultura, RAB-B.

Para a determinação dos pigmentos de clorofila (*a* e *b*) e carotenoides totais, foi utilizado o método proposto por HE et al. (2015) para a análise da microalga residual. A extração dos pigmentos foi realizada em triplicata, adicionando 500µg de cada RAB (A e B) em tubos protegidos da luz. A diluição ocorreu por adição de 3 ml de etanol 99,1% P.A. e foi deixada em banho maria (60 °C) com agitação por 40 min. Em seguida os tubos foram deixados por 15 min a temperatura de 0 °C. Então, as amostras foram centrifugadas em 1700 x *g* (10 °C) por 5 min. O sobrenadante foi analisado por absorvância a 665 nm (clorofila *a*), 659 nm (clorofila *b*) e 470 nm (carotenoides totais) em espectrofotômetro, utilizando etanol 99,1% P.A. como substância padrão.

3.2.2.2 Produção da ração e regime dos peixes

Para a formulação das rações, foi realizada uma análise bromatológica nas duas RAB utilizadas (Tabela 1). Para cada uma das RAB foi produzida uma ração base, que foi acrescida em três diferentes concentrações (1%, 2% e 3%) das RAB-A e RAB-B. As rações foram produzidas segundo (BALEN et al. 2015), com pequenas alterações para igualar a energia bruta total utilizando o software SuperCrac 6.1 Premium.

Para os testes, foram utilizados 120 machos da espécie *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo), obtidos de um criadouro particular no município de Toledo, estado do Paraná (Brasil). Os peixes foram aclimatados por um período de 30 dias e então separados em dois grupos (A e B). O Grupo A teve peso médio de 69 g e o grupo B, o peso médio foi de 55 g. Cada grupo foi dividido igualmente em 4 tanques de 1000l cada e ambientados em uma estufa climatizada (temperatura média 27° C). O sistema contou com uma taxa de renovação de água constante de 7.000 l dia⁻¹. Os grupos controle, denominados com 0%, foram alimentados com a ração base inicial que foi utilizada na preparação das que contém a RAB (A e B). Os 8 grupos testados foram tratados com as RABs [RAB-A (0%, 1%, 2% e 3%) e RAB-B (0%, 1%, 2% e 3%)] e foram compostos por 15 peixes em cada um deles.

Os tratamentos, contendo as rações obtidas da adição das RABs, foram fornecidos como única fonte alimentar para os exemplares de *O. niloticus* dos grupos 1%, 2% e 3%. O arraçoamento foi realizado três vezes ao dia, por um período de 60 dias consecutivos, respeitando o conceito *ad libitum* para as quantidades disponibilizadas. Após o último dia de alimentação, os peixes foram anestesiados com Benzocaína (100 mg l⁻¹) (GONTIJO et al. 2003) e eutanasiados por secção medular para a coleta das amostras biológicas.

3.2.2.3 Biomarcadores Bioquímicos

Os órgãos coletados para as análises bioquímicas (cérebro, músculo e fígado) foram mantidos sob refrigeração (-80 °C) até o processamento.

Um fragmento do cérebro (\pm 50 mg) e do músculo axial (\pm 100 mg) foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0.1 M, pH 7.5) na proporção 1:10 (peso: volume). O homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 20 min a 4° C. Os sobrenadantes foram aliqüotados para avaliar a atividade da Acetilcolinesterase (AChE) e análise de proteína total.

As concentrações de proteína total foram quantificadas usando o método de Bradford a 595 nm que utiliza uma curva padrão de albumina bovina (BRADFORD, 1976).

Uma porção do fígado (\pm 100 mg) foi homogeneizada em tampão fosfato de potássio (0.1 M, pH 7) na proporção 1:10 (peso: volume) e centrifugado a 15,000 x g por 30 min a 4° C. Os sobrenadantes foram aliqüotados para a análise da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), atividade de glutathione S-transferase (GST), peroxidação lipídica (LPO) e proteína total.

Para mensurar a atividade da AChE cerebral e muscular, foi utilizada a técnica descrita por Ellman et al. (1961) e modificada para microplaca por Silva de Assis, (1998). O método consiste no desenvolvimento de uma reação colorimétrica com iodeto de acetilcolina (ATC) e 5,5-Dithiobis-2 nitrobenzoato (DTNB) na presença de AChE, que pode ser mensurada por espectrofotometria a 405 nm. A atividade é monitorada por 3 minutos com intervalos de 15 segundos e é expressa em nmol. min⁻¹. mg de proteína⁻¹.

A atividade da SOD foi mensurada pela metodologia descrita por Gao et al. (1998), que é baseada na habilidade da SOD em inibir a auto oxidação do pirogalol, que pode ser mensurada a 440 nm. A quantidade de SOD que consegue inibir a reação de auto oxidação do pirogalol em 50% é igual a 1 (U) unidade de SOD, assim, a atividade da SOD é expressa em U de SOD . mg proteína⁻¹.

A atividade da CAT foi mensurada como descrito por Aebi, (1984), onde é considerado como base o consumo de peróxido de hidrogênio exógeno (H₂O₂) pela CAT, gerando H₂O e O₂. Esta reação pode ser medida por espectrofotometria a 240 nm. A leitura da absorbância foi realizada a cada 15 segundos durante 1 minuto e a atividade foi expressa em μmol . min⁻¹ . mg de proteína⁻¹.

A atividade da GPx foi mensurada pelo método proposto por Hafeman et al. (1974), com absorbância a 340 nm que sofre um decréscimo ocasionado pela redução de GSSG (glutathiona oxidada) em GSH, na presença de NADPH, promovido pela GR (glutathiona redutase). A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional a produção de GSSG, pela GPx, na presença de H₂O₂ e a unidade da atividade foi expressa em nmol. min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

A atividade da GST foi mensurada segundo o método descrito por Keen et al. (1976), o método é baseado na catalisação da reação de conjugação do CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a glutathiona reduzida (GSH), pela GST, formando um tioéter que pode ser medido pelo aumento da absorbância a 340 nm e a atividade foi expressa em nmol. min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

Os níveis da LPO foram mensurados pela avaliação da concentração de hidroperóxido de lipídio pelo ensaio FOX (JIANG et al. 1992), medindo por espectrofotometria a 570 nm. A unidade de concentração de hidroperóxidos de lipídio utilizada foi nmol . mg de proteína⁻¹.

3.2.2.4 Biomarcadores Genéticos

O ensaio cometa com as amostras de células hepáticas, cerebrais e sanguíneas foi realizado segundo a técnica descrita por Speit and Hartmann (1999) com modificações para eritrócitos por Cestari et al. (2004) e Ferraro et al. (2004) e adaptado para tecidos por Ramsdorf et al. (2009). As lâminas foram montadas com 5 μl da diluição de 1:50 sangue/soro bovino fetal (FBS). Para os tecidos, uma alíquota

de 10 µl, do homogeneizado de tecido em 500 µl de FBS, foi utilizada. As amostras de sangue e tecidos foram misturadas com 120 µl de agarose com baixo ponto de fusão (0,5%). Essa mistura foi adicionada sobre lâminas para microscopia previamente cobertas com agarose normal (1,5%) e então cobertas com lamínula e colocadas sob refrigeração por 5 min. Após a solidificação da agarose, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram mergulhadas em solução de lise composta por NaCl (2.5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0.8%), N-lauryl sarcosinato (10%), Triton X-100 (1%) e DMSO (10%) por um período mínimo de 24 horas na ausência de luz com refrigeração (4° C). Após o processo de lise, as lâminas foram imersas em solução de NaOH (300 mM) e EDTA (200 mM), pH > 13 por 25 min para a desespiralização do DNA e corrida eletroforética a 300 mA e 25 V (1 V cm⁻¹) por 25 min. As lâminas foram neutralizadas com solução composta por 0.4 M Tris em pH 7.5 por 5 min (3x) e após secas, foram fixadas com etanol 96% por 5 min. Para a análise, 30 µl do corante brometo de etídio foi utilizado com concentração de 0,02 g mL⁻¹ e a análise feita em microscopia de epifluorescência (Leica DM LS2) a 400x de magnificação em teste cego. Foram analisados 100 nucleóides por lâmina e os danos foram classificados de acordo com Collins et al. (1995). Cometas com a cabeça muito pequena ou não existente e cauda muito difusa, não foram considerados na análise por estarem associados com morte celular (FRENZILLI et al. 2009).

O ensaio de difusão do DNA foi realizado segundo descrito por Singh (2000). A montagem, lise e as soluções utilizadas na preparação do material sanguíneo seguiram a mesma metodologia descrita no ensaio cometa, até antes da desespiralização. As lâminas foram deixadas por 12 min em pH > 13 no tampão para desespiralização do DNA e neutralizadas logo após com solução Tris (0,4 M; pH 7.5) por 5 min (3x). Após secas, foram fixadas com etanol 96% por 5 min. Para a análise, 30 µl do corante brometo de etídio foi utilizado com concentração de 0,02 g mL⁻¹ e a análise feita em microscopia de epifluorescência (Leica DM LS2) a 400x de magnificação em teste cego. Foram analisados 100 nucleóides por lâmina.

A metodologia utilizada para o teste do micronúcleo písceo foi desenvolvida por Heddle (1973) e Schmid (1975) com algumas alterações segundo Ferraro et al. (2004). Para o teste do micronúcleo písceo e alterações morfológicas nucleares (NMA), uma lâmina foi preparada por animal, contendo o esfregaço do sangue periférico. Após secar, as lâminas foram fixadas em etanol 95% por 30min. As lâminas

foram coradas com Giemsa 10% em tampão fosfato com pH 6,8 por 12 min. Para cada peixe foram analisados 2000 eritrócitos com membrana plasmática intacta. As NMAs foram classificadas segundo descrito por Carrasco et al. (1990) com *blebbed*, *notched*, *lobed* e *vacuolated*. Com a soma de todas as alterações e micronúcleos é possível calcular o número de alterações totais.

3.2.2.5 Análise estatística

Os valores da análise de clorofila e carotenoides foram expressos em média \pm desvio padrão. Para os dados dos biomarcadores, a normalidade e homocedasticidade foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e Barlett, sendo a presença de *outliers* analisada pelo teste de Grubbs (Alpha = 0,05). Para os dados paramétricos foram realizadas análises de variância (ANOVA) seguidas do pós-teste de Newman-Keulls ($p < 0,05$) e os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Para os dados não paramétricos foram realizadas análises utilizando o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$) e os resultados foram apresentados em mediana \pm quartis mínimos e máximos.

3.2.3 Resultados

Durante o período de experimentação, não foi registrada morte de nenhum peixe utilizado nos grupos experimentais.

3.2.3.1 Determinação da clorofila e composição da RAB

Após a extração lipídica de *A. obliquus*, foi realizada a análise da sua composição (Tabela 1), mostrando diferenças na composição de cada RAB. O resultado das quantificações de clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides totais na RAB-A e RAB-B, mostram que a RAB-A apresenta uma quantidade maior de pigmentos de clorofila, enquanto que a RAB-B apresenta a quantidade de carotenoides totais maior (Tabela 2).

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DA RAB-A E RAB-B

CONTEÚDO	RAB-A	RAB-B
MS (%)	93,24747	94,6762
CZ (%)	38,78493	8,999781
EE (%)	1,347804	0,520769
PT (%)	25,06927	42,79849
EB (kcal kg ⁻¹)	2937,21	4573,42

FONTE: Capítulo 1.

MS (matéria seca); CZ (cinzas / matéria mineral); EE (extrato etéreo);
PT (proteína bruta); EB (energia bruta)

TABELA 2: IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE CLOROFILAS E CAROTENOIDES TOTAIS.

	CLOROFILA a	CLOROFILA b	CLOROFILA a+b	CAROTENOIDES
RAB - A	23,55 ± 3,42 mg/l	6,07 ± 2,33 mg/l	29,62 mg/l	0,84 ± 0,31 mg/l
RAB - B	15,33 ± 1,26 mg/l	5,47 ± 0,39 mg/l	20,80 mg/l	1,27 ± 0,08 mg/l

FONTE: Capítulo 1.

3.2.3.2 Biomarcadores Bioquímicos

Nossos resultados mostraram que as enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) não apresentaram alteração entres os grupos de *O. niloticus* alimentados com a RAB-A, diferentemente do grupo com a RAB-B, em que foi observada uma pequena redução da atividade das enzimas SOD e CAT no grupo suplementado com 3% (Figura 1).

Quanto à análise da atividade da GST, não houve alteração nos dois grupos com as duas RAB (A e B), mas houve redução da LPO em todos os grupos suplementados com RAB-A e no grupo suplementado com 3% da RAB-B (Figura 2).

Os resultados da enzima AChE no músculo dos grupos suplementados com a RAB-A e nos dois tecidos analisados dos grupos suplementados com a RAB-B, não se mostraram com diferenças significativas. Contudo, um aumento progressivo na AChE cerebral dos grupos suplementados com 2% e 3% de RAB-A foi observado (Figura 3).

FIGURA 1: ATIVIDADES DAS ENZIMAS SOD, CAT E GPX EM TECIDO HEPÁTICO DE *Oreochromis niloticus* ALIMENTADOS POR 60 DIAS COM RAÇÕES CONTENDO 0%, 1%, 2% E 3% DE RAB-A E RAB-B. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS ($p < 0,05$). GRÁFICOS COM MÉDIA E ERRO PADRÃO.

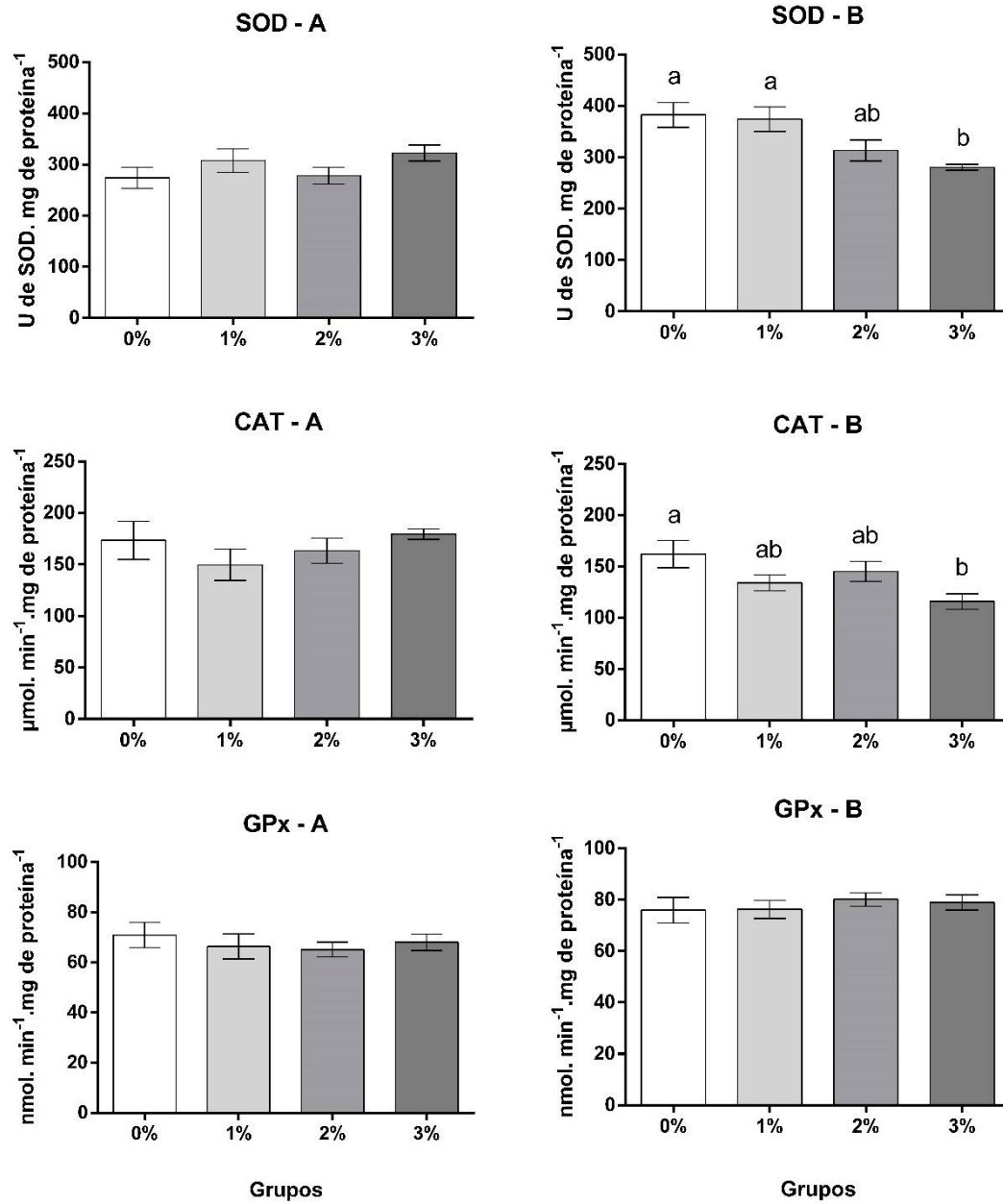


FIGURA 2: ATIVIDADE DA ENZIMA GST E A QUANTIFICAÇÃO DA LPO EM TECIDO HEPÁTICO DE *Oreochromis niloticus* ALIMENTADOS POR 60 DIAS COM RAÇÕES CONTENDO 0%, 1%, 2% E 3% DE RAB-A E RAB-B. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS ($p < 0,05$). GRÁFICOS COM MÉDIA E ERRO PADRÃO.

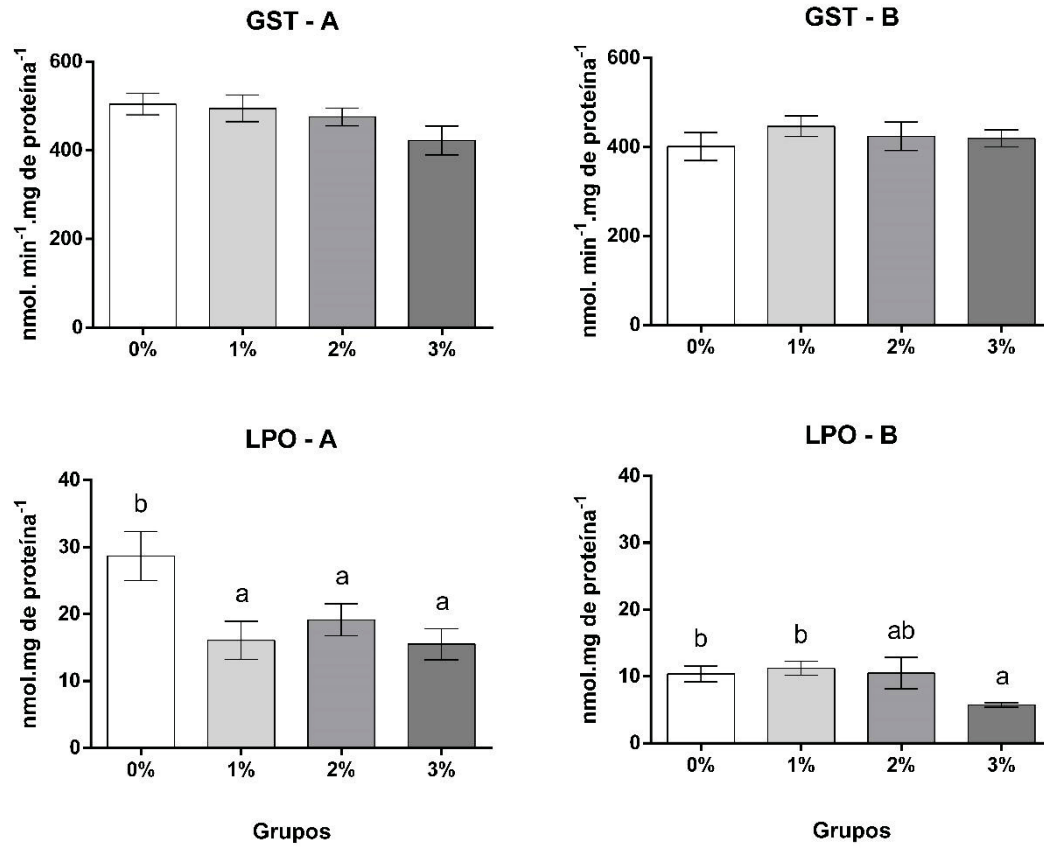
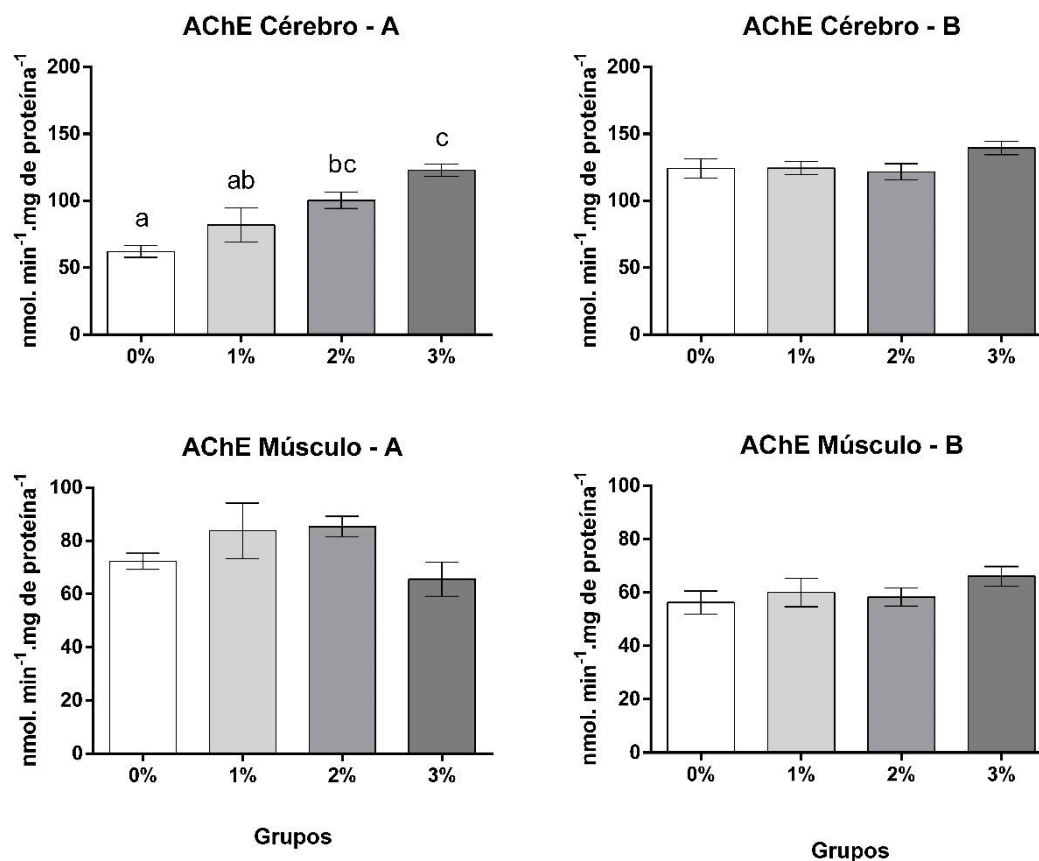


FIGURA 3: ATIVIDADE DA ENZIMA AChE EM TECIDO CEREBRAL E MUSCULAR DE *Oreochromis niloticus* ALIMENTADOS POR 60 DIAS COM RAÇÕES CONTENDO 0%, 1%, 2% E 3% DE RAB-A E RAB-B. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS ($p < 0,05$). GRÁFICOS COM MÉDIA E ERRO PADRÃO.

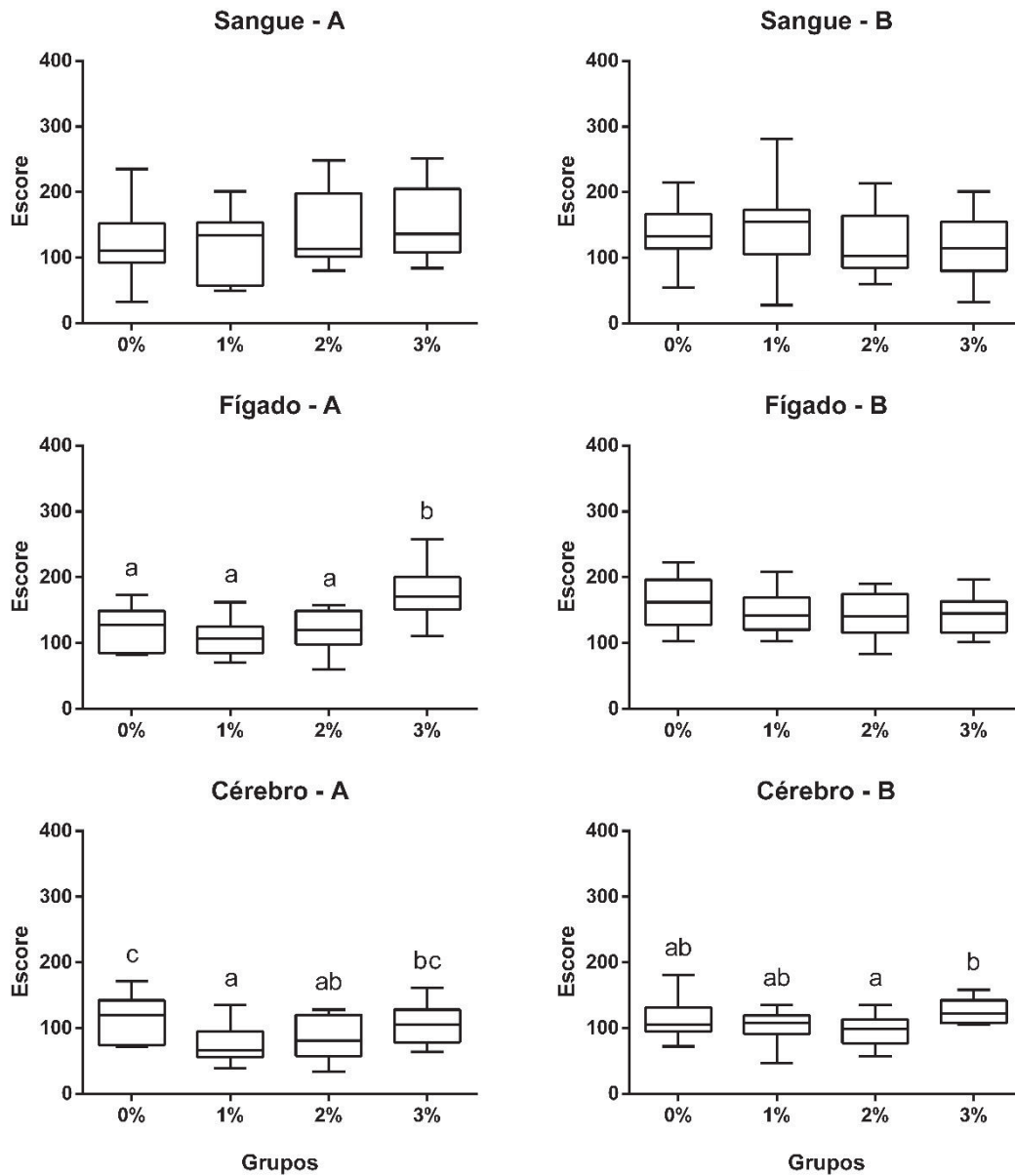


3.2.3.3 Biomarcadores Genéticos

No ensaio de difusão do DNA, que avalia a frequência de células normais, necróticas e apoptóticas, não foram observadas alterações das frequências das células sanguíneas normais em todos os 8 grupos (RAB-A e RAB-B).

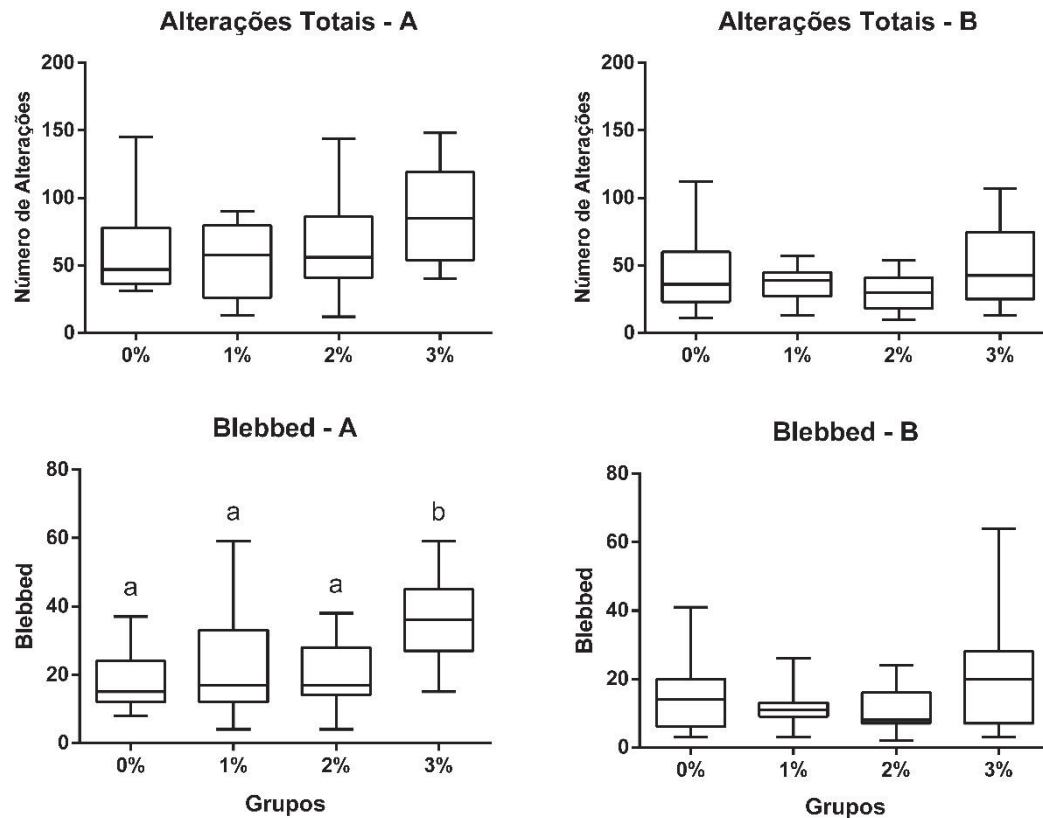
Os resultados do ensaio cometa (Figura 4) mostraram que quando foi utilizada a RAB-A, o tecido sanguíneo não apresentou alteração do nível de danos ao DNA, entretanto ocorreu um aumento dos danos no tecido hepático nos peixes expostos à 3% e redução dos danos no tecido cerebral nas concentrações de 1% e 2% de RAB. Nos peixes suplementados com a RAB-B não foi observada, nos três tecidos, alteração nos níveis de danos ao DNA.

FIGURA 4: NÍVEIS DE DANOS AO DNA (ESCORE) NOS TECIDOS SANGUÍNEO, HEPÁTICO E CEREBRAL DE *Oreochromis niloticus* ALIMENTADOS POR 60 DIAS COM RAÇÕES CONTENDO 0%, 1%, 2% E 3% DE RAB-A E RAB-B. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS ($p < 0,05$). GRÁFICOS COM MEDIANAS E QUARTIS.



Foram avaliados 2.000 eritrócitos com membranas íntegras por animal, não houve alterações nas frequências de *vacuolated*, *notched*, *lobed* e micronúcleos entre os grupos, também foi observado que não houve diferença na frequência de alterações totais entre todos os grupos. Para a alteração do tipo *blebbed*, foi verificado aumento no grupo contendo 3% da RAB-A, enquanto que para a RAB-B não houve variação na ocorrência de nenhuma das alterações analisadas (Figura 5).

FIGURA 5: ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES E MICRONÚCLEOS EM ERITRÓCITOS PERIFÉRICOS DE *Oreochromis niloticus* ALIMENTADOS POR 60 DIAS COM RAÇÕES CONTENDO 1%, 2% E 3% DE RAB-A E RAB-B. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS ($p < 0,05$). GRÁFICOS COM MEDIANAS E QUARTIS.



3.2.4 Discussão

Devido ao método de extração lipídica e além das diferenças nos meios de cultura utilizados na sua produção, as RABs também podem apresentar diferenças nas suas composições, sendo os métodos que utilizam hexano puro como o solvente acabam apresentando baixo rendimento de extração e, assim, podendo preservar mais componentes de interesse para a alimentação, considerando que a quantidade de ácidos graxos insaturados totais presentes na espécie de microalga *A. obliquus* é superior a 60% do total de lipídios produzidos (ESCORSIM et al. 2018). Essa composição reflete a capacidade das microalgas de suprir o ambiente aquático com a produção de ácidos graxos (MORAES; COLLA, 2006).

As biomassas também diferem na quantidade de matéria mineral, a RAB-A, cultivada em um meio de Chu, passou por um processo de floculação, onde foi utilizado o sulfato ferroso, levando a um aumento da proporção dos minerais na sua composição (38,78%). Diferentemente, a RAB-B cresceu em um meio de cultivo onde os nutrientes eram fornecidos por um biodigestor alimentado com dejetos suínos. Processo diferente da utilização direta, onde o dejetos é adicionado diretamente no cultivo de peixes para estimular o crescimento de algas (CHENG et al. 2016). A RAB-B não passou pelo processo de floculação, resultando em uma biomassa com menor quantidade de material mineral (8,99%), sendo as suas proporções totais como proteínas (42,79%) e energia bruta (4573,42 kcal kg⁻¹) maiores do que as da RAB-A.

Os efeitos benéficos das microalgas como suplemento têm mostrado que a sua utilização pode ser eficiente no aumento da resposta imune e na saúde dos animais que se alimentam delas (BELAY et al. 1996). Entretanto, as melhoras podem ser relacionadas a composição dessas microalgas. Em experimento com peixes da espécie African catfish (*Clarias gariepinus*), expostos à contaminação por chumbo (Pb) e alimentados com rações contendo microalgas, Sayed et al. (2017) observaram um efeito protetivo para as células do fígado com a redução dos níveis de lipoperoxidação e danos ao DNA. Também foi observado um aumento da capacidade antioxidante, principalmente nos grupos com acréscimo de 0,5% da microalga. Em trabalhos utilizando microalgas *Chlorella*, Xu et al. (2014), observaram que a adição de 0,8% a 1,2% de biomassa por 60 dias, proporcionou um aumento do crescimento, da resposta imune e uma maior atividade das enzimas digestivas em Carpas (*Carassius gibelio*). Esses efeitos foram corroborados pelo trabalho de Zhang et al. (2014), onde destacaram que a melhora da resposta imune inata e adaptativa pode ser em decorrência do aumento em algumas expressões gênicas estimuladas pela ingestão das microalgas.

Em outros trabalhos utilizando peixes da espécie *O. niloticus*, Hossain et al. (2017), suplementaram a dieta dessa espécie com *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis* e observaram um aumento do crescimento e o perfil de ácidos graxos na composição corporal dos peixes. Fadl et al. (2017), utilizando *O. niloticus*, observaram aumento do crescimento e melhora na resposta imunológica contra infecção por *Aeromonas hydrophila* quando alimentados com ração contendo *S. platensis* e *C. vulgaris* adicionadas na ração base. Abdel-Tawwab e Ahmad (2009) também

obtiveram resultados positivos no crescimento e resistência de *O. niloticus* utilizando a microalga *S. platensis* na concentração de 5g kg⁻¹. Jung et al. (2017), utilizando um sistema de filtragem autotrófico composto por microalgas *S. obliquus* e *C. vulgaris*, obtiveram dois resultados de interesse: melhor qualidade da água, devido a eficiência do sistema autotrófico e aumento da resposta imunológica de *O. niloticus*, devido à ingestão das microalgas presentes no sistema.

Os níveis da LPO reduzidos nos grupos alimentados com a ração contendo a RAB-A indicam uma melhora dessa condição para os três grupos, diferindo da RAB-B que apresentou redução na LPO na concentração de 3%. O resultado de aumento da AChE nos grupos 2% e 3% da RAB-A, juntamente com a redução da LPO, são corroborados com os resultados obtidos de Sayed et al. (2017) e por Abdelkhalek et al. (2015, 2017), onde houve a redução do processo de lipoperoxidação utilizando microalgas na alimentação.

Apesar do o aumento de dano ao DNA no tecido hepático e da elevada frequência de alteração do tipo *blebbed*, nos peixes alimentados com 3% da RAB-A, foi observada uma redução dos níveis de dano ao DNA do tecido cerebral para os grupos intermediários da RAB-A (1% e 2%) e, também houve uma elevação dos níveis de AChE para os grupos de maior concentração. Essa atividade da AChE elevada, foi previamente observada em peixes da espécie *Rhamdia quelen* quando alimentados com a RAB-A, além de ter ocorrido declínio dos danos genéticos do tecido hepático (resultados ainda não publicados).

A introdução de produtos que contenham algas para substituir ingredientes com alto valor agregado não é recente (APPLER; JAUNCEY, 1983). Em trabalho de Appler (1985), foi substituída uma porção proteica por algas *Hydrodictyon reticulatum* nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%, na alimentação das espécies de Tilápias *O. niloticus* e *Tilapia zillii*, sendo observada melhora no rendimento com a substituição de 5%.

Abomohra et al. (2014) utilizaram a microalga *S. obliquus* para extração de lipídios destinados a produção de biodiesel e a biomassa residual de algas foi aproveitada para a alimentação de *Artemia*, o meio enriquecido com a biomassa residual, proporcionou aumento no crescimento de Artemias e reduziu as taxas de mortalidade no cultivo. No presente trabalho, foram utilizadas duas RABs, cultivadas com meio de cultura distintos que passaram por processos de extração também

diferenciados. Pode-se observar que a RAB-A apresentou uma composição diferenciada da RAB-B, sendo a segunda superior na quantidade de energia bruta, proteína total e carotenoides totais. Esses resultados também indicam que a RAB-B poderia atuar como uma possível fonte proteica (APPLER; JAUNCEY, 1983; APPLER, 1985; KIM et al. 2002), além de não apresentar danos oxidativos e nem no DNA dos organismos testes (peixes), além da redução da LPO pela presença natural de ácidos graxos.

Estudar o sistema imune é de grande interesse para observar as respostas de alterações ocasionadas pela ingestão das microalgas (BELAY et al. 1993; PULZ; GROSS, 2004; MORAES; COLLA, 2006; XU et al. 2014; KHALIL et al. 2017), pois devido às suas características e composição das biomassas, são notórias as contribuições podem ser feitas a esse sistema.

3.2.5 Conclusão

Neste trabalho pudemos observar que houveram diferenças entre as RABs utilizadas, onde a RAB-A, que passou por uma etapa maior de processamento, acabou apresentando uma maior variação de resultados. A RAB-B, apresentou uma quantidade reduzida de matéria mineral, sendo as suas respostas aos biomarcadores mais regulares. Podemos verificar que as formulações das RABs podem variar e que a maioria dos resultados corroboram com os efeitos benéficos observados na literatura para a utilização de microalgas (KIM et al. 2002; HABIB et al. 2008; ABDELKHALEK et al. 2015, 2017).

O meio de cultura é essencial para o crescimento das microalgas, muitos podem contribuir para o aumento da produção de lipídios totais (WANG et al. 2016). A utilização desses produtos deve ser controlada para que não haja contaminação. A RAB-B é oriunda de um meio de cultivo que, diferente da utilização direta do esterco de porco para a criação de peixes (WONG et al. 2016), recebe um efluente tratado por um biodigestor que utiliza este esterco como fonte de nutrientes. Contudo, a RAB-B não apresentou resultados que pudessem preocupar e inviabilizar a sua utilização. O controle e padronização na produção das RABs é fundamental para a sua utilização.

Agradecimentos

Os agradecimentos vão para toda a equipe dos laboratórios da Universidade Federal do Paraná (UFPR), que trabalharam neste estudo. Laboratório de Tecnologia em Aquicultura; Laboratório de Toxicologia Ambiental; Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável e Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental. Os autores também agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro e CAPES pelo fornecimento da Bolsa.

3.3 CAPÍTULO 3: DIETAS CONTENDO BIOMASSA RESIDUAL DE MICROALGAS PROTEGEM OS PEIXES CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO E OS DANOS AO DNA

Autores:

^{1,2}Antonio Ernesto Meister Luz Marques; ³Rafael Ernesto Balen; ⁴Letícia da Silva Pereira Fernandes; ²Cintya Marques Motta; ⁴Helena Cristina Silva de Assis; ²Dhyogo Miléo Taher; ³Fábio Meurer; ^{2,5}André Bellin Mariano; ^{2,6}José Viriato Coelho Vargas; ^{1,2}Marta Margarete Cestari

¹ Lab. Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

² Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS)

³ Lab. Tecnologia em Aquicultura, Departamento de Zoologia (UFPR).

⁴ Lab. Toxicologia Ambiental, Departamento de Farmacologia (UFPR).

⁵ Departamento de Engenharia Elétrica (UFPR).

⁶ Departamento de Engenharia Mecânica (UFPR).

Resumo

O cultivo de microalgas é uma alternativa de produção para o biodiesel e, após extração de óleo, obtém-se a biomassa residual de microalgas (RAB). Por serem grandes produtoras de antioxidantes e uma vez que os alimentos que contêm essas substâncias são reconhecidamente benéficos, a RAB foi testada como um ingrediente na produção de ração para peixes. Não obstante, a avaliação de risco deste coproduto deve ser realizada para prevenir danos à saúde dos animais que venham a utilizá-la na alimentação. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar, através de biomarcadores bioquímicos e genéticos, a segurança da RAB da microalga *Acutodesmus obliquus*, cultivada em meio sintético Chu, e utilizada na formulação de rações para a alimentação de bagres da espécie *Rhamdia quelen*. Foi produzida uma ração padrão sem a RAB (0%) e 3 outras rações enriquecidas com a RAB nas proporções de 1%, 2% e 3%. Cada tipo de ração foi administrada a um grupo de 15 peixes por 60 dias. Os biomarcadores bioquímicos avaliados foram: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidação lipídica (LPO) no fígado; acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e no músculo. Os biomarcadores genéticos analisados foram: o teste da difusão do DNA em eritrócitos, ensaio cometa em eritrócitos, fígado e cérebro e o micronúcleo písceo em eritrócitos. A atividade da SOD e da AChE cerebral e muscular aumentaram no grupo tratado com 3% de RAB, a atividade de CAT e os níveis de LPO não apresentaram diferença entre os grupos. No ensaio cometa, observou-se uma redução significativa no dano ao DNA em eritrócitos dos grupos de 2% e 3% de RAB e houve redução de danos ao DNA no tecido hepático para o grupo com 3% de RAB. No cérebro, não foram observadas alterações. Estes resultados corroboram que, à medida que a quantidade de RAB aumenta, os organismos apresentaram um potencial efeito antioxidante, sendo que o grupo com 3% de RAB apresentou os melhores resultados.

Palavras-chave: Antioxidantes. Carotenoides. Clorofila. Suplementação.

3.3.1 Introdução

A microalga *Acutodesmus obliquus* (*Scenedesmus obliquus*) é uma espécie dentro de um gênero usado com frequência como aditivo alimentar em combinação com outras fontes de proteicas (RICHMOND; HU, 2013; NORAMBUENA et al. 2015). O uso das microalgas já está bem estabelecido e elas podem ser empregadas no cultivo de peixes para o enriquecimento nutricional dos e, mesmo após o processo de extração de lipídios, o material remanescente, conhecido como biomassa residual de microalga (RAB), pode ser aproveitado para a suplementação na alimentação de peixes (BALEN et al. 2015).

Preliminarmente, as microalgas podem produzir produtos químicos com alto valor agregado (DAMERGI et al. 2017). Entre estes elementos, estão os carotenoides e as clorofilas, que são compostos fitoquímicos bioativos geralmente indicados nas dietas como uma forma de prevenção contra doenças (RAO; RAO, 2007; REIS et al. 2015). Os compostos que possuem característica antioxidante são relacionados pela capacidade de atuar reduzindo os danos causados ao DNA, principalmente por estresse oxidativo (AZQUETA; COLLINS, 2012).

A espécie *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824) (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE), conhecida popularmente como Jundiá, é muito utilizada em pisciculturas por sua grande capacidade econômica, carne com poucos espinhos (CANTON et al. 2007), facilidade na reprodução induzida e alta taxa de fertilização (GOMES et al. 2000). Além disso, também é muito utilizada como modelo para estudos toxicológicos (MIRON et al. 2005; RAMSDORF et al. 2009; KOCHHANN et al. 2009; PAMPLONA et al. 2011; GHISI et al. 2011; BECKER et al. 2013; ZEPPENFELD et al. 2014; PIANCINI et al. 2015; GHELFI et al. 2016; GUILOSKI; STEIN PIANCINI; et al. 2017b).

O objetivo deste estudo foi utilizar a RAB da microalga de *A. obliquus* como suplemento na ração de peixes da espécie *R. quelen* e verificar a segurança dessa alimentação por meio de uma análise de risco utilizando os biomarcadores bioquímicos e genéticos.

3.3.2 Material e Métodos

A microalga *A. obliquus* foi cultivada em fotobiorreator (10 m³) (BALMANT et al. 2009), com aeração comum e utilizando o meio sintético Chu. Após o crescimento, as microalgas foram coletadas, floculadas com sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄.7H₂O) [0.5 g l⁻¹] e secas para a extração lipídica. O material restante da extração gerou a RAB, que foi adicionada em diferentes concentrações 1%, 2% e 3% na ração para alimentação dos peixes. A produção e a composição dos alimentos foram as mesmas que as utilizadas por Balen et al. (2015). Estas rações foram oferecidas, como a única fonte de alimento, para a espécie *R. quelen*, três vezes por dia, durante 60 dias consecutivos *ad libitum*.

No experimento, utilizaram-se 60 alevinos previamente aclimatados durante 30 dias. A separação dos peixes foi feita aleatoriamente em 4 grupos com três repetições cada, totalizando 15 peixes por grupo. Os peixes foram colocados em 3 tanques de 1000 L contendo 4 hapas de peixes com os grupos aleatorizados. Um dos grupos foi denominado 0% porque não recebeu nenhuma concentração de RAB na ração. Nos outros três grupos, as concentrações de RAB foram de 1%, 2% e 3%. Após o 60º dia, os peixes foram anestesiados com Benzocaína (100 mg l⁻¹) (Gontijo et al. 2003), o sangue foi coletado, então eutanasiados por seção da medula espinhal para coleta do fígado, cérebro e músculo. As amostras foram acondicionadas de acordo com a técnica indicada para cada biomarcador.

3.3.2.1 Determinação dos pigmentos da RAB

Para a determinação dos pigmentos de clorofila (*a* e *b*) e carotenoides totais foi utilizado o método proposto por He et al. (2015) com modificações para análise da biomassa residual. A extração dos pigmentos foi realizada em triplicata adicionando RAB em tubos de ensaio protegidos da luz, diluindo em 3 ml de etanol 99,1% e agitados por 40 min à 60°C em banho maria. Após, os tubos foram deixados a 0°C por 15 min. As amostras foram centrifugadas (4000 rpm; 10°C) por 5 min. O sobrenadante das amostras foi analisado por absorvância de 665 nm para a clorofila *a*, 659 nm para a clorofila *b* e 470 nm para os carotenoides totais, utilizando espectrofotômetro com etanol 99,1% como padrão.

3.3.2.2 Biomarcadores bioquímicos e genéticos

As amostras destinadas para a análise dos biomarcadores bioquímicos foram estocadas em ultrafreezer a -80°C .

Os fragmentos de cérebro (± 50 mg) e do músculo axial (± 100 mg) foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5), numa proporção 1:10 (peso: volume). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 12.000 xg por 20 minutos à 4°C . O sobrenadante foi aliquoteado para a análise da atividade da AChE.

Para a preparação das amostras foi utilizada uma porção de no máximo 100 mg de cada amostra de fígado, o material foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), numa proporção de 1:10 (peso:volume) e centrifugados à 15.000 g por 30 minutos à 4°C . O sobrenadante foi aliquoteado para a análise das atividades da SOD, CAT e níveis de LPO.

A atividade da AChE cerebral e muscular foi medida segundo método de Ellman et al. (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). O método consiste no desenvolvimento de uma reação colorimétrica entre o ATC (iodeto de acetiltiocolina) e o DTNB (5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato) na presença de AChE, que pode ser mensurada por espectrofotometria a 405 nm. As amostras foram diluídas para $800\ \mu\text{g}$ de proteína. mL^{-1} em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,5). Em microplaca foram pipetados 50 μl de amostra, 200 μl de DTNB (0,75 mM) e 50 μl de ATC (9 mM), respectivamente. A leitura da atividade foi feita por 3 minutos em intervalos de 15 segundos, e a mesma foi expressa em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

A CAT foi medida como descrito por Aebi (1984), baseado no consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) exógeno pela CAT, gerando H_2O e O_2 , podendo ser mensurado por espectrofotometria a 240 nm. As amostras foram diluídas (1:5) e, como substrato, foi utilizada uma solução de H_2O_2 a 20 mM. Em microplaca foi adicionado 5 μl da amostra com 295 μl da solução de H_2O_2 . A leitura da absorbância foi realizada a cada 15 segundos durante 1 minuto e a atividade foi expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína $^{-1}$.

A atividade da SOD foi medida de acordo com a metodologia descrita por Gao et al. (1998), baseada na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. Em microtubos foram adicionados 885 μl de tampão Tris/EDTA (1 M / 5 mM, pH 8,0) e 50 μl de pirogalol (15 mM) a 40 μl de cada amostra. A solução foi incubada por 30

minutos. A reação foi interrompida com 25 μ l de HCl 1N. Em microplaca foi adicionado 300 μ l por poço e a leitura realizada em espectrofotômetro a 440 nm. Concomitantemente, um controle por amostra foi realizado com adição dos reagentes, mas sem incubação, sendo este o valor de 100%. A quantidade de SOD que inibe a reação de auto-oxidação do pirogalol em 50% (IC50) equivale a 1 unidade (U) de SOD. A atividade foi expressa em U de SOD.mg de proteína⁻¹.

A LPO foi analisada pela avaliação da concentração de hidroperóxidos no ensaio FOX (JIANG et al. 1992), a leitura foi feita em espectrofotômetro a 570 nm. O método consiste na oxidação do ferro, mediada pela presença de peróxidos em meio ácido. Os sobrenadantes foram diluídos em metanol (1:2 v/v) e centrifugados. Uma alíquota de 100 μ l do sobrenadante foi incubada por 30 minutos com 900 μ l da solução reação contendo laranja de xilenol (0,1 mM), BHT (4 mM), sulfato ferroso amoniacal (2,5 mM) e ácido sulfúrico (25 mM), diluídos em metanol. A unidade de concentração de peróxidos lipídicos usada foi nmol.mg de proteína⁻¹.

Amostras de fígado, cérebro e sangue foram utilizadas para o ensaio do cometa como descrito por Speit; Hartmann, (1999) com modificações Cestari et al. (2004) e Ferraro et al. (2004) para eritrócitos e para tecidos segundo Ramsdorf et al. (2009). Para a montagem das lâminas foram utilizados 5 μ L das diluições feitas de 1:50 de sangue / soro bovino fetal (SBF) e, para os tecidos, foi retirada a alíquota de 10 μ L dos tecidos homogeneizados em SBF, logo as amostras foram misturadas em 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) (0,5%). As misturas foram adicionadas sobre lâminas histológicas previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (NMP) (1,5%). As lâminas foram colocadas em uma solução de lise composta de NaCl (2.5M), EDTA (100mM), Tris (10mM), NaOH (0,8%), N-lauril-sarcosinato (10%), Triton X-100 (1%) e DMSO (10%) por um período mínimo de 24h e mantidas em ambiente escuro a uma temperatura de 4°C. Posteriormente as lâminas foram imersas em uma solução de NaOH (300mM) e EDTA (200mM), pH>13 por 25 minutos para a desespiralização do DNA e a corrida eletroforética foi realizada a 300 mA e 1V/cm por 25 minutos. As lâminas foram neutralizadas em Tris (0,4 M; pH 7,5) por 5 min (3x) e após secas foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos. Para a análise as lâminas foram coradas com 30 μ L da solução de brometo de etídio (0,02g.mL⁻¹) e os danos foram mensurados através de microscópio de epifluorescência (Leica DM LS2) com magnificação de 400x. Foram analisados, em

teste cego, 100 nucleóides por lâmina, em teste cego e classificados de acordo com os níveis de dano segundo Collins et al. (1995). Os cometas com cabeça extremamente pequena ou inexistente e cauda muito difusa não foram considerados na análise por estarem associados com morte celular (FRENZILLI et al. 2009).

Para o ensaio de difusão, foi utilizada a técnica descrita por Singh (2000). A montagem, lise e soluções utilizadas na preparação do material sanguíneo, seguiu a mesma metodologia descrita para o ensaio cometa até antes da corrida eletroforética. As lâminas ficaram por 12 minutos em tampão pH>13 para a desespiralização do DNA e em seguida foram retiradas, neutralizadas em Tris (0,4 M; pH 7,5) por 5 min (3x) e depois de secas foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos. As lâminas foram coradas com 30 µL da solução de Brometo de Etídio (0,02g.mL⁻¹). Então 100 nucleóides foram analisados em teste cego por lâmina.

No ensaio do micronúcleo písceo (MN) e alterações morfológicas nucleares (AMN) foi utilizada a metodologia desenvolvida por Heddle (1973) e Schmid (1975) com modificações segundo Ferraro et al. (2004). Para o teste foram confeccionadas uma lâmina por animal com o esfregaço do sangue periférico, que após a secagem foram fixadas em etanol 95% por 30 minutos. As lâminas foram coradas com Giemsa 10% em tampão fosfato pH 6,8 por 12 minutos. Para cada peixe foram analisados 2000 eritrócitos com membrana plasmática intacta, sendo contabilizados os micronúcleos e as alterações morfológicas classificadas por Carrasco et al. (1990) como *Blebbled*, *Notched*, *Lobed* e *Vacuolated*.

3.3.2.3 Análise estatística

Os valores da análise de clorofila e carotenoides foram expressos em média ± desvio padrão. Para os dados dos biomarcadores, a normalidade e homocedasticidade foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e Barlett, sendo a presença de *outliers* analisada pelo teste de Grubbs (Alpha = 0,05). Para os dados paramétricos foram realizadas análises de variância (ANOVA) seguidas do pós-teste de Newman-Keulls (p <0,05) e os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. Para os dados não paramétricos foram realizadas análises utilizando o teste Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn (p <0,05) e os resultados foram apresentados em mediana ± quartis mínimos e máximos.

3.3.3 Resultados

Os pigmentos de clorofila (*a* e *b*) e a determinação total de carotenoides (TABELA 1) mostram que a RAB apresenta pigmentos de clorofila e carotenoides.

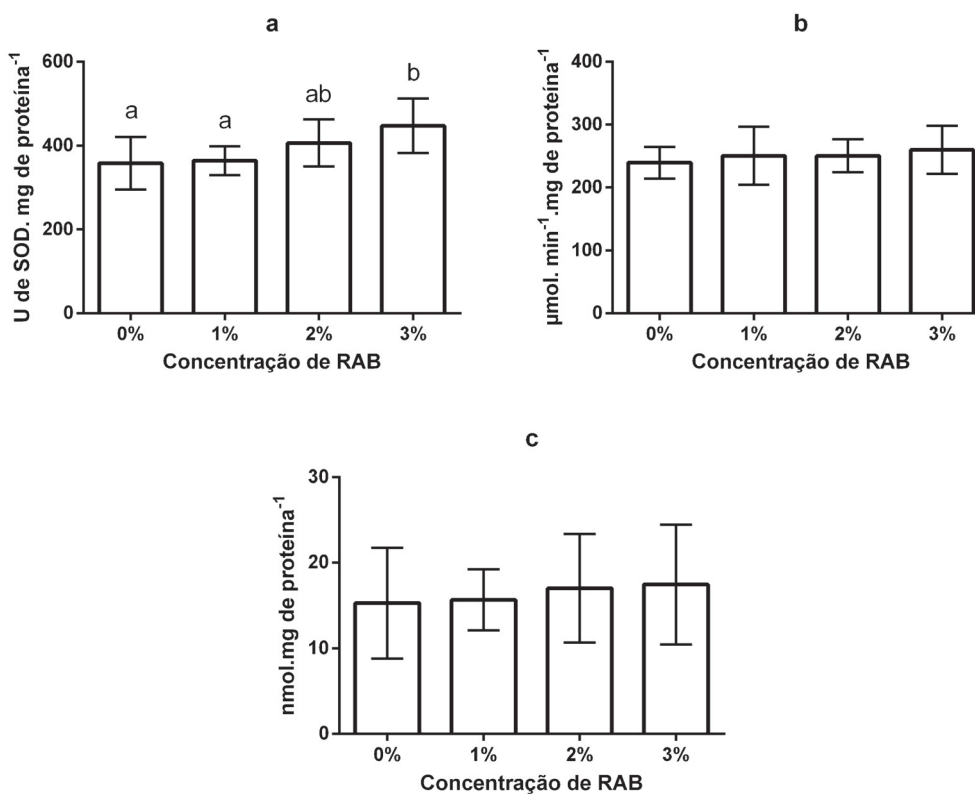
TABELA 1: CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS NA BIOMASSA RESIDUAL DE MICROALGAS

	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenoides
RAB	23,55 ± 3,42 mg/l	6,07 ± 2,33 mg/l	0,84 ± 0,31 mg/l

Quantidades de clorofilas *a* e *b*, carotenoides totais e determinação em miligramas por litro na RAB. Cálculos realizados após análise nas absorvâncias 665, 649 e 470 nm, respectivamente. Resultados expressos em média e desvio padrão (n=3).

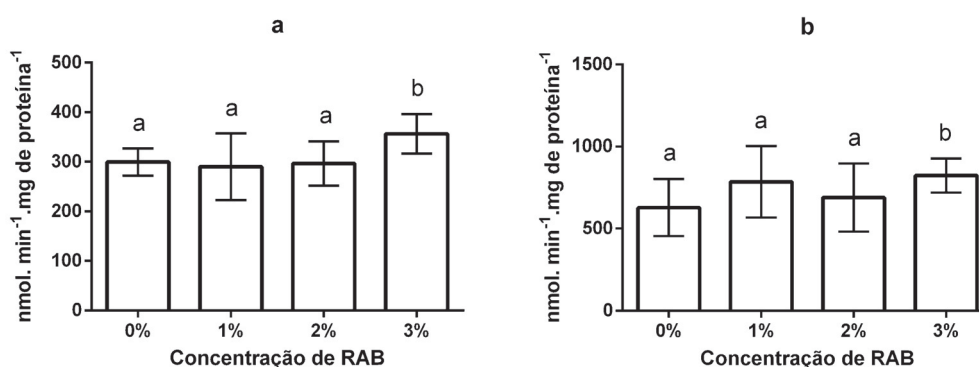
Para os biomarcadores bioquímicos no tecido hepático, observou-se o aumento da atividade SOD (Fig. 1a) em peixes alimentados com RAB a 3%. Os outros biomarcadores bioquímicos, CAT (Fig. 1b) e LPO (Fig. 1c), não mostraram diferença nos grupos alimentados com RAB em relação ao controle (0%).

FIGURA 1: *Rhamdia quelen* ALIMENTADOS COM RAÇÃO CONTENDO RAB NAS CONCENTRAÇÕES DE 0%, 1%, 2% E 3% DURANTE 60 DIAS (n = 15 POR GRUPO). SOD (a), CAT (b) E LPO (c) EM TECIDO HEPÁTICO. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM A DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS (p < 0,05). GRÁFICOS COM MÉDIA E ERRO PADRÃO.



A atividade de AChE no cérebro (Fig. 2a) teve um aumento no grupo RAB de 3% e a mesma resposta foi observada no músculo (Fig. 2b) para a concentração de RAB 3%.

FIGURA 2: *Rhamdia quelen* ALIMENTADO COM RAÇÃO CONTENDO RAB NAS CONCENTRAÇÕES DE 0%, 1%, 2% E 3% DURANTE 60 DIAS (n = 15 POR GRUPO). ATIVIDADE DA AChE EM CÉREBRO (a) E MÚSCULO (b). LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM A DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS (p <0,05). GRÁFICOS COM MÉDIA E ERRO PADRÃO.



No ensaio de difusão (TABELA 2), a frequência inicial das células apoptóticas foi maior no grupo RAB 0% do que nos outros grupos. A redução das células apoptóticas foi progressiva de acordo com o aumento da concentração de RAB, sendo a maior redução observada em 3% de RAB.

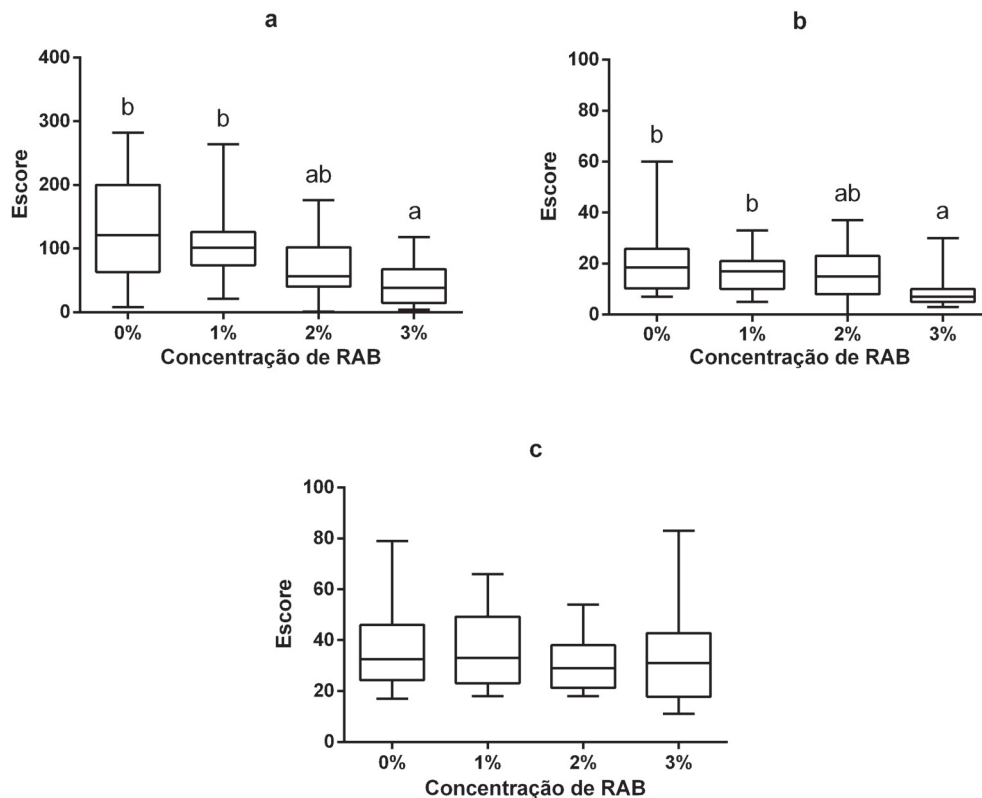
TABELA 2: CÉLULAS APOPTÓTICAS AVALIADAS EM TESTE DE DIFUSÃO, EM *Rhamdia quelen* ALIMENTADOS COM RAB NAS CONCENTRAÇÕES DE 0%, 1%, 2% e 3%.

Grupos	Células Apoptóticas	
	Média	Desvio Padrão
RAB 0%	2,067	2,404
RAB 1%**	0,214	0,578
RAB 2%**	0,083	0,288
RAB 3%***	0	0

Ensaio de difusão em eritrócitos de *Rhamdia quelen* alimentados com ração contendo RAB a uma concentração de 0, 1, 2 e 3%. Por peixe, 100 nucleóides foram analisados (n = 15 por grupo), o nível de significância considerado (p <0,05) foi: * * (p <0,01); *** (p <0,001), em relação ao grupo controle (RAB 0%).

Os resultados do ensaio cometa mostraram que o dano ao DNA foi reduzido no grupo 3% de RAB nos eritrócitos (Fig. 3a) e no grupo 3% no fígado (Fig. 3b) quando comparado com o grupo sem RAB (0 %). Quanto ao tecido cerebral (Fig. 3c), não houve alterações em nenhuma das concentrações testadas.

FIGURA 3: *Rhamdia quelen* ALIMENTADO COM RAÇÃO CONTENDO RAB NAS CONCENTRAÇÕES DE 0%, 1%, 2% E 3% DURANTE 60 DIAS (n = 15 POR GRUPO). ANÁLISE DO ENSAIO COMETA EM SANGUE (a), FÍGADO (b) E CÉREBRO (c), FORAM ANALISADOS 100 NUCLEÓIDES POR PEIXE. LETRAS DIFERENTES REPRESENTAM A DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS ($p < 0,05$). GRÁFICOS COM MEDIANA E QUARTIS.



Comparando as AMN totais e as alterações mais frequentes encontradas na espécie (*notched* e *vacuolated*), não houve diferença entre os grupos (TABELA 3).

TABELA 3: TESTE DO MICRONUCLO PÍSCEO E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES TOTAIS E ALTERAÇÕES COM MAIOR FREQUÊNCIA.

Grupos	Total de Alterações Nucleares		<i>Notched</i>		<i>Vacuolated</i>	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
RAB 0%	10,86	± 5,89	2,00	± 1,61	9,66	± 6,30
RAB 1%	16,80	± 13,17	4,53	± 5,16	11,80	± 9,68
RAB 2%	16,57	± 14,04	4,64	± 7,04	11,50	± 8,43
RAB 3%	14,13	± 10,49	2,93	± 3,32	9,21	± 4,79

Dados mostram os diferentes tratamentos com RAB administrados à espécie *Rhamdia quelen* nas concentrações de 0, 1, 2 e 3%, resultados em média e desvio padrão. Foram analisadas 2.000 células por animal (n=15 por grupo) e significância foi considerado ($p < 0,05$).

3.3.4 Discussão

Ao contrário das plantas superiores, o gênero de microalgas *Acutodesmus* pode produzir carotenoides sob estresse, mesmo que o estresse limite a produção de clorofila (ROWAN, 1989; BISHOP et al. 1995). *A. obliquus* foi isolada de um sistema de filtração de aquicultura por Guedes et al. (2011) e observaram que normalmente ocorre o crescimento e a produção de moléculas antioxidantes nessa microalga. Os carotenoides produzidos foram o β -caroteno e a luteína, um carotenoide com grande valor e importância para a alimentação humana, sendo o mais abundante (CAMPO, DEL et al. 2007). Além disso, em nosso estudo, tanto os carotenoides como as clorofilas *a* e *b*, foram encontrados nas amostras de RAB produzidas a partir de microalgas de *A. obliquus*.

Os carotenoides são substâncias eficazes na prevenção de danos oxidativos aos tecidos, porque podem absorver a energia dos radicais livres. Os peixes, como os seres humanos, não são capazes de sintetizar carotenoides *de novo* e, embora alguns peixes possam converter um tipo de carotenoides em outro, é importante que este elemento componha a dieta para o seu restabelecimento (GUEDES et al. 2011). Apesar dos efeitos antioxidantes, ainda há poucos estudos sobre o efeito de carotenoides no reparo ao DNA (COLLINS, 2001; KRINSKY; JOHNSON, 2005; AZQUETA; COLLINS, 2012). Outro elemento com propriedades antioxidantes presentes em grandes quantidades nas microalgas é a clorofila (*a* e *b*), que quando

utilizada rotineiramente na alimentação, está associada a benefícios para a saúde, incluindo efeitos antimutagênicos, antígenotóxicos e antioxidantes (ROCA et al. 2016).

Foi observado um aumento na atividade da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro e no músculo, o que pode influenciar na hidrólise da acetilcolina e alterar a ativação dos receptores nicotínicos e muscarínicos (ROMANI et al. 2003; MIRON et al. 2005; CATTANEO et al. 2011). O neurotransmissor acetilcolina (ACh) é essencial para o funcionamento das sinapses do sistema nervoso central (SCHETINGER et al. 1999). A enzima AChE é responsável pela hidrólise da acetilcolina. Nos peixes, AChE é abundante em tecido muscular e cerebral (KAIZER et al. 2009). No entanto, a inibição de AChE é comumente associada como um parâmetro para avaliar uma atividade de anormalidade na transmissão neural, mas esse efeito de ativação enzimática permanece desconhecido (CATTANEO et al. 2011). Contudo, Sayed et al. (2017) observaram um aumento na atividade da AChE conjuntamente com um efeito hepatoprotetor em peixes da espécie *Clarias gariepinus* alimentados com ração suplementada por *Spirulina platensis*.

Avaliando o sistema antioxidante em tecido hepático de *R. quelen*, observamos que a atividade da SOD foi aumentada em animais tratados com 2 e 3% de RAB. A SOD é a enzima que converte o radical superóxido livre (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é uma outra espécie reativa de oxigênio (ROS) menos agressiva (CEMELI et al. 2009). Além disso, a oxidação do DNA é principalmente induzida por ROS, além de ocorrer normalmente no processo metabólico do oxigênio (AZQUETA et al. 2009).

A atividade da SOD combinada com o aumento de ferro livre, poderia acelerar a conversão de O_2^- e H_2O_2 em radicais hidroxila (STOHS, 1995; BERG et al. 2008; LIMA et al. 2011). O H_2O_2 produzido pela atividade de SOD pode ser degradado pela ação da enzima CAT. Esses processos envolvendo as ROS e a geração de radicais livres podem promover o estresse oxidativo e, devido a um desequilíbrio, podem ocorrer danos em macromoléculas como por exemplo a peroxidação lipídica (CEMELI et al. 2009) e/ou danos genotóxicos (VENTURA et al. 2013). No entanto, embora tenha havido um aumento na atividade de SOD, não houve danos em macromoléculas, uma vez que os níveis de LPO e danos ao DNA não foram aumentados em animais alimentados com RAB. A compreensão dos efeitos genotóxicos e as suas respostas precoces é importante em avaliações de toxicologia (OOST et al. 2003; ANDRADE et

al. 2004; BARRETO et al. 2017), e utilizar biomarcadores bioquímicos, ensaio cometa e o MN písceo combinados é importante em pesquisas nesta área (VILLELA et al. 2007; STANKEVIČIŪTĖ et al. 2016). Adicionalmente, os peixes da espécie *R. quelen* alimentados com rações enriquecidas com RAB não apresentaram danos ao DNA. Em vez disso, o número de células apoptóticas em eritrócitos e os danos genéticos nas células hepáticas e sanguíneas foi reduzido nos grupos alimentados com a maior concentração de RAB. A RAB tampouco aumentou as frequências de micronúcleos ou alterações morfológicas não foram alteradas entre os grupos analisados.

Em testes preliminares, Balen et al. (2015) relataram que uma dieta contendo RAB não afeta o crescimento dos alevinos de *R. quelen* sob as mesmas condições de exposição utilizadas neste estudo. Estes resultados corroboram com os obtidos em nosso experimento para os biomarcadores bioquímicos e genéticos, mostrando que à medida que a quantidade de RAB aumentou, os organismos apresentaram um potencial efeito antioxidante, sendo a melhor resposta para os animais alimentados com 3% de RAB na ração.

3.3.5 Conclusão

Os resultados indicam que RAB aumentou a qualidade dos alimentos, pois promoveu uma diminuição do dano do DNA em alevinos de *Rhamdia quelen*. A presença de carotenoides e clorofilas, nesse ingrediente, pode melhorar o estado de saúde dos peixes, deste modo pode ser utilizado como um aditivo alimentar na dieta desses organismos aquáticos, onde a proporção com a melhor resposta é a de 3% de RAB adicionada na formulação da ração.

Agradecimentos

Os autores também agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro e CAPES pelo fornecimento da Bolsa e para todos os que participaram deste trabalho: Laboratório de Tecnologia em Aquicultura; Laboratório de Toxicologia Ambiental; Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) e Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não têm conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-TAWWAB, M.; AHMAD, M. H. Live *Spirulina (Arthrospira platensis)* as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 9, p. 1037–1046, 2009.
- ABDELKHALEK, N. K. M.; EISSA, I. A. M.; AHMED, E.; et al. Protective role of dietary *Spirulina platensis* against diazinon-induced Oxidative damage in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 54, n. June, p. 99–104, 2017.
- ABDELKHALEK, N. K. M.; GHAZY, E. W.; ABDEL-DAIM, M. M. Pharmacodynamic interaction of *Spirulina platensis* and deltamethrin in freshwater fish Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: impact on lipid peroxidation and oxidative stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 4, p. 3023–3031, 2015.
- ABOMOHRRA, A. E.-F.; EL-SHEEKH, M.; HANELT, D. Pilot cultivation of the chlorophyte microalga *Scenedesmus obliquus* as a promising feedstock for biofuel. **Biomass and Bioenergy**, v. 64, p. 237–244, 2014.
- ADAMS, S. M.; GIESY, J. P.; TREMBLAY, L. A.; EASON, C. T. The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology. **Biomarkers**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2001.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–6, 1984.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, n. 9, p. 499–509, 2003.
- AGNIHOTRI, S. K.; AGRAWAL, U.; GHOSH, I. Brain most susceptible to cadmium induced oxidative stress in mice. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 30, p. 184–193, 2015.
- AL-GHAIS, S. M. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 74, n. 1, p. 183–186, 2013.
- DE ANDRADE, V. M.; DE FREITAS, T. R. O.; DA SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation research**, v. 560, n. 1, p. 57–67, 2004.
- APPLER, H. N. Evaluation of Hydrodictyon-Reticulatum as Protein-Source in Feeds for *Oreochromis (Tilapia) niloticus* and *Tilapia zillii*. **Journal of Fish Biology**, v. 27, n. 3, p. 327–334, 1985.
- APPLER, H. N.; JAUNCEY, K. The utilization of a filamentous green alga

(*Cladophora glomerata* (L) Kutzin) as a protein source in pelleted feeds for *Sarotherodon* (Tilapia) *niloticus* fingerlings. **Aquaculture**, v. 30, n. 1–4, p. 21–30, 1983.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. Carotenoids and DNA damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 733, n. 1–2, p. 4–13, 2012. Elsevier B.V.

AZQUETA, A.; LANGIE, S.; COLLINS, A. **30 Years of the Comet Assay: An Overview with Some New Insights**. Frontiers Media SA, 2015.

AZQUETA, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A. R. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1–2, p. 101–108, 2009.

BACOLOD, E. T.; UNO, S.; VILLAMOR, S. S.; KOYAMA, J. Oxidative stress and genotoxicity biomarker responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to environmental concentration of 1-nitropyrene. **Marine Pollution Bulletin**, v. 124, n. 2, p. 786–791, 2017.

BALDISSEROTTO, B.; MARTOS-SITCHA, J. A.; MENEZES, C. C.; et al. The effects of ammonia and water hardness on the hormonal, osmoregulatory and metabolic responses of the freshwater silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 341–352, 2014.

BALEN, R. E.; GERALDO, E.; MARQUES, A. E. M. L.; et al. Effect of defatted microalgae (*Scenedesmus obliquus*) biomass inclusion on growth performance of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 31, p. 98–101, 2015.

BALMANT, W.; STALL, A.; VARGAS, J. V. C.; MARIANO, A. B.; ISHII, A. S. Design, modeling and simulation of microalgae photobioreactors. **20th International Congress of Mechanical Engineering**, p. 15–20, 2009.

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; DE SOUZA, C.; et al. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. **Aquaculture**, v. 237, n. 1–4, p. 229–236, 2004.

BARRETO, A.; LUIS, L. G.; SOARES, A. M. V. M.; et al. Genotoxicity of gemfibrozil in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 821, n. November 2016, p. 36–42, 2017.

BEAL, C. M.; GERBER, L. N.; SILLS, D. L.; et al. Algal biofuel production for fuels and feed in a 100-ha facility: A comprehensive techno-economic analysis and life cycle assessment. **Algal Research**, v. 10, p. 266–279, 2015.

BECKER, A. G.; PARODI, T. V.; GONÇALVES, J. F.; et al. Ectonucleotidase and

acetylcholinesterase activities in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different salinities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 44–49, 2013.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207–210, 2007.

BEGUM, G. In vivo biochemical changes in liver and gill of *Clarias batrachus* during cypermethrin exposure and following cessation of exposure. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 82, n. 3, p. 185–196, 2005.

BELAY, A.; KATO, T.; OTA, Y. Spirulina (*Arthrospira*): potential application as an animal feed supplement. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, n. 4–5, p. 303–311, 1996.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 2, p. 235–241, 1993.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 415, n. 3, p. 167–184, 1998.

BERG, D.; GERLACH, M.; YODIM, M. B. H.; et al. Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, n. 2, p. 225–236, 2008.

BERTIN, G.; AVERBECK, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1549–1559, 2006.

BISHOP, N. I.; URBIG, T.; SENGER, H. Complete separation of the β,ϵ - and β,β -carotenoid biosynthetic pathways by a unique mutation of the lycopene cyclase in the green alga, *Scenedesmus obliquus*. **FEBS Letters**, v. 367, n. 2, p. 158–162, 1995.

BITTNER, E. A.; MARTYN, J. A. J. Neuromuscular Physiology and Pharmacology. **Pharmacology and Physiology for Anesthesia**. 1st ed., p.309–324, 2013.

BOLOGNESI, C.; CIRILLO, S. Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. **Current Zoology**, v. 60, n. 2, p. 273–284, 2014.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D. M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 78 Suppl 1, p. 93-8, 2006.

BOMBARDELLI, R. A.; HAYASHI, C. Masculinization of larvae of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) by immersion baths with a-methyltestosterone. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 365–372, 2005.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; MEURER, F. 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, n. 5, p. 1391–1396, 2001.

CANTAFARO, A.; ARDIZZONE, G.; ENEA, M.; LIGAS, A.; COLLOCA, F. Assessing the importance of nursery areas of European hake (*Merluccius merluccius*) using a body condition index. **Ecological Indicators**, v. 81, n. June, p. 383–389, 2017.

CANTON, R.; WEINGARTNER, M.; FRACALOSSO, D. M.; ZANIBONI FILHO, E. Influência da frequência alimentar no desempenho de juvenis de jundiá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 749–753, 2007.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123–2136, 1990.

CATTANEO, R.; CLASEN, B.; LORO, V. L.; et al. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* exposed to a commercial formulation containing glyphosate. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 87, n. 6, p. 597–602, 2011.

ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 538, n. 1–2, p. 81–91, 2003.

ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, n. 3, p. 264–271, 2005.

CEMELI, E.; BAUMGARTNER, A.; ANDERSON, D. Antioxidants and the Comet assay. **Mutation research**, v. 681, n. 1, p. 51–67, 2009.

CERÓN, M. C.; CAMPOS, I.; SÁNCHEZ, J. F.; et al. Recovery of Lutein from Microalgae Biomass: Development of a Process for *Scenedesmus almeriensis* Biomass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 24, p. 11761–11766, 2008.

CESÁRIO, M. T.; DA FONSECA, M. M. R.; MARQUES, M. M.; DE ALMEIDA, M. C. M. D. Marine algal carbohydrates as carbon sources for the production of biochemicals and biomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 3, p. 798–817, 2018.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; RIBEIRO, C. A. DE O.; et al. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 270–274, 2004.

CHEN, K.; RÍOS, J. J.; PÉREZ-GÁLVEZ, A.; ROCA, M. Comprehensive chlorophyll composition in the main edible seaweeds. **Food Chemistry**, v. 228, p. 625–633, 2017.

CHENG, Z.; MO, W.-Y.; NIE, X.-P.; et al. The use of food waste-based diets and Napier grass to culture grass carp: growth performance and contaminants contained in cultured fish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 8, p. 7204–7210, 2016.

CHIATTONI, L. M.; MACHADO, M. R. G.; RODRIGUES, R. DA S.; SOARES, L. A. DE S. Influência do consumo de diferentes níveis de Spirulina no desenvolvimento e perfil lipídico de ratos. **Revista Ceres**, v. 62, n. 2, p. 142–148, 2015.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

CHRISTAKI, E.; FLOROU-PANERI, P.; BONOS, E. Microalgae: a novel ingredient in nutrition. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 62, n. 8, p. 794–799, 2011.

COLLINS, A. R. Carotenoids and genomic stability. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 475, n. 1–2, p. 21–28, 2001.

COLLINS, A. R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 336, n. 1, p. 69–77, 1995.

CUSTÓDIO, L.; SOARES, F.; PEREIRA, H.; et al. Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp.: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 151–161, 2014.

DAMERGI, E.; SCHWITZGUÉBEL, J. P.; REFARDT, D.; et al. Extraction of carotenoids from *Chlorella vulgaris* using green solvents and syngas production from residual biomass. **Algal Research**, v. 25, n. September 2016, p. 488–495, 2017.

DANTZGER, D. D.; JONSSON, C. M.; AOYAMA, H. Mixtures of diflubenzuron and p-chloroaniline changes the activities of enzymes biomarkers on tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) in the presence and absence of soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 367–376, 2018.

DEL CAMPO, J. A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 6, p. 1163–1174, 2007.

DOS REIS, L. C. R.; DE OLIVEIRA, V. R.; HAGEN, M. E. K.; et al. Carotenoids, flavonoids, chlorophylls, phenolic compounds and antioxidant activity in fresh and cooked broccoli (*Brassica oleracea* var. Avenger) and cauliflower (*Brassica oleracea*

var. Alpha F1). **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 177–183, 2015.

DOS SANTOS MIRON, D.; CRESTANI, M.; ROSA SHETTINGER, M.; et al. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 3, p. 398–403, 2005.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHER-STONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

ENZING, C.; PLOEG, M.; BARBOSA, M.; SIJTSMA, L. **Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe**. 2014.

ESCORSIM, A. M.; DA ROCHA, G.; VARGAS, J. V. C.; et al. Extraction of *Acutodesmus obliquus* lipids using a mixture of ethanol and hexane as solvent. **Biomass and Bioenergy**, v. 108, p. 470–478, 2018.

FADL, S. E.; ELGOHARY, M. S.; ELSADANY, A. Y.; et al. Contribution of microalgae-enriched fodder for the Nile tilapia to growth and resistance to infection with *Aeromonas hydrophila*. **Algal Research**, v. 27, p. 82–88, 2017.

FANUCCHI, M. V. Development of Antioxidant and Xenobiotic Metabolizing Enzyme Systems. **The Lung**. p.223–231, 2014.

FAO. **FAO Yearbook: Fishery and Aquaculture Statistics 2015**. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (FAOSTAT), 2017.

FATIMA, M.; USMANI, N.; MOBARAK HOSSAIN, M.; et al. Assessment of Genotoxic Induction and Deterioration of Fish Quality in Commercial Species Due to Heavy-Metal Exposure in an Urban Reservoir. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, n. 2, p. 203–213, 2014.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. D. O.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 103–107, 2004.

FERRUZZI, M. G.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research**, v. 27, n. 1, p. 1–12, 2007.

FINK, R. C.; SCANDALIOS, J. G. Molecular Evolution and Structure–Function Relationships of the Superoxide Dismutase Gene Families in Angiosperms and Their Relationship to Other Eukaryotic and Prokaryotic Superoxide Dismutases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 399, n. 1, p. 19–36, 2002.

- FRADIQUE, M.; BATISTA, A. P.; NUNES, M. C.; et al. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 10, p. 1656–1664, 2010.
- FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation research**, v. 681, n. 1, p. 80–92, 2009.
- GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; GAO, X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41–45, 1998.
- GARDNER, R.; SALVADOR, A.; MORADAS-FERREIRA, P. Why does SOD overexpression sometimes enhance, sometimes decrease, hydrogen peroxide production? a minimalist explanation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 12, p. 1351–1357, 2002.
- GHELFI, A.; RIBAS, J. L. C.; GUILOSKI, I. C.; et al. Evaluation of Biochemical, Genetic and Hematological Biomarkers in a Commercial Catfish *Rhamdia quelen* Exposed to Diclofenac. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 1, p. 49–54, 2016.
- GHISI, N. D. C.; RAMSDORF, W. A.; FERRARO, M. V. M.; et al. Evaluation of genotoxicity in *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, n. 1–4, p. 589–599, 2011.
- DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E. **The toxicology of fishes**. Boca Raton, FL-USA: CRC Press, 2008.
- GOMES, L. DE C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179–185, 2000.
- GONTIJO, Á. M. DE M. C.; BARRETO, R. E.; SPEIT, G.; et al. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1–2, p. 165–172, 2003.
- GRISOLIA, C. K.; RIVERO, C. L. G.; STARLING, F. L. R. M.; et al. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 1, p. 138–143, 2009.
- GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; PEREIRA, R. D.; MALCATA, F. X. Effects of temperature and pH on growth and antioxidant content of the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 5, p. 1218–1224, 2011.
- GUILOSKI, I. C.; RIBAS, J. L. C.; PIANCINI, L. D. S.; et al. Paracetamol causes endocrine disruption and hepatotoxicity in male fish *Rhamdia quelen* after subchronic

exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 53, p. 111–120, 2017a.

GUILOSKI, I. C.; PIANCINI, S. L. D.; DAGOSTIM, A. C.; et al. Effects of environmentally relevant concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 291–300, 2017b.

GUPTA, P. K. Biotransformation. **Fundamentals of Toxicology**. p.73–85, 2016.

HABIB, M. A. B.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T. C.; HASAN, M. R. **A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish**. Rome: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2008.

HAFEMAN, D. G.; SUNDE, R. A.; HOEKSTRA, W. G. Effect of Dietary Selenium on Erythrocyte and Liver Glutathione Peroxidase in the Rat. **The Journal of Nutrition**, v. 104, n. 5, p. 580–587, 1974.

HALLMANN, A. Algal transgenics and biotechnology. **Transgenic Plant Journal**, v. 1, n. 1, p. 81–98, 2007.

HARABAWY, A. S. A.; MOSLEH, Y. Y. I. The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, n. 1, p. 28–35, 2014.

HARIRI, M.; MIRVAGHEFI, A.; FARAHMAND, H.; TAGHAVI, L.; SHAHABINIA, A.-R. In situ assessment of Karaj River genotoxic impact with the alkaline comet assay and micronucleus test, on feral brown trout (*Salmo trutta fario*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 59–69, 2018.

HE, Q.; YANG, H.; WU, L.; HU, C. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 219–228, 2015.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation research**, v. 18, n. 2, p. 187–90, 1973.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation research**, v. 123, n. 1, p. 61–118, 1983.

HELLER BROWN, J.; LAIKEN, N. Acetylcholine and Muscarinic Receptors. **Primer on the Autonomic Nervous System**. p.75–78, 2012.

HOSSAIN, M. B.; SULTANA, N.; NOOR, P.; et al. Growth performance and fatty acid profile of Nile tilapia. **Dhaka University Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 13–27, 2017.

- HUSSAIN, B.; SULTANA, T.; SULTANA, S.; et al. Fish eco-genotoxicology: Comet and micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ biomarker of freshwater pollution. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 393–398, 2018.
- INGEBRIGTSEN, I. A.; BERGE, G. M.; RUYTER, B.; et al. Growth and quality of Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed with high and low fat diets supplemented with glutamate. **Aquaculture**, v. 433, p. 367–376, 2014.
- JANCIC, S. A.; STOSIC, B. Z. Cadmium Effects on the Thyroid Gland. **Vitamins & Hormones**, v. 94, p. 391–425, 2014.
- JIA, Y.; GAO, Y.; CHEN, X.; HUANG, B. Determination of optimal fasting time before blood sampling to get baseline data on serum biochemical characteristics in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture**, v. 487, n. 106, p. 83–88, 2018.
- JIANG, Z.-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384–389, 1992.
- JUNG, J.-Y.; DAMUSARU, J. H.; PARK, Y.; et al. Autotrophic biofloc technology system (ABFT) using *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* positively affects performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Algal Research**, v. 27, n. September, p. 259–264, 2017.
- KAIZER, R. R.; LORO, V. L.; SCHETINGER, M. R. C.; et al. NTPDase and acetylcholinesterase activities in silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Heptapteridae) exposed to interaction of oxygen and ammonia levels. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 635–640, 2009.
- KAPLOWITZ, N.; DELEVE, L. D. **Drug-induced liver disease**. Academic, 2013.
- KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **The Journal of biological chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–8, 1976.
- KHALIL, S. R.; REDA, R. M.; AWAD, A. Efficacy of *Spirulina platensis* diet supplements on disease resistance and immune-related gene expression in *Cyprinus carpio* L. exposed to herbicide atrazine. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 67, p. 119–128, 2017.
- KIM, K.-W.; BAI, S. C.; KOO, J.-W.; WANG, X.; KIM, S.-K. Effects of Dietary *Chlorella ellipsoidea* Supplementation on Growth, Blood Characteristics, and Whole-Body Composition in Juvenile Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 33, n. 4, p. 425–431, 2002.
- KLINGELFUS, T.; COSTA, P. M. DA; SCHERER, M.; CESTARI, M. M. DNA damage in the kidney tissue cells of the fish *Rhamdia quelen* after trophic contamination with aluminum sulfate. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 499–506, 2015.
- KOCHHANN, D.; PAVANATO, M. A; LLESUY, S. F.; et al. Bioaccumulation and

oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to different thorium concentrations. **Chemosphere**, v. 77, n. 3, p. 384–391, 2009.

KOMOLAFE, O.; VELASQUEZ ORTA, S. B.; MONJE-RAMIREZ, I.; et al. Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 297–304, 2014.

KOPPEN, G.; AZQUETA, A.; POURRUT, B.; et al. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, p. 1–12, 2017.

KREUTZ, L.; BARCELLOS, L. G. Innate immune response of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to atrazine. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, p. 1055–1059, 2012.

KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 6, p. 459–516, 2005.

KRISHNAKUMARI, M. K.; RAMESH, H. P.; VENKATARAMAN, L. V. Food Safety Evaluation: Acute Oral and Dermal Effects of the Algae *Scenedesmus acutus* and *Spirulina platensis* on Albino Rats. **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 12, p. 934–935, 1981.

KUMAR, S.; MAGNUSSON, M.; WARD, L.; PAUL, N.; BROWN, L. A Green Algae Mixture of *Scenedesmus* and *Schroederiella attenuates* Obesity-Linked Metabolic Syndrome in Rats. **Nutrients**, v. 7, n. 12, p. 2771–2787, 2015.

LAZO, J. P.; DINIS, M. T.; HOLT, G. J.; FAULK, C.; ARNOLD, C. R. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture**, v. 188, n. 3–4, p. 339–351, 2000.

LIMA, P. L.; BENASSI, J. C.; PEDROSA, R. C.; et al. Time-course variations of DNA damage and biomarkers of oxidative stress in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to effluents from a swine industry. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 50, n. 1, p. 23–30, 2006.

LIMA, P.; VASCONCELLOS, M.; MONTENEGRO, R.; et al. Genotoxic effects of aluminum, iron and manganese in human cells and experimental systems: A review of the literature. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 10, p. 1435–1444, 2011.

LIVINGSTONE, D. R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 120, n. 1, p. 43–9, 1998.

LLORET, J.; PLANES, S. Condition, feeding and reproductive potential of white seabream *Diplodus sargus* as indicators of habitat quality and the effect of reserve

protection in the northwestern Mediterranean. **Marine Ecology Progress Series**, v. 248, n. Benaka 1999, p. 197–208, 2003.

LORDAN, S.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Diseases. **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p. 1056–1100, 2011.

ŁUCZYŃSKA, J.; PASZCZYK, B.; ŁUCZYŃSKI, M. J. Fish as a bioindicator of heavy metals pollution in aquatic ecosystem of Pluszne Lake, Poland, and risk assessment for consumer's health. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 153, n. January, p. 60–67, 2018.

MARKERT, B. From biomonitoring to integrated observation of the environment - The multi-markered bioindication concept. **Ecological Chemistry and Engineering. S**, v. 15, n. 3, p. 315–333, 2008.

MCANDREW, B. J.; PENMAN, D. J.; BEKAERT, M.; WEHNER, S. Tilapia genomic studies. **Genomics in Aquaculture**. p.105–129, 2016.

METTING, F. B. Biodiversity and application of microalgae. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 17, n. 5–6, p. 477–489, 1996.

MEURER, F.; FRANZEN, A.; PIOVESAN, P.; ROSSATO, K. A.; SANTOS, L. D. DOS. Apparent energy digestibility of glycerol from biodiesel production for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758). **Aquaculture Research**, v. 43, n. 11, p. 1734–1737, 2012.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; SOARES, C. M. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 566–573, 2002.

MICHELATO, M.; FURUYA, W. M.; GATLIN, D. M. Metabolic responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to methionine and taurine supplementation. **Aquaculture**, v. 485, p. 66–72, 2018.

MO, W. Y.; MAN, Y. B.; WONG, M. H. Use of food waste, fish waste and food processing waste for China's aquaculture industry: Needs and challenge. **Science of the Total Environment**, v. 613–614, p. 635–643, 2018.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Functional foods and nutraceuticals: definition, legislation and health benefits. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109–122, 2006.

MURDOCK, J. N.; WETZEL, D. L. FT-IR Microspectroscopy Enhances Biological and Ecological Analysis of Algae. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 4, p. 335–361, 2009.

MUSTAFA, M. G. G.; NAKAGAWA, H. A review: Dietary benefits of algae as an additive in fish feed. **Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**, v. 47, n. 3–4, p.

155–162, 1995.

NORAMBUENA, F.; HERMON, K.; SKRZYPCZYK, V.; et al. Algae in Fish Feed: Performances and Fatty Acid Metabolism in Juvenile Atlantic Salmon. (D. W. Pond, Org.) **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0124042, 2015.

OMAR, W. A.; ZAGHLOUL, K. H.; ABDEL-KHALEK, A. A.; ABO-HEGAB, S. Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 746, n. 1, p. 7–14, 2012. Elsevier B.V.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

OSS, R. N.; BARONI, V. D.; DUARTE, R. M.; et al. Recovery of fat snook, *Centropomus parallelus* (Teleostei: Perciformes) after subchronic exposure to copper. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 157, n. 3, p. 306–309, 2013.

PABST, W.; PAYER, H. D.; ROLLE, I.; SOEDER, C. J. Multigeneration feeding studies in mice for safety evaluation of the microalga, *Scenedesmus acutus*. I. Biological and haematological data. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 16, n. 3, p. 249–254, 1976.

PAMPLONA, J. H.; OBA, E. T.; DA SILVA, T. A.; et al. Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 3, p. 342–9, 2011.

PANDRANGI, R.; PETRAS, M.; RALPH, S.; VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 26, n. 4, p. 345–56, 1995.

PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 35–42, 2011.

PATNAIK, R.; MALLICK, N. Utilization of *Scenedesmus obliquus* biomass as feedstock for biodiesel and other industrially important co-products: An integrated paradigm for microalgal biorefinery. **Algal Research**, v. 12, p. 328–336, 2015.

PEREIRA, C. R.; BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; et al. Embryonic and larval development of Jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American Catfish. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 4, p. 1057–1063, 2006.

PEREIRA, L. S.; RIBAS, J. L. C.; VICARI, T.; et al. Effects of ecologically relevant concentrations of cadmium in a freshwater fish. **Ecotoxicology and Environmental**

Safety, v. 130, p. 29–36, 2016.

PIANCINI, L. D. S.; SANTOS, G. S.; TINCANI, F. H.; CESTARI, M. . Piscine micronucleus test and the comet assay reveal genotoxic effects of Atrazine herbicide in the neotropical fish *Rhamdia quelen*. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 10, n. 1, p. 55–60, 2015.

PLAZA, M.; HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7159–7170, 2009.

PORTER, C. M.; JANZ, D. M. Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 2, p. 199–206, 2003.

PRETTO, A.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M.; et al. Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n. 4, p. 1008–1014, 2010.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609–1612, 2008.

RAMSDORF, W. A.; GUIMARÃES, F. DE S. F.; FERRARO, M. V. M.; et al. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, n. 1, p. 78–81, 2009.

RAMSDORF, W. A.; VICARI, T.; DE ALMEIDA, M. I. M.; ARTONI, R. F.; CESTARI, M. M. Handling of *Astyanax sp.* for biomonitoring in Cangüiri Farm within a fountainhead (Iraí River Environment Preservation Area) through the use of genetic biomarkers. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 10, p. 5841–5849, 2012.

RAO, A.; RAO, L. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 3, p. 207–216, 2007.

RASALA, B. A.; MAYFIELD, S. P. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. **Photosynthesis Research**, v. 123, n. 3, p. 227–239, 2015.

RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of microalgal culture**. Second Edi ed. Wiley Blackwell, 2013.

ROCA, M.; CHEN, K.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Chlorophylls. **Handbook on Natural**

Pigments in Food and Beverages. p.125–158, 2016.

ROMANI, R.; ANTOGNELLI, C.; BALDRACCHINI, F.; et al. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. **Chemico-Biological Interactions**, v. 145, n. 3, p. 321–329, 2003.

ROWAN, K. S. **Photosynthetic pigments of algae**. Cambridge University Press, 1989.

SACCOL, E. M. H.; JEREZ-CEPA, I.; OURIQUE, G. M.; et al. *Myrcia sylvatica* essential oil mitigates molecular, biochemical and physiological alterations in *Rhamdia quelen* under different stress events associated to transport. **Research in Veterinary Science**, v. 117, p. 150–160, 2018.

SALHI, M.; BESSONART, M. Growth, survival and fatty acid composition of *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824) larvae fed on artificial diet alone or in combination with *Artemia nauplii*. **Aquaculture Research**, v. 44, n. 1, p. 41–49, 2012.

SÁNCHEZ, J. F.; FERNÁNDEZ, J. M.; ACIÉN, F. G.; et al. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 398–405, 2008.

SANTANA, M. S.; YAMAMOTO, F. Y.; SANDRINI-NETO, L.; et al. Diffuse sources of contamination in freshwater fish: Detecting effects through active biomonitoring and multi-biomarker approaches. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, p. 173–181, 2018.

SATYANARAYANA, K. G.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **International Journal of Energy Research**, v. 35, n. 4, p. 291–311, 2011.

SAYED, A. E. D. H.; EL-SAYED, Y. S.; EL-FAR, A. H. Hepatoprotective efficacy of *Spirulina platensis* against lead-induced oxidative stress and genotoxicity in catfish; *Clarias gariepinus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 143, p. 344–350, 2017.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995–1014, 2005.

SCHETINGER, M. R.; BONAN, C. D.; MORSCH, V. M.; et al. Effects of aluminum sulfate on delta-aminolevulinatase from kidney, brain, and liver of adult mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 6, p. 761–6, 1999.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation research**, v. 31, n. 1, p. 9–15, 1975.

- SHI, X.; CHEN, F.; CHEN, G.-H.; et al. Fishmeal can be totally replaced by a mixture of rapeseed meal and *Chlorella* meal in diets for crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). **Aquaculture Research**, v. 48, n. 11, p. 5481–5489, 2017.
- SHIAU, S. Y.; LIANG, H. S. Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*, are affected by chromic oxide inclusion in the diet. **The Journal of nutrition**, v. 125, n. 4, p. 976–82, 1995.
- SILVA DE ASSIS, H. C. **Der Einsatz Von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerverschmutzungen**, 1998. Alemanha. Universidade Técnica de Berlim.
- SILVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae).**, 1996. Stockholm University.
- SINGH, N. P. A Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells. **Experimental Cell Research**, v. 256, n. 1, p. 328–337, 2000.
- SISSINE, F. Energy Independence and Security Act of 2007 : A Summary of Major Provisions Resources, Science, and Industry Division. **Energy**, p. 27, 2007.
- SKAPER, S. D. Impact of Inflammation on the Blood–Neural Barrier and Blood–Nerve Interface: From Review to Therapeutic Preview. **International Review of Neurobiology**. v. 137, p.29–45, 2017.
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test): A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. **DNA Repair Protocols**. v. 113, p.203–212, 1999.
- SQUIRE, L. R. **Encyclopedia of neuroscience**. Elsevier, 2009.
- STANKEVIČIŪTĖ, M.; BUTRIMAVIČIENĖ, L.; VALSKIENĖ, R.; et al. Analysis of nuclear abnormalities in erythrocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with Cu and Zn and after 4-, 8-, and 12-day depuration (post-treatment recovery). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 797, p. 26–35, 2016.
- STOHS, S. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 321–336, 1995.
- STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463–466, 2010.
- TABET, F.; TOUYZ, R. M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress, and Vascular Biology in Hypertension. **Comprehensive Hypertension**. p.337–347, 2007.
- TOUATI, D. Molecular genetics of superoxide dismutases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 5, n. 5–6, p. 393–402, 1988.

TSUDA, J. R.; DE MORAES, V. P. O.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A. L. Occurrence of natural triploidy in *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). **Genetics and molecular research : GMR**, v. 9, n. 3, p. 1929–35, 2010.

UDROIU, I. The micronucleus test in piscine erythrocytes. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 79, n. 2, p. 201–204, 2006.

VALBONA, A.; MIHALLAQ, Q.; ELDORES, S.; VALON, M.; CATERINA, F. Antioxidant defense system, immune response and erythron profile modulation in gold fish, *Carassius auratus*, after acute manganese treatment. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 76, p. 101–109, 2018.

VARGAS, J. V. C.; MARIANO, A. B.; CORRÊA, D. O.; ORDONEZ, J. C. The microalgae derived hydrogen process in compact photobioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 18, p. 9588–9598, 2014.

VENTURA, L.; GIOVANNINI, A.; SAVIO, M.; et al. Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. **Chemosphere**, v. 92, n. 1, p. 1–9, 2013.

VILLELA, I. V.; DE OLIVEIRA, I. M.; SILVEIRA, J. C.; et al. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 628, n. 2, p. 76–86, 2007.

WALSH, M. J.; GERBER VAN DOREN, L.; SHETE, N.; PRAKASH, A.; SALIM, U. Financial tradeoffs of energy and food uses of algal biomass under stochastic conditions. **Applied Energy**, v. 210, p. 591–603, 2018.

WANG, L.; WANG, J. G.; LITTLEWOOD, J.; CHENG, H. B. Co-production of biorefinery products from kraft paper sludge and agricultural residues: opportunities and challenges. **Green Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 1527, 2014.

WANG, P.; LI, Z.; BAI, J.; LANG, Y.; HU, H. Optimization of microalgal bead preparation with *Scenedesmus obliquus* for both nutrient removal and lipid production. **Ecological Engineering**, v. 92, p. 236–242, 2016.

WATSON, R. R. **Handbook of Fertility**. Elsevier, 2015.

WATT, F. E. Osteoarthritis biomarkers: year in review. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 26, n. 3, p. 312–318, 2018.

WHO, W. H. O. Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation. **World Health Organization International Programme on Chemical Safety**, p. 158, 2001.

WONG, M. H.; MO, W. Y.; CHOI, W. M.; CHENG, Z.; MAN, Y. B. Recycle food wastes into high quality fish feeds for safe and quality fish production. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 631–638, 2016.

WU, S. M.; JONG, K. J.; KUO, S. Y. Effects of Copper Sulfate on Ion Balance and Growth in Tilapia Larvae (*Oreochromis mossambicus*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 45, n. 3, p. 357–363, 2003.

XU, W.; GAO, Z.; QI, Z.; et al. Effect of Dietary *Chlorella* on the Growth Performance and Physiological Parameters of Gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 14, n. 1, p. 713–726, 2014.

YAMAGUCHI, K. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, n. 6, p. 487–502, 1996.

YAMAMOTO, F. Y.; PEREIRA, M. V. M.; LOTTERMANN, E.; et al. Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçú River (Southern Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 18, p. 18111–18128, 2016.

YANG, X.; BAUMANN, P. Biliary PAH metabolites and the hepatosomatic index of brown bullheads from Lake Erie tributaries. **Ecological Indicators**, v. 6, n. 3, p. 567–574, 2006.

ZEPPENFELD, C. C.; TONI, C.; BECKER, A. G.; et al. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. **Aquaculture**, v. 418–419, p. 101–107, 2014.

ZHANG, Q.; QIU, M.; XU, W.; et al. Effects of Dietary Administration of *Chlorella* on the Immune Status of Gibel Carp, *Carassius auratus gibelio*. **Italian Journal of Animal Science**, v. 13, n. 3, p. 3168, 2014.

APÊNDICE 1 - CERTIFICAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (CEUA)



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1139

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.006309/2018-72

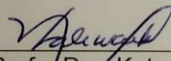
APROVADO/APPROVAL: 27/02/2018 – R.O. 01/2018

TÍTULO: Avaliação da toxicidade de rações produzidas com microalgas pós extração lipídica utilizando as espécies *Rhamdia quelen* e *Oreochromis niloticus*.

TITLE: Evaluation of feed toxicity produced with post lipid extraction using microalgae in fish species *Rhamdia quelen* and *Oreochromis niloticus*.

AUTORES/AUTHORS: Marta Margarete Cestari, Antonio Ernesto Meister Luz Marques, Rafael Ernesto Balen.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Genética


Profª Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA