

***Pelvetia canaliculata* como suplemento de ração para
dourada (*Sparus aurata*): uma abordagem de
biorrefinaria para valorização da biomassa de algas**

Sara Nunes Forte

[2022]

***Pelvetia canaliculata* como suplemento de ração para
dourada (*Sparus aurata*): uma abordagem de
biorrefinaria para valorização da biomassa de algas**

Sara Nunes Forte

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Especialista Teresa Baptista e
coorientação das Doutoradas Carla Tecelão e Marta Neves

[2022]

Título: *Pelvetia canaliculata* como suplemento de ração para dourada (*Sparus aurata*):
uma abordagem de biorrefinaria para valorização da biomassa de algas

Copyright © Sara Nunes Forte

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2022

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

Página deixada intencionalmente em branco

Abstract

The continuous development of the aquaculture sector has brought several concerns, one of which is the environmental impacts it causes, as aquafeeds are made from ingredients of marine origin, such as protein and fish oil. Seaweed has been the subject of studies due to its bioactive compounds with various activities such as antioxidant, with the purpose of making aquaculture sustainable and economically viable. This study aimed to evaluate the effect of incorporating algae powder (1%, 5% and 10%) and algae waste, obtained after sunflower oil supplementation (1% and 10%) in aquafeeds for gilthead seabream (*Sparus aurata*), and the effects this incorporation had on growth performance, hematological profile, immunological parameters, metabolic, oxidative stress and muscle nutritional profile.

Supplementation improved growth parameters, especially in fish fed with Waste 1%, not having greatly affected the hematological profile. Regarding oxidative stress, the sea bream fed with the Pel 5% and 10% diets showed better results, especially in the activities of the enzymes catalase and superoxide dismutase. In the analyses of lipid peroxidation, glutathione-s-transferase and total glutathione there were no differences caused by the various diets studied. Muscle samples from fish fed with 5% Pel diet showed the lowest lipid content, higher amount of protein and higher percentage of PUFA, characteristics particularly appreciated by consumers. The results obtained indicate that the supplementation of diets with freeze-dried *P. canaliculata*, or its residue, obtained after incorporation into sunflower oil, is suitable for the feeding of juvenile sea bream in aquaculture.

Keywords: Aquaculture; Aquafeed; Circular economy; Oxidative stress; Immune response; *Pelvetia canaliculata*.

Resumo

O contínuo aumento do setor da aquacultura tem trazido várias preocupações, sendo uma delas os impactos ambientais que provoca, visto que as rações são fabricadas à base de ingredientes de origem marinha, tais como a proteína e o óleo de peixe. As algas marinhas têm sido alvo de estudos, devido aos seus compostos bioativos com diversas atividades como antioxidante, com o propósito de tornar as aquaculturas sustentáveis e economicamente viáveis. Este estudo teve como objetivo avaliar a incorporação da alga *P. canaliculata* em pó (1%, 5% e 10%) e resíduo da mesma alga (1% e 10%), obtidos após a sua suplementação em óleo de girassol, em rações para aquacultura de dourada (*Sparus aurata*), e os efeitos que esta incorporação teve no desempenho de crescimento, perfil hematológico, parâmetros imunológicos, metabólicos, *stress* oxidativo e perfil nutricional do músculo.

A suplementação das rações melhorou os parâmetros de crescimento, especialmente nos peixes alimentados com a dieta Resíduo 1%, não tendo afetado significativamente o perfil hematológico. No que respeita ao *stress* oxidativo, as douradas alimentadas com as dietas Pel 5% e 10% apresentaram melhores resultados, nomeadamente, nas atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase. Nas análises da peroxidação lipídica, glutathione-s-transferase e glutathione total não se registaram diferenças provocadas pelas várias dietas estudadas. As amostras de músculo de peixes alimentados com a ração Pel 5% apresentaram o menor teor de lípidos, quantidade superior de proteína e maior percentagem de PUFA, características particularmente apreciadas pelos consumidores. Os resultados obtidos indicam que a suplementação de rações com *P. canaliculata* liofilizada ou com o seu resíduo, obtido após incorporação em óleo de girassol, é adequada para a alimentação de juvenis de douradas em aquacultura.

Palavras-chave: Aquacultura; Ração para aquacultura; Economia circular; *Stress* oxidativo; Resposta imune; *Pelvetia canaliculata*.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 O Setor da Aquacultura	1
1.2 Produção de Dourada (<i>Sparus aurata</i>) em Aquacultura.....	2
1.3 A Sustentabilidade da Aquacultura	4
1.4 Utilização Sustentável de Macroalgas em Rações para Aquacultura.....	6
1.5 Enquadramento e Objetivos	8
2. Materiais e métodos.....	9
2.1 Declaração de ética	9
2.2 Recolha da alga e processamento.....	9
2.3 Dietas experimentais	10
2.4 Desenho experimental.....	11
2.5 Performance do crescimento	13
2.6 Parâmetros analíticos	14
2.6.1 Parâmetros hematológicos	14
2.6.2 Parâmetro imunológico.....	15
2.6.3 Parâmetros de <i>stress</i> oxidativo.....	15
2.6.4 Parâmetros metabólicos	19
2.6.5 Perfil nutricional do músculo	20
2.7 Análise estatística.....	26
3. Resultados.....	26
3.1 Performance de crescimento	26
3.2 Parâmetros hematológicos	28
3.3 Parâmetro imunológico.....	29
3.4 Parâmetros de <i>stress</i> oxidativo.....	30
3.5 Parâmetros metabólicos	32
3.6 Perfil nutricional do músculo	33
4. Discussão	38

5. Conclusão e perspectivas futuras.....	49
6. Referências	50

Lista de abreviaturas

Σn3: Somatório de ácidos gordos ómega-3

AG: Ácidos gordos

MUFA: *Monounsaturated fatty acids* (Ácidos gordos monoinsaturados)

PUFA: *Polyunsaturated fatty acids* (Ácidos gordos polinsaturados)

SFA: *Saturated fatty acids* (Ácidos gordos saturados)

IA: Índice aterogénico

ALT: Alaninaminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

BHA: 2,3-terc-butil-4-hidroxianisol

BHT: 2,6-Di-terc-butyl-4-methylphenol (2,6-Di-terc-butil-4-metilfenol)

BSA: Albumina do soro bovino

C14:0: Ácido mirístico

C15:0: Ácido pentadecanoico

C16:0: Ácido palmítico

C16:1 n-7: Ácido palmitoleico

C17:0: Ácido heptadecanoico

C18:0: Ácido esteárico

C18:1 n-11: Ácido 7-octadecenoico

C18:1 n-7: Ácido vacénico

C18:1 n-9: Ácido oleico

C18:2 n-6: Ácido linoleico

C18:3 n-3 (ALA): Ácido α-linolénico

C18:3 n-6: Ácido γ-linolénico

C18:4 n-3: Ácido estearidónico

C20:1 n-9: Ácido 11-eicosenóico

C20:1 n-11: Ácido gadoléico

C20:2 n-6: Ácido 11,14- eicosadienóico

C20:3 n-6: Ácido 8,11,14-eicosatrienóico

C20:4 n-6: Ácido araquidónico

C20:5 n-3 (EPA): Ácido eicosapentaenóico

C21:0: Ácido heneicosanóico

C22:5 n-3: Ácido docosapentaenóico

C22:6 n-3 (DHA): Ácido docosa-hexaenóico

C24:1 n-9: Ácido nervónico

CAT: Catalase

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CH₃OH: Metanol

CTRL: Controlo

DGI: Daily growth index (Índice de crescimento diário)

DP: Desvio- padrão amostral

DTNB: Ácido 2-nitrobenzóico

DTPA: Ácido dietilenotriaminopentacético

EC: Economia circular

EMAG: Ésteres metílicos de ácidos gordos

EPPO: Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

EUA: Estados Unidos da América

ε: Coeficiente de extinção molar

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FCR: *Food conversion ratio* (Taxa de conversão alimentar)

FELASA: *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (Federação das Associações Europeias de Ciência Animal Laboratorial)

GC: *Gas Chromatography* (Cromatografia Gasosa)

GR: Glutathione redutase

GSH: L-glutathione reduzida

GST: Glutathione-S-transferase

h/H: Razão de ácidos gordos hipocolesterolémicos/ ácidos gordos hipercolesterolémicos

H₂O₂: Peróxido de hidrogénio

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

Hb: Hemoglobina

HCl: Ácido clorídrico

Ht: Hematócrito

IMTA: *Integrated Multi Trophic Aquaculture* (Aquacultura multitrófica integrada)

INE: Instituto nacional de estatística

IT: Índice trombogénico

K₂PO₄: Fosfato monopotássico

LPO: *Lipid peroxidation* (Peroxidação lipídica)

MCH: *Mean corpuscular haemoglobin* (Hemoglobina corpuscular média)

MCHC: *Mean corpuscular haemoglobin concentration* (Concentração da hemoglobina corpuscular média)

MCV: *Mean corpuscular volume* (Volume corpuscular médio)

MDA: Malonaldeído

miliQ: Água ultrapura

n-3: Ómega-3

n-6: Ómega-6

Na₂HPO₄: Hidrogenofosfato de sódio

Na₂SO₄: Sulfato de sódio

NaCl: Cloreto de sódio

NaDPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NaOH: Hidróxido de sódio

PBS: Tampão fosfato-salino

Pel 1%: Pelvetia a 1%

Pel 10%: Pelvetia a 10%

Pel 5%: Pelvetia a 5%

PS: Peso seco (%)

RBC: *Red blood cells* (Glóbulos vermelhos)

ROS: *Reactive oxygen species* (Espécies de oxigênio reativas)

rpm: Rotações por minuto

SGR: *Specific growth rate* (Taxa de crescimento específica)

SOD: *Superoxide dismutase* (Superóxido dismutase)

t: tempo

TBA: *Thiobarbituric acid* (Ácido tiobarbitúrico)

TBARS: *Thiobarbituric acid reactive substances* (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

TBHQ: *Tert-butyl-hydroquinone* (Tert-butil-hidroquinona)

TG: *Total glutathione* (Glutathione total)

TMB: 3'3, 5'5 – *tetramethylbenzidine hydrochloride* (3'3, 5'5 - cloridrato de tetrametrametilbenzidina)

Tris- HCl: *Trizma hydrochloride* (Cloridrato de Trizma)

UE: União Europeia

VFI: *Voluntary feeding index* (Índice de consumo voluntário)

WBC: *White blood cells* (Glóbulos brancos)

Wf: *Final Weight* (Peso final)

WG: *Weight Gain* (Ganho de peso)

Wi: *Initial weight* (Peso inicial)

Página deixada intencionalmente em branco

Índice de figuras

Figura 1: Comparação da produção aquícola nacional, entre 2019 e 2020. INE (2022)	2
Figura 2: Economia circular. https://wesea.es/pt/economia-circular-pt/	6
Figura 3: Esquema representativo dos tanques referentes a cada tratamento.....	11
Figura 4: Recolha de amostras de fígado para análise dos parâmetros de stress oxidativo.	16
Figura 5: Adição de 1 mL de TBA a todas as amostras.	17
Figura 6: Amostra de músculo liofilizado.....	22
Figura 7: Equipamentos e material utilizados para determinação da proteína: a) tubos Kjeldahl, b) destilador Foss Kjeltex 2100 e c) material para titulação.....	26
Figura 8: Atividade da peroxidase em douradas alimentadas com dietas diferentes por 44 dias (média ± DP, n=9). CTRL – controlo de alimentação; Pel 1% - 1% pó de algas; Pel 5% - 5% pó de algas, Pel 10% - 10% pó de algas; Resíduo 1% - 1% alga residual; Resíduo 10% - 10% alga residual. Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).....	29
Figura 9: Parâmetros de stress oxidativo em douradas alimentadas com dietas diferentes por 44 dias (média ± DP, n=9). A - SOD (superóxido dismutase); B – CAT (catalase); C – LPO (- peroxidação lipídica); D – GST (glutathione-S-transferase) e E – Tg (glutathione total). CTRL – controlo de alimentação; Pel 1% - 1% pó de algas; Pel 5% - 5% pó de algas, Pel 10% - 10% pó de algas; Resíduo 1% - 1% alga residual; Resíduo 10% - 10% alga residual. Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).....	31

Página deixada intencionalmente em branco

Índice de tabelas

Tabela 1: Composição nutricional das dietas experimentais (média \pm DP).....	10
Tabela 2: Composição proximal da alga liofilizada e do resíduo de <i>P. canaliculata</i> (média \pm DP).	10
Tabela 3: Descrição do peso dos indivíduos e dos diferentes parâmetros de qualidade da água, para cada tratamento (média \pm DP, n=9).	12
Tabela 4: Parâmetros de crescimento das douradas alimentadas com diferentes dietas, durante 44 dias (média \pm DP, n=9). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas identificadas ($p > 0,05$).....	27
Tabela 5: Resultados hematológicos de douradas alimentadas com diferentes dietas, durante 44 dias (média \pm DP, n=9). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).	28
Tabela 6: Resultados metabólicos de douradas alimentadas com diferentes dietas, durante 44 dias (média \pm DP, n=9). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).....	32
Tabela 7: Resultados do perfil nutricional do músculo de douradas alimentadas com diferentes dietas, durante 44 dias (média \pm DP, n=6). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).....	34
Tabela 8: Ácidos gordos presentes nas douradas alimentadas com diferentes dietas, durante 44 dias (média \pm DP, n=6). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).....	35
Tabela 9: Ácidos gordos presentes nas douradas alimentadas com diferentes dietas, durante 44 dias (média \pm DP, n=6). Diferenças estatisticamente	

significativas identificadas com letras diferentes (p < 0,05).....37

1. Introdução

1.1 O Setor da Aquacultura

Segundo o Regulamento (UE) nº. 1380/2013 do Parlamento Europeu e do Conselho, a aquacultura é definida pela criação ou cultura de organismos aquáticos que utiliza técnicas concebidas para aumentar, para além das capacidades naturais do meio, a produção desses organismos, pertencentes a uma pessoa singular ou coletiva durante as fases de criação, de cultura e de colheita.

O aumento da população humana e, conseqüente, procura de alimento, provocaram a intensificação das práticas de aquacultura. O consumo global de alimentos provenientes de atividades aquícolas aumentou a uma taxa média anual de 3%, de 1961 a 2019, sendo que em 1961 o consumo *per capita* correspondeu a 9 kg e em 2019 a 20,5 kg (FAO, 2022). No entanto, os dados disponíveis para 2020, indicam que houve um ligeiro declínio (20,2 kg), tendo a aquacultura correspondido a 56% da produção de alimentos para consumo humano. O crescimento desta atividade ultrapassou todo o consumo de carne (Kusumowardani & Tjahjono, 2020).

A produção total da aquacultura, avaliada em mais de 419 mil milhões de euros, integra vários grupos de diferentes espécies de seres vivos (FAO, 2022). Em 2020, os peixes representaram o maior grupo de produção de espécies (57,5 milhões de toneladas ou 46,9% da produção total), seguidos das algas (36 milhões de toneladas ou 29,4% do total), moluscos (17,7 milhões de toneladas ou 29,4% do total) e crustáceos (11,2 milhões de toneladas 9,2% total) (FAO, 2022).

De acordo com a FAO (2022), em 2020 a Ásia foi responsável por 70% da produção total da aquacultura, tendo a China representado um valor de 57,7%, seguida pela América (12% total), pela Europa (10%), pela África (7%) e Oceânia (1%), sendo que, comparativamente a 2019, foi observada uma diminuição de 3% para os países africanos e de 5% para os países da Oceânia, provavelmente como resultado da COVID-19. Ainda em 2020, a China continuou a ser o maior produtor (35% do total da produção), seguida pela Índia (8%), Indonésia (7%), Vietname (5%) e Perú (3%) (FAO 2022).

De acordo com o INE (2022), a produção aquícola nacional foi de 16.999 toneladas, em 2020, representando um aumento de 18,6%, face a 2019, sendo que as vendas geraram uma receita de 99,9 milhões de euros (Figura 1). Porém, em 2019, a receita foi de 118,5 milhões de euros, ou seja, 2020 apresentou um decréscimo de 15,6%, embora as quantidades vendidas tenham registado um aumento de 6%.

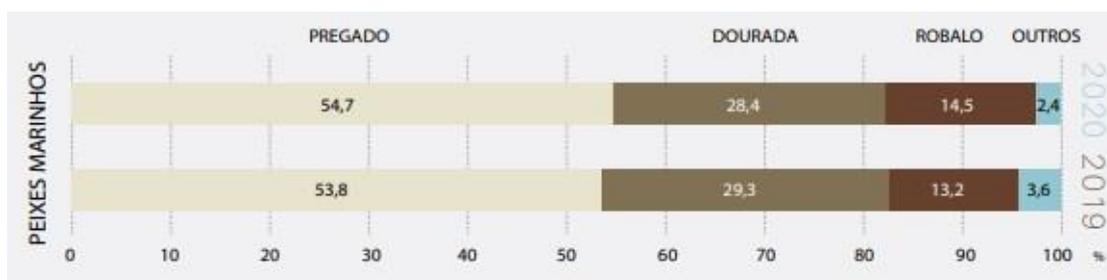


Figura 1: Comparação da produção aquícola nacional, entre 2019 e 2020. INE (2022)

A aquacultura apresenta muitas vantagens/ benefícios, tais como a criação de emprego, redução dos preços dos alimentos, a preservação da biodiversidade, através do repovoamento e recuperação de espécies protegidas, a diminuição da pressão exercida nos recursos pesqueiros, a melhoria de *habitats*, o desenvolvimento da tecnologia e, também, o aumento da consciência ambiental (Frankic & Hershner, 2003).

1.2 Produção de Dourada (*Sparus aurata*) em Aquacultura

O peixe é um dos alimentos mais nutritivos (Erkan & Özden, 2007). Contém proteínas de alta qualidade, aminoácidos essenciais, altos níveis de vitaminas lipossolúveis (A e D) e macro e micro minerais essenciais (iodo, magnésio, fósforo e selénio) (Pateiro *et al.*, 2020), sendo que a composição dos nutrientes depende da espécie, idade, sexo, saúde, estado nutricional e época do ano (Al Khawli *et al.*, 2019). Apresenta um teor de proteína entre 15% a 30%, até 25% de lípidos e 50% a 80% de teor de água. Dependendo da percentagem de gordura, existem peixes magros, como o bacalhau e a pescada, com 20% de proteína, 80% de água e níveis de lípidos bastante baixos (0,5%-3%); peixes gordos, como a cavala e o salmão, com o mesmo teor de proteína

que os peixes magros, mas apresentam um teor de gordura superior (10% –18%) e, portanto, menor teor de água (62% –70%), e a dourada, robalo e truta que são classificados como peixes semi-gordos (Pateiro *et al.*, 2020).

A dourada, *Sparus aurata*, destaca-se pelo seu interesse comercial, importância económica e elevado consumo (do Carmo, 2021). Esta apresenta um corpo oval comprimido, com uma cor cinza prateado, possuindo uma mancha preta no início da linha lateral, que se prolonga na margem superior do opérculo, onde é contornada por uma área avermelhada, na zona inferior (FAO, 2022). Relativamente à sua distribuição geográfica, é comum em todo o Mediterrâneo e no Atlântico Este, mais especificamente, das Ilhas Britânicas a Cabo Verde e em torno das Ilhas Canárias (Seginer, 2016; FAO, 2022). Relativamente ao seu habitat, é um peixe bentopelágico, com um comportamento demersal, que se encontra em pradarias marinhas, fundos rochosos e arenosos, bem como na zona de rebentação, comumente em profundidades de cerca de 30 metros, se bem que os adultos podem ocorrer a 150 metros de profundidade (Fountoulaki *et al.*, 2005; FAO, 2022), alimentando-se de moluscos, crustáceos e peixes. É um hermafrodita protândrico, ou seja, inicialmente são do sexo masculino, convertendo-se depois para fêmeas. Os machos atingem a maturidade entre 1-2 anos, com 20-30 cm, e as fêmeas aos 2-3 anos, quando apresentam 33-40 cm (FAO, 2022).

A dourada apresenta outros aspetos apelativos, como o facto de viver em comunidade, ser uma espécie eurihalina, tolerar elevadas densidades populacionais e ser uma das espécies mais produzidas no Mediterrâneo, que são favoráveis para a sua produção (Fountoulaki *et al.*, 2005; Fazio *et al.*, 2013; do Carmo, 2021).

Tradicionalmente a dourada era produzida extensivamente em lagoas costeiras ou em tanques de água salgada, sendo que, durante os anos 80 foram desenvolvidos os sistemas de produção intensiva e a produção artificial de larvas foi realizada com sucesso pela primeira vez, nos anos 1981 e 1982 (Pavlidis & Mylonas, 2011). Atualmente, é cultivada em regimes extensivo, semi-intensivo e intensivo.

A produção deste organismo tem sido alvo de um crescimento constante, sendo que em 2000 atingiu 87,3 milhares de toneladas e em 2020 alcançou 282,1 milhares de toneladas (FAO, 2022). A sua produção ocorre maioritariamente no Mediterrâneo, com a Grécia (49 %) como maior produtor em 2012, seguida da Turquia (15%), da Espanha

(14%) e da Itália (6 %) como principais produtores mediterrânicos. Também na Croácia, Egito, França, Marrocos, Portugal e Tunísia há produções significativas (Pateiro *et al.*, 2020; FAO, 2022) e, para além do Mediterrâneo, encontram-se aquaculturas no Mar Vermelho, Golfo Pérsico e Mar Árábico. Aqui, o maior produtor é Israel (3%), sendo o Kuwait e Omã produtores menores.

1.3 A Sustentabilidade da Aquacultura

O contínuo aumento da população acarreta desafios e riscos relacionados com a pressão ambiental. A maioria dos atuais sistemas de produção, estão associados a gastos elevados e a uma utilização irresponsável dos recursos finitos, principalmente dos combustíveis fósseis, ameaçando a biodiversidade e contribuindo para a intensificação das mudanças climáticas (Kusumowardani & Tjahjono, 2020; Regueiro *et al.*, 2021). Assim, é fundamental priorizar os sistemas de produção de alimento de menor impacto e, ao mesmo tempo, garantir a segurança alimentar e um desenvolvimento sustentável (Zapelloni *et al.*, 2019; Regueiro *et al.*, 2021).

Na União Europeia (UE), 61% do pescado e marisco consumido é importado, sendo que apenas 20% dos 6,6 milhões de toneladas provenientes das atividades piscatórias corresponde aos produtos provenientes de aquacultura. Segundo Regueiro *et al.* 2021, com a estagnação dos desembarques de pesca na UE, o aumento da produção aquícola aparenta ser a solução para reforçar a taxa de autossuficiência de produtos aquícolas e reduzir a dependência das importações de países terceiros que podem não cumprir os requisitos restritos, relativamente à segurança alimentar e/ ou proteção ambiental, que a UE aplica. Uma vez que a proteção do ambiente deve ser a base do desenvolvimento da aquacultura, este setor tem de possuir a capacidade de intensificar, simultaneamente, a sua produtividade e o seu desempenho ambiental.

As estratégias de economia circular (EC) auxiliam no melhor uso dos recursos e na menor produção de resíduos (Figura 2). Esta tem como objetivos o aumento da eficiência da matéria e do seu ciclo de vida, ao maximizar a sua conversão em subprodutos e, desta forma, minimizar o desperdício (Clark *et al.*, 2016; Zapelloni *et al.*, 2019; Regueiro *et al.*, 2021). Todos estes objetivos produzem grandes benefícios socioeconómicos, ao contribuir para a inovação, o crescimento e a criação de emprego.

Visto que a economia circular é um processo regenerativo, é necessário implementar um *design* ecológico em todos os processos de uma aquacultura, tendo este início no delineamento do projeto, onde se deverá ter por escolha uma Aquacultura Multitrófica Integrada (IMTA), Bioflocos ou Aquaponia (Ruiz-Salmón *et al.*, 2020; Regueiro *et al.*, 2021).

O crescente aumento do setor da aquacultura, tem sido alvo de várias críticas, devido aos impactos ambientais e sociais que provoca. Uma destas está relacionada com o fornecimento de rações fabricadas à base de ingredientes de origem marinha, tal como a proteína e o óleo de peixe proveniente das pescas, e com a libertação de matéria orgânica no meio ambiente (Kusumowardani & Tjahjono, 2020; Regueiro *et al.*, 2021). Estas questões coincidem com os fracos mercados para os subprodutos da pesca e do setor aquícola. O objetivo da indústria é desenvolver alimentos aquáticos sustentáveis, que não só satisfaçam as necessidades nutricionais de cada espécie, mas também promovam o bem-estar e as funcionalidades ideais dos peixes, como por exemplo o melhoramento do sistema imunológico do indivíduo (Passos *et al.*, 2021). A economia circular em aquacultura é, de longe, a melhor base para a definição do *cradle-to-cradle*, isto é, tornar resíduos em recursos infinitos em que o desperdício = alimento. Segundo Kusumowardani & Tjahjono (2020), o termo EC no setor aquícola, particularmente no fabrico de rações, ainda é pouco explorado, sugerindo também que os elementos-chave deste conceito são a resiliência de recursos, a eficiência de recursos e energia, os recursos renováveis, a gestão de resíduos e o bem-estar social. Com efeito, a aplicação do conceito da EC poderá auxiliar na resolução de problemas de gestão de resíduos, através da utilização de recursos biológicos pouco explorados, em particular, de macroalgas que possuem propriedades biológicas muito interessantes para incorporação em rações para aquacultura (Ruiz-Salmón *et al.*, 2020).



Figura 2: Economia circular.
<https://wesea.es/pt/economia-circular-pt/>

1.4 Utilização Sustentável de Macroalgas em Rações para Aquacultura

As macroalgas são um grupo diversificado de organismos marinhos com mais de 10.000 espécies diferentes (Miranda *et al.*, 2017). Este grupo engloba algas macroscópicas, multicelulares e com um estilo de vida bêntico, podendo ser encontradas nas zonas costeiras intertidais, subtidais e nos estuários. Visto que a vivência neste tipo de *habitats* pode ser um desafio, devido aos componentes físicos e biológicos *stressantes* (temperatura, luz, salinidade, ação das ondas, predação, competição, parasitismo e alelopatia) (Miranda *et al.*, 2017; Wan *et al.*, 2019), estas são capazes de se adaptar às condições ambientais ao produzir metabólitos secundários exclusivos, incluindo proteínas, polissacarídeos, lípidos, pigmentos e minerais. Para além disto, as macroalgas são também conhecidas pela grande variedade de propriedades biológicas, em particular, antioxidantes, antibacterianas e anti tumorais.

São classificadas em três grupos principais, tendo por base a sua pigmentação: Phaeophyta (castanhas), Rhodophyta (vermelhas) e Chlorophyta (verdes) (Mæhre *et al.*, 2014).

As algas castanhas (Phaeophyceae) são importantes produtores primários nos ecossistemas marinhos, abrangendo entre 1.500 e 2.000 espécies. Além da sua importância ecológica, são também um recurso renovável significativo e subexplorado de diferentes biomoléculas com potencial industrial e farmacêutico (Chenais *et al.*, 2022). Têm, também, demonstrado eficácia no controlo de doenças de plantas (Peres *et al.*, 2012).

Pelvetia canaliculata (Linnaeus), é uma alga castanha amplamente presente na costa atlântica da Europa, desde a Islândia a Portugal, incluindo a Noruega, Irlanda, Grã-Bretanha, Holanda, França e Espanha (Girardi *et al.*, 2014). Em Portugal, especificamente, está distribuída de forma constante por toda a costa (Sousa *et al.*, 2021). Esta alga é particularmente rica em compostos bioativos, principalmente em compostos fenólicos, e em polissacarídeos sulfatados que contêm fucose (FCSPs) que desempenham papéis importantes na manutenção da integridade estrutural da parede celular e na prevenção da desidratação das algas (Sousa *et al.*, 2021; Chenais *et al.*, 2022). Para além disso, não possui lignina, o que facilita a extração de biomoléculas, e, de acordo com Bhatnagar *et al.* (2012) e Girardi *et al.* (2014), *P. canaliculata* mostrou ter as melhores capacidades de bio absorção de metais pesados presentes na água, devido ao seu alto teor de alginato, quando comparada com Chlorophyta e Rhodophyta (Hackbarth *et al.*, 2014).

A utilização de algas marinhas como matéria-prima na produção de biopolímeros, em cosmética, na indústria agroalimentar e em suplementos alimentares, oferece múltiplos benefícios para a saúde (Balina *et al.*, 2017). No entanto, este processamento origina produtos residuais, que geralmente são descartados. Atualmente, tem havido bastante foco numa bioeconomia sustentável e em sistemas de produção, onde não exista produção de resíduos, sendo a biorrefinaria uma das formas de diminuir o impacto negativo no meio ambiente.

De acordo com Balina *et al.* (2017), biorrefinaria é definida por combinações de processos e tecnologias para conversão de biomassa em alimentos, rações, energia e outros produtos de valor agregado, com quantidade mínima de resíduos, que oferecem também uma maneira de desenvolver uma economia industrial sustentável e reduzir o impacto nas mudanças climáticas, ao diminuir a pressão exercida nos ecossistemas.

As macroalgas marinhas apresentam um elevado potencial para serem integradas numa biorrefinaria. Porém, ainda é necessário desenvolver um conceito de biorrefinaria de algas que apresente uma estratégia de valorização das mesmas, em que sejam apresentadas como matéria-prima valiosa, em particular, na produção de rações para aquacultura (Balina *et al.*, 2017). Até ao momento, existem vários estudos com foco na incorporação de macroalgas na alimentação de peixes. No trabalho de Safavi *et al.* (2019), foi estudado o efeito do extrato de *Ulva intestinalis* e de *Gracilariopsis persica*, como suplemento dietético no desempenho do crescimento, perfil de ácidos gordos, resposta ao stress, atividade enzimática antioxidante e respostas imunitárias não específicas na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), tendo os resultados indicado um aumento significativo do desempenho de crescimento dos peixes, um teor de proteína superior e um menor teor de lípidos, enquanto a atividade lisozima foi significativamente melhorada. Relativamente ao estudo de Gomes (2020), foi avaliado o efeito da adição de *Gracilaria gracilis* à ração de dourada, sendo que a dieta suplementada com 5% da alga moída, promoveu o crescimento, protegeu contra a infeção por *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* e influenciou positivamente o perfil hematológico; no estudo de Passos *et al.* (2021) também a ração de douradas foi suplementada com *G. gracilis*, sendo que não comprometeu os sistemas antioxidantes hepáticos, a saúde e morfologia intestinal, além disso, melhorou a concentração plasmática de lisozima. Outro estudo realizado foi o de Valente *et al.* (2021), tendo o seu objetivo sido avaliar a inclusão de três algas marinhas (*Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* e *Gracilaria cornea*) na dieta de *D. labrax*, e verificar o seu efeito no desempenho, na utilização de nutrientes e composição corporal. Os resultados obtidos indicaram que a suplementação com estas três macroalgas não afetou negativamente os parâmetros mencionados anteriormente.

1.5 Enquadramento e Objetivos

Este estudo foi desenvolvido no âmbito do projeto “Ocean2Oils” que pretende valorizar macroalgas da costa portuguesa, numa perspetiva de economia circular, com o intuito de (i) reduzir o impacto ambiental dos resíduos de óleos comestíveis e aumentar a qualidade/ estabilidade do óleo, ao prolongar a sua utilização, ao serem suplementados com extratos naturais de algas marinhas, ricos em antioxidantes; (ii) acrescentar valor aos produtos fritos, através da aplicação de revestimentos de polissacarídeos de algas marinhas e (iii) produzir suplementos para rações de aquacultura, por meio da biomassa residual das algas que continua a ter um bom valor nutricional e a ser uma fonte rica em nutrientes, proteínas e fibras. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da

incorporação da alga *P. canaliculata* liofilizada (1%, 5% e 10%) e do resíduo da mesma alga (1% e 10%), obtido após a sua utilização na suplementação de óleo de girassol, em rações para aquacultura de dourada (*Sparus aurata*), e os efeitos que esta incorporação teve no desempenho de crescimento, perfil hematológico, parâmetros imunológicos, metabólicos, stress oxidativo e perfil nutricional do músculo do peixe.

2. Materiais e métodos

2.1 Declaração de ética

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

2.2 Recolha da alga e processamento

A alga *Pelvetia canaliculata* foi colhida nas rochas da praia Pedras do Corgo, Porto, Portugal (41°14'55.52" N, 8°43'29.89" W), em abril de 2021, e transportada para as instalações do Edifício CETEMARES (MARE - Politécnico de Leiria, Peniche, Portugal). Procedeu-se à sua lavagem e limpeza com água destilada, para remoção de impurezas, nomeadamente, de algas, fragmentos rochosos e pequenos animais marinhos, sendo depois escorrida num tabuleiro de rede, liofilizada e moída. A biomassa assim preparada foi utilizada para a suplementação do óleo de girassol, com vista a aumentar a estabilidade oxidativa do óleo alimentar. Para isso preparou-se uma mistura de alga e óleo, numa proporção de 12,5% (m/v), que foi mantida num banho de ultrasons (VWR Ultrasonic Cleaner USC – TH, capacidade 5.4 L, frequência 45 KHz), durante 20 minutos, de forma a extrair os compostos bioativos da alga para o óleo. Seguidamente, a mistura foi filtrada a vácuo (filtro de papel, gramatura 160 g m⁻², espessura 0,470 mm, poro 60-68 µm e cinzas < 0,15%), de maneira a ser possível separar o óleo suplementado do resíduo sólido da alga. Este resíduo, ainda rico em nutrientes, foi, posteriormente, utilizado como ingrediente da ração de douradas.

2.3 Dietas experimentais

Uma empresa especializada (SPAROS, Portugal) formulou seis dietas (Tabela 1), considerando três concentrações da alga *Pelvetia canaliculata*, liofilizada e moída, a 1% (Pel 1%), a 5% (Pel 5%), e a 10% (Pel 10%), duas concentrações do resíduo da alga de 1% e 10% (Resíduo 1% e 10%), e uma dieta controlo (CTRL).

Tabela 1: Composição nutricional das dietas experimentais (média ± DP).

Composição (%)	CTRL	Pel 1%	Pel 5%	Pel 10%	Resíduo 1%	Resíduo 10%
Proteína	48,9 ± 0,8	47,2 ± 0,7	47,5 ± 0,9	48,6 ± 0,6	47,1 ± 2,0	47,9 ± 1,4
Lípidos	17,4 ± 0,2	17,0 ± 1,1	17,1 ± 0,3	16,9 ± 0,6	17,6 ± 0,3	16,8 ± 0,4
Cinzas	6,3 ± 0,1	6,4 ± 0,1	7,0 ± 0,0	8,2 ± 0,0	6,6 ± 0,1	7,7 ± 0,0
Teor de água	7,1 ± 0,2	9,1 ± 0,1	7,7 ± 0,1	8,0 ± 0,1	6,1 ± 0,0	6,5 ± 0,1
Hidratos de Carbono	19,9 ± 0,6	19,9 ± 1,4	20,2 ± 0,7	17,8 ± 0,3	22,1 ± 2,3	20,6 ± 1,1

Na tabela 2, está descrito a composição nutricional da biomassa da alga liofilizada e do resíduo da alga, obtido após a suplementação do óleo de girassol.

Tabela 2: Composição proximal da alga liofilizada e do resíduo de *P. canaliculata* (média ± DP).

Composição proximal	Proteína (%)	Lípidos (%)	Cinza (%)	Hidratos de Carbono (%)
Alga liofilizada	7,7 ± 0,1	5,1 ± 0,4	21,4 ± 0,0	65,7 ± 0,4
Resíduo	5,3 ± 0,1	35,3 ± 1,1	14,6 ± 0,0	44,86 ± 0,3

2.4 Desenho experimental

Os juvenis de *S. aurata* foram adquiridos na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) e transportados para o edifício CETEMARES (Peniche, Portugal). Permaneceram num sistema de recirculação durante 15 dias para aclimação, sendo alimentados diariamente em condições de qualidade da água adequadas para a espécie. Depois, procedeu-se à pesagem individual de 360 peixes, peso médio inicial de $15,6 \pm 3,8$ g (média \pm DP), e à distribuição, aleatória, em 18 aquários de 60 L, (divididos em 6 sistemas de recirculação independentes (Figura 3)). Os indivíduos foram anestesiados, com uma dose de 0,5 mL/L de 2-fenoxietanol (VWR Chemicals, Portugal), para efetuar a pesagem de forma segura. A densidade inicial era $5,1 \pm 0,3$ kg/ m³. Antes da alimentação com as dietas em estudo, houve um período de uma semana para os peixes se ambientarem às novas condições. Depois, foi atribuída uma dieta experimental a cada sistema (6 no total), cada um com 3 aquários. Todos os peixes foram alimentados à mão, até à aparente saciedade, três vezes por dia (9h, 12h e 15h), durante 44 dias.

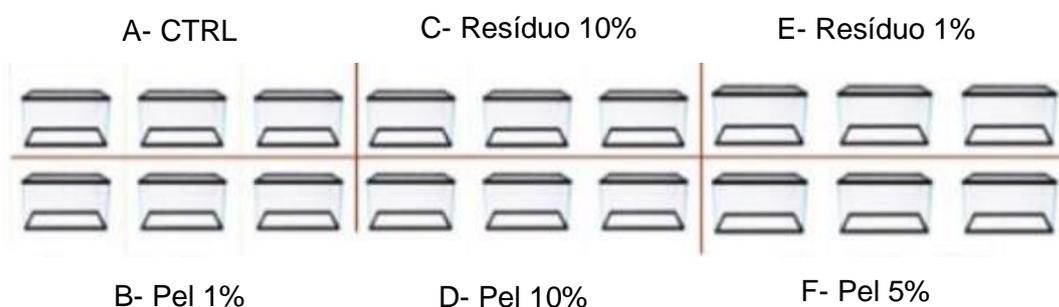


Figura 3: Esquema representativo dos tanques referentes a cada tratamento.

A temperatura ($20,5 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$), o pH ($8,1 \pm 0,2$), a salinidade ($32,6 \pm 2,0$) e o oxigénio dissolvido ($90,3 \pm 0,3$ %) foram monitorizados diariamente (Tabela 3). Para medir a salinidade, foi utilizado o refratómetro Seawater refractometer H196822 (Hanna Instruments, Portugal) e para os restantes parâmetros foi usada a sonda multiparamétrica Professional Plus (YSI, EUA).

Tabela 3: Descrição do peso dos indivíduos e dos diferentes parâmetros de qualidade da água, para cada tratamento (média \pm DP, n=9).

Tratamento	CTRL	Pel 1%	Pel 5%	Pel 10%	Resíduo 1%	Resíduo 10%
Peso (g)	15,6 \pm 3,8 g	15,9 \pm 4,0	15,1 \pm 3,8	15,4 \pm 3,4 g	15,5 \pm 3,8	14,9 \pm 3,3 g
T (°C)	20,3 \pm 1,0	20,3 \pm 1,0	20,4 \pm 1,1	20,6 \pm 1,1	20,6 \pm 1,0	20,7 \pm 1,1
pH	8,1 \pm 0,1	8,1 \pm 0,1	8,1 \pm 0,2	8,1 \pm 0,2	8,0 \pm 0,2	8,1 \pm 0,3
Salinidade	32,8 \pm 0,3	32,5 \pm 1,5	32,6 \pm 1,5	32,6 \pm 1,6	32,8 \pm 0,3	32,8 \pm 0,3
O₂ dissolvido (%)	92,6 \pm 2,0	90,8 \pm 1,6	90,5 \pm 1,3	89,9 \pm 1,4	88,7 \pm 2,4	88,9 \pm 1,6

Concluído o ensaio de alimentação, os peixes ficaram em jejum durante 24 horas, antes de se fazer a amostragem final. Os peixes foram anestesiados, com uma dose de 0,5 ml/L de 2-fenoxietanol (VWR Chemicals, Portugal) e pesados, individualmente. Três exemplares de cada aquário foram sacrificados com uma overdose do anestésico (1ml/L), para recolha de sangue e do fígado, sendo que a dois desses três indivíduos, foram retirados dois filetes, com pele, para a posterior análise nutricional do músculo. Para isso, os filetes foram congelados e liofilizados. Após liofilização, foram triturados individualmente e mantidos a -20°C, até posterior análise.

De forma a traçar o perfil hematológico, determinaram-se os seguintes parâmetros: hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb; referência: 10012305, Spinreact, Espanha), contagem de eritrócitos (RBC) e leucócitos (WBC), sendo que o sangue foi recolhido com seringas estéreis de 1 mL NORM-JECT (VWR Chemicals, Portugal) e agulhas hipodérmicas (25G x 5/8" 0,5mm x 16 mm (Konvex, Lleida, Espanha), com 20 μ L de heparina (3000 unidades/mL) (BRAUN, Portugal). A colheita de plasma foi também realizada, de forma a ser possível determinar o parâmetro de resposta imune, através da centrifugação (Centrifuge 5804, Eppendorf, Alemanha) do sangue, 10.000 \times g a 4°C, durante 10 minutos. As amostras foram conservadas a -80°C, até à realização das determinações analíticas.

2.5 Performance do crescimento

O desempenho do crescimento foi determinado com base no ganho de peso, índice de crescimento diário (DGI), taxa de conversão alimentar (FCR), taxa de crescimento específico (SGR) e índice de consumo voluntário (VFI; peso corporal dia⁻¹), sendo que o peso inicial e final de cada peixe, em cada aquário, foi utilizado para os seguintes cálculos de desempenho do crescimento:

$$WG (g) = W_f - W_i$$

onde W_f (g) e W_i (g) são o peso final e peso inicial, respetivamente.

(1)

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

(2)

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

(3)

$$SGR \text{ (taxa de crescimento específico) (peso corporal dia}^{-1}\text{)} = \frac{\log W_f - \log W_i}{t} \times 100$$

onde t significa tempo, em dias.

(4)

$$VFI \text{ (Consumo Voluntário) (peso corporal dia}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{consumo de ração}/ABW)}{t} \times 100,$$

onde t significa tempo, em dias, e ABW peso médio corporal.

$$VSI \text{ (Índice visceral) (\%)} = \frac{\text{peso visceral}}{\text{peso do indivíduo}} \times 100$$

(5)

$$HSI \text{ (Índice hepatossomático) (\%)} = \frac{\text{peso do fígado}}{\text{peso do indivíduo}} \times 100$$

(6)

2.6 Parâmetros analíticos

2.6.1 Parâmetros hematológicos

Os parâmetros a ser analisados consistiram na determinação do hematócrito, da hemoglobina e na contagem de eritrócitos e leucócitos.

Para determinar o hematócrito, foram utilizados tubos microhemáticos (Brand, Alemanha). Depois, foram centrifugados (Hematokrit 200, Hettich, Alemanha), a 10.000 × g, durante 10 minutos, e os resultados foram lidos através da colocação do leitor de gráfico sobre o rotor.

De forma a avaliar a concentração de eritrócitos e leucócitos presentes no sangue, foram efetuadas diluições das amostras de sangue de 1:200 e 1:20, respetivamente, em PBS (tampão fosfato-salino) (Sigma Aldrich, EUA) com heparina a (30 unidades/ mL) (BRAUN, Portugal). A câmara de Neubauer foi preenchida com a amostra, tendo sido efetuadas as contagens em 5 quadrados.

Relativamente à determinação da concentração de hemoglobina, foi utilizado o método colorimétrico de Drabkin (referência: 10012305, Spinreact, Espanha). Primeiro, a amostra de sangue (1 µL) foi colocada em 500 µL de reagente Drabkin, tendo a solução sido mantida no escuro, até à colocação na microplaca de 96 poços, para impedir a reação prematura do reagente. Foram colocados 100 µL da amostra, em triplicado, na microplaca e foi lida a absorvância a 540 nm no leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA). Para os cálculos, foi subtraída a média do branco à média das absorvâncias, tendo os restantes cálculos sido realizados de acordo com as instruções do fornecedor. Os resultados foram apresentados em g/ dL. O volume corpuscular médio (MCV), a hemoglobina corpuscular média (MCH) e a concentração da hemoglobina corpuscular média (MCHC) foram calculados de acordo com as equações 7, 8 e 9, respetivamente.

$$MCV = \frac{\text{Hematócrito (\%)}}{\text{Eritrócitos } (\times 10^4 \mu^{-1})} \quad (7)$$

$$MCH \text{ (pg célula}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Hemoglobina (g dL}^{-1}\text{)}}{\text{Eritrócitos } (\times 10^4 \mu^{-1})} \times 10 \quad (8)$$

$$MCH \text{ (pg célula}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Hemoglobina (g dL}^{-1}\text{)}}{\text{Hematócrito (\%)}} \times 100 \quad (9)$$

2.6.2 Parâmetro imunológico

Atividade da Peroxidase

A atividade da peroxidase (unidades/ mL de plasma) foi medida seguindo o procedimento descrito por Quade & Roth (1997). Primeiramente, foi diluído 5 µL de plasma em 145 de µL tampão fosfato-salino (PBS) (Sigma Aldrich, EUA), numa microplaca de 96 poços, sendo que o branco era PBS. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de 3',5' – tetramethylbenzidine hydrochloride (TMB; 10mM; Sigma Aldrich, EUA) e 50 µL de peróxido de hidrogénio (H₂O₂; 5 mM; Sigma Aldrich, EUA), a cada poço. Passados 2 minutos, a reação foi interrompida através da adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄; 2M; Fluka™) e a absorvância foi medida no leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA), a 450 nm.

2.6.3 Parâmetros de stress oxidativo

Preparação de amostras

Os parâmetros do *stress* oxidativo foram analisados, em amostras de fígado extraído de cada um dos peixes utilizados no ensaio de alimentação. Primeiramente, foram pesadas entre 50 mg – 100 mg de fígado para cada amostra, tendo sido sempre mantidas em gelo (Figura 4). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas, com o auxílio de um homogeneizador *Disposable Pellet Mixer* (VWR Chemicals, Portugal) com 1mL de água ultrapura. Para as posteriores análises as amostras foram divididas da seguinte forma: para o LPO, foram transferidos 200 µL de amostra para alíquotas que continham 4 µL de 2,6-*Di-tert-butyl-4-methylphenol* (BHT), a 4% em metanol (Sigma Aldrich, EUA); para as restantes análises de *stress* oxidativo, foram adicionados 800 µL de tampão fosfato de potássio (0,2 M, pH 7,4) (adição da solução básica K₂HPO₄ com solução ácida KH₂PO₄ 0,2M, pH = 7,4) (Sigma Aldrich, EUA) a certos volumes de tecido homogeneizado, tendo posteriormente passado pelo vórtex. Estas amostras foram centrifugadas a 10000 × g a 4° C (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburgo), durante 20 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram divididos em alíquotas para as diferentes análises e foram conservadas a -80°C até à realização dos respetivos testes.



Figura 4: Recolha de amostras de fígado para análise dos parâmetros de *stress* oxidativo.

Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada segundo o método descrito por Bird & Draper (1984). Para esta análise, no total foram adicionados a cada microtubo 2 mL:

200 μL de cada amostra de tecido homogeneizado, 100 μL de TCA (ácido tricloroacético; Sigma Aldrich, EUA) juntamente com 1 mL da mistura de reagentes de TBA 0,73% (ácido tiobarbitúrico; 60 mM; Sigma Aldrich, EUA), Tris-HCl (*Trizma hydrochloride*; Sigma Aldrich, EUA) e DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético; 0,1mM, pH=7,4; Sigma Aldrich, EUA) (Figura 5). Depois de misturadas no vórtex, as amostras foram levadas a incubar a 100°C, durante 1 hora, e a centrifugar por 5 minutos, a 11500 \times rpm (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Alemanha). Após a centrifugação, foram pipetados, em triplicado, 200 μL de sobrenadante para uma microplaca de 96 poços e foi lida a absorvância a 535nm, no leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA). Os valores de LPO foram calculados e expressos em TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*) (nmol/ g), usando o coeficiente de extinção molar (ϵ) de $1,56 \times 10^5$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) de MDA.



Figura 5: Adição de 1 mL de TBA a todas as amostras.

Catalase

A atividade da enzima catalase, foi avaliada de acordo com Clairborne (1985). Foi utilizada uma microplaca apropriada para uma leitura com luz ultravioleta. As amostras foram diluídas com o mesmo tampão que fora utilizado para a homogeneização, a fim de obter um valor proteico de 0,7 mg/ mL (triplicado), para os 10 μL de amostra, aos quais foram adicionados 140 μL de tampão fosfato-potássio (0,05 M, pH= 7; Applichem, Alemanha) (preparado pela adição da solução básica K_2HPO_4 e solução ácida KH_2PO_4) e 150 μL de solução de peróxido de hidrogênio, a 30% (Sigma Aldrich, EUA). A

absorvância foi lida ao comprimento de onda de 240 nm, por 2 minutos (uma leitura a cada 15 segundos), no leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA). A atividade da enzima catalase foi expressa em U/ mg de proteína, tendo sido utilizado o coeficiente de extinção molar (ϵ) de H_2O_2 de $40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com Almeida *et al.* (2010). Primeiramente, foram preparadas soluções padrão para a elaboração de uma reta padrão, a partir de uma solução mãe de SOD (300 U/ mL de proteína), com diversas concentrações, 0, 1, 0,75, 0,5, 0,25, 0,125, 0,05, 0,025 U SOD (Sigma Aldrich, EUA). As amostras foram diluídas de maneira a obter 0,3 mg/ mL de proteína. Numa microplaca de 96 poços, procedeu-se à adição de 50 μL de amostra juntamente com 200 μL de solução de reação, sendo que esta consistiu em soluções de xantina (0,7mM; Sigma Aldrich, EUA), de citocromo C (0,03mM; Sigma Aldrich, EUA), tampão fosfato-potássio (50mM) com 1mM de Na-EDTA (pH = 7,8) (preparado através da adição de Na_2HPO_4 ; Applichem, Alemanha), fosfato monossódico (Applichem, Alemanha) e Na-EDTA (Applichem, Alemanha). Previamente à leitura, foram também adicionados 50 μL de xantina oxidase (0,03 U/ mL; Sigma Aldrich, EUA). Foi lida a absorvância no leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA), ao comprimento de onda de 550 nm com repetidas leituras de 20 em 20 segundos, durante 3 minutos. A atividade da SOD foi expressa em U/ mg de proteína, sendo que uma unidade de atividade representa a quantidade de enzima necessária para que seja produzida uma inibição de 50% da taxa de redução do citocromo C.

Glutathiona - S – Transferase

A atividade da glutathiona – S - transferase (GST) foi determinada seguindo o método de Habig *et al.*, (1974), tendo sido utilizada uma microplaca de 96 poços. Tal como na catalase, as amostras foram diluídas com tampão fosfato-potássio (0,2M, pH=7,4) (Sigma Aldrich, EUA), de forma a obter um valor proteico de 0,7 mg/ ml. Foram pipetados 50 μL de amostra, em triplicado, aos quais foram adicionados 250 μL de solução de reação, que consiste em tampão fosfato - potássio (0,05 M, ph= 6,5) (Sigma Aldrich,

EUA), L- glutationa reduzida (GSH; Sigma Aldrich, EUA) e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB; Sigma Aldrich, EUA). A absorvância foi lida no leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA), a um comprimento de onda de 340 nm, tendo sido realizadas leituras consecutivas de 20 em 20 segundos, durante 5 minutos.

Glutationa total

A Glutationa total (TG) foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Baker *et al.* (1990) e Rodrigues *et al.* (2017). Foi realizada uma curva padrão com L- glutationa reduzida (Sigma Aldrich, EUA) e tampão fosfato-potássio (0,05 M, pH=6,5) (Sigma Aldrich, EUA). As amostras foram diluídas de forma a obter um valor proteico de 0,7 mg/ mL, para 50 µL de amostra. Para o branco, foram pipetados 50 µL de tampão fosfato-potássio (0,2 M, pH=7,4) (Sigma Aldrich, EUA) e adicionados 250 µL de reação de solução, que consiste em tampão fosfato - potássio (0,2 M, pH=7,4) (Sigma Aldrich, EUA), fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH; Sigma Aldrich, EUA), solução de ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) e solução de glutationa redutase (GR; Sigma Aldrich, EUA), a todos os poços. A absorvância foi lida no leitor de microplacas (EPOCH 2 microplate reader, BioTek, EUA), ao comprimento de onda de 412 nm, durante 3 minutos, com leituras consecutivas de 20 em 20 segundos.

2.6.4 Parâmetros metabólicos

De forma realizar a medição dos metabólitos plasmáticos, as amostras foram descongeladas. Os parâmetros medidos foram o colesterol (referência: 1001090, Spinreact), a glucose (referência: 1001190, Spinreact), os lípidos totais (referência: 1001270, Spinreact), os triglicéridos (referência: 1001311, Spinreact), a alaninaminotransferase (ALT; referência: 41282, Spinreact) e, por fim, a aspartato aminotransferase (AST; referência: 41272, Spinreact). Cada um destes parâmetros foi avaliado através da utilização de *kits* comerciais da Spinreact (Girona, Espanha), de acordo com as instruções do fabricante.

2.6.5 Perfil nutricional do músculo

Lípidos totais

Para a determinação do teor de gordura nas amostras de músculo, fez-se a quantificação dos lípidos totais pelo método de Folch (Folch *et al.*, 1957), com algumas modificações de Iverson *et al.* (2001). Primeiramente, pesou-se 1 g de amostra liofilizada para tubos de Falcon de 50 mL, à qual se adicionou 1 mL de água destilada e 10 mL de reagente de Folch (mistura de clorofórmio e metanol (Chemlab, Zedelgem, Bélgica e Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América, respetivamente) na proporção de 2:1 (v/v). As amostras foram homogeneizadas no vórtex durante 5 minutos, e adicionou-se 1,2 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl; Fluka™) a 0,8% e procedeu-se à homogeneização por mais 2 minutos. A seguir as amostras foram centrifugadas a 6000 × g (5810 R, Eppendorf, Alemanha), durante 10 minutos para a separação de fases.

Posteriormente, usando-se uma pipeta Pasteur, transferiu-se a fase de clorofórmio (inferior) para balões periformes, previamente tarados, fazendo-a passar através de uma coluna de sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄; Labchem). Seguidamente, adicionou-se mais 2 mL de clorofórmio (Chemlab, Zedelgem, Bélgica) ao restante conteúdo dos tubos de Falcon e repetiu-se o processo de homogeneização (2 minutos), centrifugação e recolha da fase orgânica. A fase orgânica contida nos balões periformes foi evaporada num evaporador rotativo (Heidolph 4000, Alemanha) e os balões com o resíduo de gordura foram levados à estufa (FD115, Binder, Alemanha), a 60°C *overnight*, e no dia seguinte foram arrefecidos num exsiccador e pesados.

A percentagem de lípidos totais foi determinada através da fórmula:

$$\text{Lípidos totais (\% PS)} = \frac{(\text{massa do balão com gordura} - \text{massa do balão})}{\text{massa da amostra liofilizada}} \times 100 \quad (10)$$

Teor de cinza

De forma a determinar o teor de cinza, foi utilizado o protocolo de NP 2032 (1988). Primeiro, foram selecionados 36 cadinhos e colocados na mufla (Nabertherm, Alemanha) a 200°C, durante 2 horas. Foram arrefecidos no exsicador, pesados e registada a massa de cada um. Posteriormente, foi pesada 1 g de amostra para cada cadinho correspondente, sendo depois transferidos, novamente, para a mufla (Nabertherm, Alemanha) a 500°C, durante 12 horas. Foram, mais uma vez, arrefecidos, pesados e registada a massa. A percentagem de cinzas é dada pela seguinte fórmula:

$$\text{Cinza (\% PS)} = \frac{(m1 - m2)}{\text{massa da amostra liofilizada}} \times 100 \quad (11)$$

Sendo que,

m1= Massa do cadinho mais cinza (12h na mufla a 500°C)

m2= massa do cadinho (g)

Teor de água

Para determinar o teor de água, foi utilizado o protocolo descrito por Ganesan *et al.* (2018), com algumas adaptações. As amostras de 1 g foram pesadas para cadinhos, previamente secos e colocadas na estufa (FD115, Binder, Alemanha) durante 48 horas, a 105°C. Depois, as amostras foram transferidas para o exsicador e pesadas novamente, após o arrefecimento. Foi utilizada a seguinte fórmula, de maneira a obter o teor de água:

$$\% \text{ Teor de água} = \frac{(m2 - m1)}{\text{massa da amostra fresca}} \times 100 \quad (12)$$

Sendo que,

m1= Massa de amostra liofilizada(g)

m2= massa de amostra fresca (g)

Perfil de Ácidos gordos

Para a caracterização do perfil de ácidos gordos procedeu-se à transmetilação direta em meio ácido das amostras, de acordo com o protocolo de Fernández *et al.* (2015). No início, foram pesadas, para tubos de ensaio de rosca, 50 mg de amostra de músculo liofilizado (Figura 6). Depois, adicionou-se 2 mL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄, Fluka™) a 2% em metanol (CH₃OH; Sigma Aldrich, EUA), e colocaram-se os tubos devidamente fechados num banho de água (Selecta, Cham, Suíça) a 80°C, durante 2 horas. Após o arrefecimento, adicionou-se a cada tubo 1 mL de água ultra-pura (miliQ) e 2 mL de hexano. A seguir, fez-se uma homogeneização no vórtex, durante 1 minuto, e as amostras foram centrifugadas 5 minutos, a 1500 rpm (5810 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Finalmente, recolheu-se a fase superior das amostras (hexano contendo os esteres metílicos de ácidos gordos (EMAG)) para o GC-vials e procedeu-se à respetiva análise, por cromatografia gasosa. A análise dos ácidos gordos no GC foi realizada de acordo com a descrição de Silva *et al.* (2017).



Figura 6: Amostra de músculo liofilizado.

Para tal, utilizou-se um cromatógrafo (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América), equipado com uma coluna capilar Thermo Tr-FAME (60 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm de espessura de filme de fase estacionária), um injetor automático (Autosampler AS 3000, Thermo Electron Corporation) e um detetor de ionização de chama (FID).

O detetor e o injetor (a funcionar em modo *splitless*) foram programados para temperaturas de 280°C e 250°C, respetivamente. A temperatura da coluna foi programada para um valor inicial de 100 °C durante 1 minuto, aumentando a uma velocidade de 9°C min⁻¹ até aos 180°C, mantendo-se a essa temperatura durante 10 minutos. Depois procedeu-se a um novo aumento de 2°C min⁻¹ até aos 235°C, mantendo-se a essa temperatura durante 5 min. O hélio foi usado como gás de arraste, com um fluxo de 1,2 mL min⁻¹. Para a chama do detetor utilizou-se ar sintético e hidrogénio, com fluxo de 350 mL min⁻¹ e 35 mL min⁻¹, respetivamente. Usou-se o software Xcalibur para a aquisição e análise de dados. A identificação dos ácidos gordos foi feita por comparação dos tempos de retenção dos EMAG com os tempos de retenção dos componentes das misturas padrão de Supelco 37, PUFA No.1 e PUFA No.3 (Sigma-Aldrich, EUA). Os resultados foram expressos em percentagem de área total (% Área Total).

Os índices aterogénico (AI), trombogénico (IT) e da razão de ácidos gordos hipocolesterolémicos/ ácidos gordos hipercolesterolémicos (h/H) foram calculados através das seguintes equações:

(13)

$$\frac{h}{H} = \frac{(C18:1 n9 + C18:2 n6 + C20:4 n6 + C18:3 n3 + C20:5 n3 + C22:5 n3 + C22:6 n3)}{(C14:0 + C16:0)}$$

(14)

$$AI = \frac{(C12:0 + 4 \times (C14:0) + C16:0)}{(\Sigma MUFA + \Sigma n3 + \Sigma n6)}$$

$$TI = \frac{(C14:0 + C16:0 + C18:0)}{(0,5 \times \Sigma MUFA + 3 \times \Sigma n3 + 0,5 \times \Sigma n6 + \frac{\Sigma n3}{\Sigma n6})} \quad (15)$$

Proteína total

Para a quantificação da proteína total no músculo do peixe, foi utilizado o método de Kjeldahl (AOAC, 2016). Este ensaio consiste na mineralização da matéria orgânica pelo ácido sulfúrico (Fluka™), através da presença do catalisador, constituído por pastilhas KjelTabs (VWR CHEMICALS, Pensilvânia, Estados Unidos da América), com a posterior libertação de amoníaco, em meio alcalino, destilação, recolha do meio ácido e, por fim, titulação com ácido clorídrico.

De forma a ser possível realizar este ensaio, foram previamente preparadas as soluções necessárias, nomeadamente a solução de hidróxido de sódio (40% (m/v); VWR CHEMICALS, Pensilvânia, Estados Unidos da América), a solução titulante de ácido clorídrico (0,1M; VWR CHEMICALS, Pensilvânia, Estados Unidos da América), e a solução recetora. Esta última consiste numa solução de 1L de ácido bórico (4% (m/v); VWR CHEMICALS, Pensilvânia, Estados Unidos da América) com 7 mL de vermelho metilo (VWR CHEMICALS, Pensilvania, América) e 10 mL de verde de bromocresol (Alfa Aesar, Massachusetts, Estados Unidos da América), tendo sido ajustada a um pH de 4,8.

Foi pesada uma quantidade de amostra liofilizada de cerca de 0,15 g, sendo depois transferida para os tubos Kjeldahl. Todo este processo teve lugar dentro da *hotte*. Adicionou-se uma pastilha KjelTab (VWR CHEMICALS, Pensilvania, Estados Unidos da América) e 25 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 97%; Fluka™) a cada tubo, tendo sido colocados no digestor Kjeldahl (Foss, Hillerød, Dinamarca), onde foram deixados durante 30 minutos, após atingir os 220°C. Quando passou este tempo, a temperatura

foi programada para os 400°C e os tubos ficaram no digestor por mais 90 minutos (Figura 7 a).

Após o tempo de digestão, as amostras foram arrefecidas e, posteriormente, adicionados 70 mL de água destilada, a cada uma. Findo a transferência do volume de água destilada, passou-se para a etapa da destilação. Para isto, primeiro realizou-se uma lavagem no destilador (Foss Kjeltec 2100; Figura 7 b), com um tubo Kjeldahl com 100 mL de água destilada. Depois de realizada a lavagem, as amostras foram então destiladas, em condições alcalinas, por adição de 10 x 10mL de NaOH a 40% (Labkem), sendo o destilado recolhido em 30 mL de ácido bórico (4%; Fluka™), contendo verde de bromocresol e vermelho de metilo a 1%. Finda a destilação, passou-se à etapa da titulação (Figura 7 c).

A bureta de 20 mL foi preenchida com a solução titulante, ou seja, uma solução padrão de HCl (0,1 mol/L; Fluka™). A amostra destilada, que apresenta uma cor verde, foi titulada até atingir o ponto de viragem, que apresenta uma cor acinzentada.

O teor de proteína foi expresso em % e foi calculado por aplicação da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{(\text{HCl amostra} - \text{HCl branco}) \times 6.25 \times 0,014 \times [\text{HCl}]}{\text{massa da amostra}(g)} \times 100 \quad (16)$$

Sendo que,

HCl amostra= Volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL)

HCl branco= Média dos volumes de HCl gastos na titulação dos brancos (mL)

[HCl]= concentração do ácido clorídrico em mol/L



Figura 7: Equipamentos e material utilizados para determinação da proteína: a) tubos Kjeldahl, b) destilador Foss Kjeltec 2100 e c) material para titulação.

2.7 Análise estatística

Todos os dados foram representados como média \pm DP e testados para diferenças significativas. Para testar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente, foi utilizada uma análise de variância unidirecional (ANOVA), com cada dieta como fator, sendo que, cada vez que este teste demonstrava significância, utilizou-se o teste de Tukey, para realizar comparações múltiplas. Se as premissas da ANOVA fossem rejeitadas, efetuava-se um teste não - paramétrico (Kruskal-Wallis). A significância estatística utilizada para todos os testes estatísticos foi de $p < 0,05$. Foi utilizado o software SPSS (versão 27, IBM, Armonk, Nova York, NY, EUA).

3. Resultados

3.1 Performance de crescimento

Os resultados da performance do crescimento das douradas estão representados na Tabela 4. Quando suplementados com Resíduo 1%, houve uma aparente tendência

para terem ganho mais peso (WG), comparativamente com a dieta CTRL, tendo-se observado o mesmo para o índice de crescimento diário (DGI), para a taxa de crescimento sustentável (SGR) e para a taxa de conversão alimentar (FCR). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre dietas ($p > 0,05$).

Tabela 4: Parâmetros de crescimento das douradas alimentadas com diferentes dietas, durante 44 dias (média \pm DP, n=9). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas identificadas ($p > 0,05$).

Dietas	CTRL	Pel 1%	Pel 5%	Pel 10%	Resíduo 1%	Resíduo 10%
Crescimento						
WG (g)	17,3 \pm 1,4	18,8 \pm 3,5	18,4 \pm 2,8	17,3 \pm 1,0	22,3 \pm 2,1	17,7 \pm 1,7
DGI (%)	1,5 \pm 0,05	1,6 \pm 0,22	1,6 \pm 0,24	1,5 \pm 0,06	1,8 \pm 0,14	1,5 \pm 0,14
SGR (peso corporal dia⁻¹)	0,7 \pm 0,01	0,7 \pm 0,08	0,7 \pm 0,11	0,7 \pm 0,02	0,8 \pm 0,05	0,7 \pm 0,06
FCR	0,5 \pm 0,01	0,6 \pm 0,05	0,5 \pm 0,06	0,6 \pm 0,01	0,6 \pm 0,03	0,6 \pm 0,03
VFI (% peso corporal dia⁻¹)	2,26 \pm 0,16	2,05 \pm 0,19	2,09 \pm 0,08	2,17 \pm 0,09	2,16 \pm 0,13	2,18 \pm 0,02
Índices somáticos						
VSI (%)	8,5 \pm 0,92	8,7 \pm 1,62	9,4 \pm 3,55	8,3 \pm 1,38	7,8 \pm 0,54	8,7 \pm 0,59
HSI (%)	1,3 \pm 0,14	1,2 \pm 0,21	1,2 \pm 0,51	0,9 \pm 0,26	1,2 \pm 0,36	1,2 \pm 0,08

Nota. Peso ganho (WG, g), índice de crescimento diário (DGI, %), taxa de crescimento específico (SGR, peso corporal dia⁻¹), taxa de conversão alimentar (FCR), índice de consumo voluntário (VFI, % peso corporal dia⁻¹), índice visceral (VSI, %) e índice hepatossomático (HSI, %). CTRL – controlo de alimentação; Pel 1% - 1% pó de algas; Pel 5% - 5% pó de algas, Pel 10% - 10% pó de algas; Resíduo 1% - 1% alga residual; Resíduo 10% - 10% alga residual.

3.2 Parâmetros hematológicos

O perfil hematológico das douradas alimentadas com dietas experimentais, durante 44 dias, está representado na Tabela 5. Para a contagem dos leucócitos, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as dietas CTRL e Pel 1% e as dietas Pel 10% e Resíduo 1%, sendo que os valores mais elevados foram obtidos nas dietas CTRL, Pel 1% e 5%. Para as restantes análises não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). O valor dos eritrócitos foi significativamente maior em peixes alimentados com Pel 1% e menor com Pel 5%. Relativamente ao hematócrito e à hemoglobina, estes apresentaram o valor mais baixo na dieta Pel 10%. Os valores para MCH e MCHC foram superiores na dieta CTRL, apresentando os mais inferiores nas dietas Pel 1% e Resíduo 10%, respetivamente. Por último, MVC demonstrou um número mais elevado em Resíduo 1% e menor na Pel 1%.

Tabela 5: Resultados hematológicos de douradas alimentadas com diferentes dietas, durante 44 dias (média \pm DP, n=9). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).

Parâmetros	CTRL	Pel 1%	Pel 5%	Pel 10%	Resíduo 1%	Resíduo 10%
WBC ($\times 10^4$ μL^{-1})	9,5 \pm 2,1 ^a	8,2 \pm 1,9 ^{ab}	9 \pm 1,6 ^a	6,8 \pm 1,3 ^b	6,9 \pm 1,8 ^b	7,5 \pm 1,9 ^{gab}
RBC ($\times 10^4$ μL^{-1})	2,6 \pm 0,4	2,7 \pm 0,7	2,2 \pm 0,4	2,2 \pm 0,6	2,4 \pm 0,5	2,5 \pm 0,8
Ht (%)	29,6 \pm 5,2	26,0 \pm 3,9	27,1 \pm 4,9	25,5 \pm 6,1	33,2 \pm 6,7	29,1 \pm 3,5
Hb (g dL^{-1})	1,4 \pm 0,4	1,1 \pm 0,2	1,08 \pm 0,27	1,0 \pm 0,2	1,3 \pm 0,3	1,0 \pm 0,4
MCV (μm^3)	104,1 \pm 47	101 \pm 26	128 \pm 22	118 \pm 26	137 \pm 31	121 \pm 24
MCH (pg cel^{-1})	5,6 \pm 2,3	4,2 \pm 1,4	5,1 \pm 1,5	4,8 \pm 1,2	5,1 \pm 0,8	4,3 \pm 1,8
MCHC (g 100 ml^{-1})	4,4 \pm 0,9	4,1 \pm 0,8	3,9 \pm 0,6	4,2 \pm 0,7	3,8 \pm 0,8	3,5 \pm 1,0

Nota. WBC: glóbulos brancos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$); RBC: glóbulos vermelhos ($\times 10^4 \mu\text{L}^{-1}$); Ht: hematócrito (%); Hb: hemoglobina (g dL^{-1}); MCV: volume corpuscular médio (μm^3); MCH: hemoglobina corpuscular média (pg cel^{-1}), MCHC: concentração média de hemoglobina

corpúscular (g 100 ml⁻¹). CTRL – controlo de alimentação; Pel 1% - 1% pó de algas; Pel 5% - 5% pó de algas, Pel 10% - 10% pó de algas; Resíduo 1% - 1% alga residual; Resíduo 10% - 10% alga residual.

3.3 Parâmetro imunológico

O único parâmetro imunológico quantificado, nas douradas alimentadas com as diferentes dietas, está representado na figura 8. Nos resultados obtidos não se registaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Os valores registados foram superiores nas dietas Pel 1%, Resíduo 1% e Pel 5% (ordem decrescente).

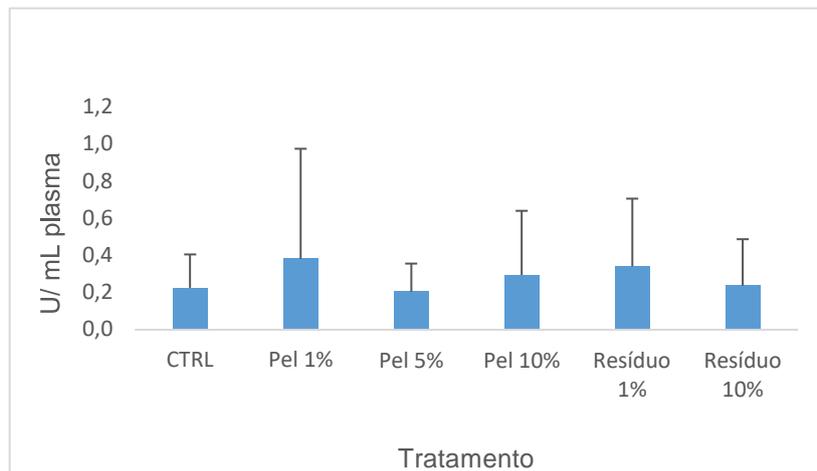


Figura 8: Atividade da peroxidase em douradas alimentadas com dietas diferentes por 44 dias (média \pm DP, n=9). CTRL – controlo de alimentação; Pel 1% - 1% pó de algas; Pel 5% - 5% pó de algas, Pel 10% - 10% pó de algas; Resíduo 1% - 1% alga residual; Resíduo 10% - 10% alga residual. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

3.4 Parâmetros de *stress* oxidativo

Os resultados dos parâmetros de *stress* oxidativo das douradas alimentadas com as diferentes dietas estão representados na Figura 9. Os valores obtidos para a peroxidação lipídica foram semelhantes em todas as dietas, sendo que o maior valor foi observado nas douradas alimentadas com Pel 5%. Ambas as análises para a catalase e superóxido dismutase apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Relativamente à CAT, esta apresentou um menor valor na dieta Pel 1%, seguida do Resíduo 1%, e superior na dieta Pel 10%, sendo que as diferenças foram observadas entre Pel 1% e Resíduo 1% e Pel 10%, correspondendo aos valores mais alto e baixo, respetivamente. Quanto ao teor da superóxido dismutase obteve-se uma menor atividade nas dietas Pel 5%, 10% e Resíduo 1%, sendo que o valor mais elevado foi registado nas douradas alimentadas na dieta Pel 1%. Ainda para o SOD, as diferenças registadas foram entre as dietas CTRL, Pel 1% e Resíduo 10% e Pel 5 e 10% e Resíduo 1%.

A atividade da glutathione (GST) apresentou valores semelhantes entre as dietas Pel 1% e Resíduo 10%, tendo apresentado o valor mais baixo nos indivíduos alimentados com a dieta CTRL. Por último, a glutathione total, a dieta Pel 1% apresentou o menor valor, tendo as dietas Pel 10% e Resíduo 1% obtido valores, não só semelhantes, como também superiores.

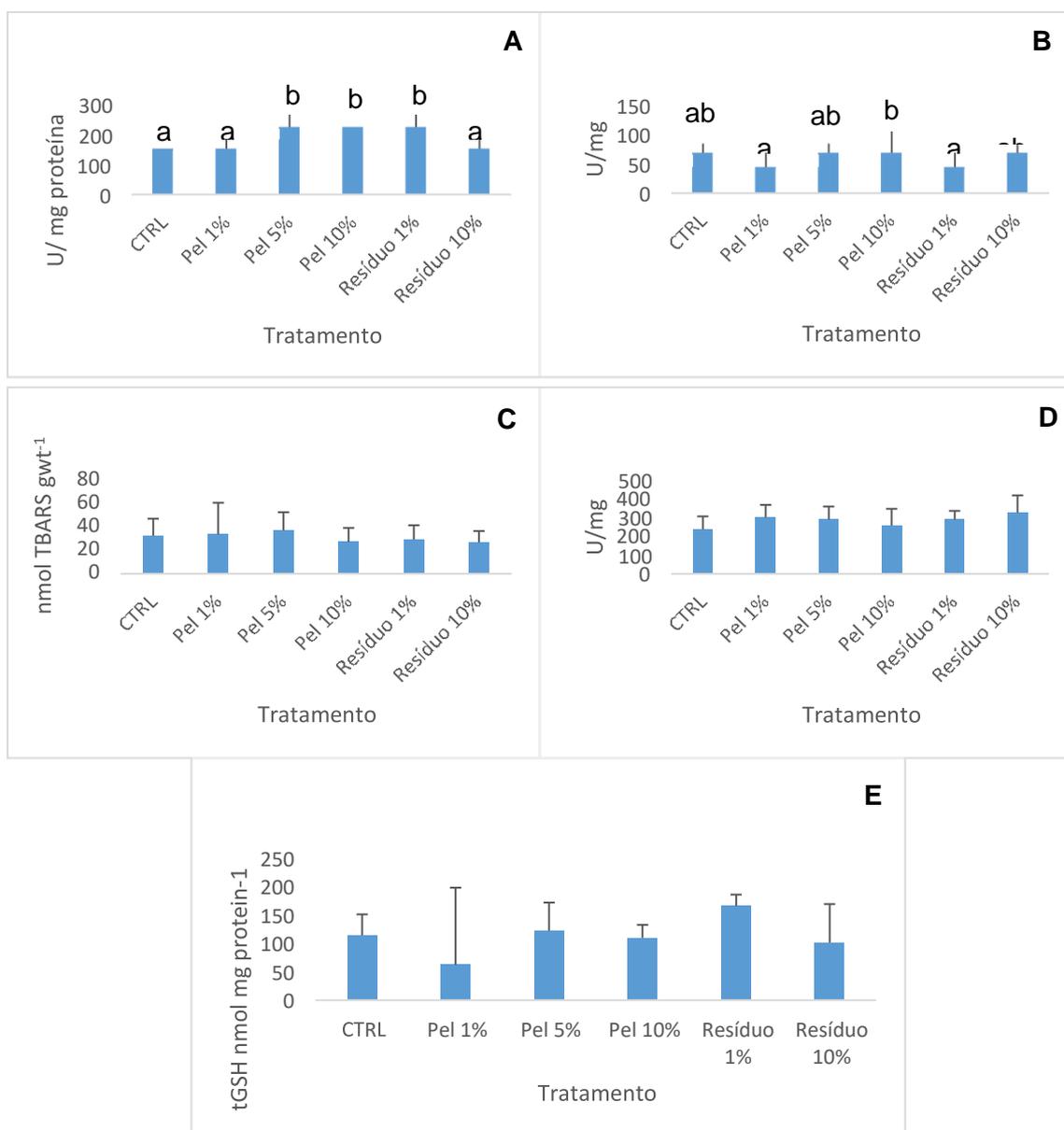


Figura 9: Parâmetros de stress oxidativo em douradas alimentadas com dietas diferentes por 44 dias (média \pm DP, n=9). A - SOD (superóxido dismutase); B – CAT (catalase); C – LPO (- peroxidação lipídica); D – GST (glutaciona-S-transferase) e E – Tg (glutaciona total). CTRL – controlo de alimentação; Pel 1% - 1% pó de algas; Pel 5% - 5% pó de algas, Pel 10% - 10% pó de algas; Resíduo 1% - 1% alga residual; Resíduo 10% - 10% alga residual. Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).

3.5 Parâmetros metabólicos

Os parâmetros metabólicos das douradas alimentadas com as diferentes dietas estão representados na Tabela 6. De todas as análises, só a glucose e a alaninaminotransferase é que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). O colesterol apresentou o maior valor nas douradas alimentadas com Resíduo 10%, seguida da dieta Pel 1%. Relativamente às diferenças apresentadas nesta análise, estas demonstraram ser entre as dietas CTRL e Pel 5% e Pel 1% e entre Resíduo 10% e todas as restantes, à exceção da Pel 1%. Para a glucose, todas as dietas apresentaram valores menores que CTRL. Contrariamente, para os lípidos totais as dietas obtiveram valores superiores a CTRL, sendo que Pel 5% e 10% e o Resíduo 1% apresentaram valores semelhantes. Ainda nesta análise, observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a dieta CTRL e as dietas Resíduo 1 e 10%, tendo esta última apresentado diferenças entre os outros tratamentos, à exceção de Resíduo 1%.

Relativamente aos triglicéridos, as dietas Pel 5% e 10% e Resíduo 1% demonstraram resultados elevados, comparando com o controlo, sendo que a Pel 1% apresentou o valor mais baixo. As dietas CTRL, Pel 1% e Resíduo 10% apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as dietas Pel 5% e Resíduo 10%, enquanto Pel 10% apenas apresentou diferenças entre Pel 5%. Para a alaninaminotransferase, os valores foram bastante variados, sendo o mais elevado pertencente à dieta Pel 1% e o menor à Pel 10%.

Por último, a aspartato aminotransferase apresentou o maior valor no Resíduo 10%, seguido do controlo. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as dietas Pel 10% e Resíduo 10%.

Tabela 6: Resultados metabólicos de douradas alimentadas com diferentes dietas, durante 44 dias (média \pm DP, n=9). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$)

Parâmetros	CTRL	Pel 1%	Pel 5%	Pel 10%	Resíduo 1%	Resíduo 10%
Colesterol	140 ± 30 ^a	180 ± 33 ^{bc}	129 ± 27 ^a	135 ± 38 ^{ab}	150 ± 29 ^{ab}	196 ± 41 ^{ac}
Glucose	78 ± 25	56 ± 12	57 ± 15	62 ± 17	70 ± 16	67 ± 15
Lípidos totais	846 ± 192 ^a	1045 ± 157 ^{ab}	1170 ± 277 ^{ab}	1130 ± 365 ^{ab}	1197 ± 191 ^{bc}	1374 ± 219 ^c
Triglicéridos	74 ± 13 ^a	73 ± 19 ^a	218 ± 77 ^c	109 ± 33 ^{ab}	143 ± 23 ^b	81 ± 24 ^a
ALT	55 ± 73	93 ± 134	27 ± 51	4,8 ± 1,7	7,0 ± 4,8	48 ± 45
AST	94 ± 109 ^{ab}	52 ± 67 ^{ab}	28 ± 34 ^{ab}	7,6 ± 8,6 ^b	23 ± 20 ^{ab}	117 ± 116 ^a

Nota. ALT – alaninaminotransferase e AST - aspartato aminotransferase. CTRL – controlo de alimentação; Pel 1% - 1% pó de algas; Pel 5% -5% pó de algas, Pel 10% - 10% pó de algas; Resíduo 1% - 1% alga residual; Resíduo 10% - 10% alga residual.

3.6 Perfil nutricional do músculo

Na tabela 7 estão representados os resultados da análise nutricional, expressos em % de peso fresco. Para o teor de água e lípidos, os maiores valores foram observados na dieta CTRL. Relativamente às cinzas, o valor superior foi observado para a dieta de Pel 5% e o menor para Resíduo 10%. Contrariamente, para a proteína o resultado mais elevado demonstrou ser na Pel 5%.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em todos os parâmetros. No teor de água, as diferenças apresentadas foram entre as dietas Pel 5% e todas as outras e entre Pel 10% e Resíduo 1%. Para as cinzas, mais uma vez a dieta Pel 5% apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) com as restantes dietas e, também, entre Pel 10% e Resíduo 10% houve diferenças.

No que respeita à proteína, as diferenças observadas foram entre as dietas CTRL, Pel 1% e Resíduo 10% e Pel 5% e 10%. Também entre CTRL e Resíduo 1% se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Por último, os lípidos, houve diferenças entre CTRL e Resíduo 1% e 10% e Pel 5% e entre Resíduo 1% e 10% e Pel 10%.

Tabela 7: Resultados do perfil nutricional do músculo de douradas alimentadas com diferentes dietas, durante 44 dias (média ± DP, n=6). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).

Parâmetros (%)	CTRL	Pel 1%	Pel 5%	Pel 10%	Resíduo 1%	Resíduo 10%
Teor de água	70,6 ± 1,1 ^a	71,4 ± 1,4 ^a	71,2 ± 0,3 ^b	73,3 ± 1,7 ^{ab}	71,4 ± 1,2 ^c	73,5 ± 0,3 ^a
Cinzas	5,3 ± 0,2 ^a	5,3 ± 0,4 ^{ab}	5,8 ± 0,2 ^b	5,7 ± 0,3 ^{ab}	5,4 ± 0,3 ^{ab}	5,3 ± 0,1 ^a
Proteína	18,4 ± 0,7 ^a	18,8 ± 0,6 ^{ac}	19,2 ± 0,4 ^b	19,2 ± 0,8 ^b	19,9 ± 0,5 ^{bc}	19 ± 0,4 ^{ac}
Lípidos	7,9 ± 1,3 ^a	7,9 ± 1,6 ^{ab}	7,4 ± 0,4 ^b	7,4 ± 1,3 ^{ab}	7,3 ± 1,1 ^c	7,6 ± 0,8 ^c

Nota. CTRL – controlo de alimentação; Pel 1% - 1% pó de algas; Pel 5% - 5% pó de algas, Pel 10% - 10% pó de algas; Resíduo 1% - 1% alga residual; Resíduo 10% - 10% alga residual.

Na tabela 8 estão apresentados os ácidos gordos presentes nas douradas, alimentadas com as diferentes dietas experimentais.

Os ácidos gordos (AG) C14:0, C18:1 n-7, C24:1 n-9 e C20:5 n-3 (EPA) apresentaram valores superiores na dieta Pel 10%. O C15:0 obteve valores semelhantes para todas as dietas. Em relação aos AG C16:0, C18:0 e C18:2 n-6, os valores mais elevados foram obtidos na dieta Resíduo 1% e para os C17:0, C21:0, C16:1 n-7, C18:3 n-6, C20:2 n-6, C20:3 n-6, C20:4 n-6 e C22:6 n-3 (DHA) na dieta Pel 5%. Na dieta CTRL, os ácidos gordos que apresentaram valores superiores foram os C20:1 n-9 e C20:1 n-11, enquanto na Pel 1% foram os trans C18:1 n-9, C18:3 n-3 (ALA) e C18:4 n-3. Por último, para a dieta Resíduo 10% os valores mais altos obtidos foram para C18:1 n-9, C18:1 n-11 e C22:5 n-3.

No entanto o C15:0, C16:0, C21:0, *trans* C18:1 n-9 e C18:4 n-3 apresentaram valores menores na dieta Pel 10%. Os ácidos gordos C14:0, C16:1 n-7, C18:1 n-7, C20:1 n-9, C20:1 n-11, C24:1 n-9, C18:4 n-3 e C22:6 n-3 (DHA) foram menos abundantes na dieta Resíduo 1%, enquanto o C18:1 n-11 na dieta Pel 5%. No que diz respeito aos *trans*

C18:1 n-9, C18:4 n-3, C20:3 n-6 e C20:5 n-3 (EPA), apresentaram menor quantidade na dieta CTRL e os C18:1 n-9 e C22:5 n-3 na dieta Pel 1%. Por fim, na dieta Resíduo 10% os ácidos gordos que apresentaram valores mais inferiores foram os C17:0, C18:0, *trans* C18:1 n-9, C18:2 n-6, C18:3 n-6, C18:3 n-3 (ALA), C18:4 n-3, C20:2 n-6, C20:3 n-6 e C20:4 n-6

Os AG C21:0, C16:1 n-7, *trans* C18:1 n-9, C18:1 n-9, C20:1 n-9, C20:1 n-11, C18:2 n-6, C18:4 n-3, C20:5 n-3 (EPA), C22:5 n-3 e C22:6 n-3 (DHA) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). No entanto, no ácido palmítico (C16:0) foram observadas diferenças entre as dietas Resíduo 10% e Pel 1% e Resíduo 1%; no ácido γ -linolênico (C18:3 n-6) também se observaram diferenças entre Resíduo 10% e Pel 1% e 5%. Relativamente ao ácido α -linolênico (C18:3 n-3), a dieta Resíduo 10% apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) com todas as outras. Para o ácido 11,14-eicosadienóico (C20:2 n-6), as diferenças apresentadas foram entre as dietas Pel 5% e Resíduo 10%, para o C20:3 n-6 entre CTRL e Resíduo 10% e Pel 5% e 10% e, por último, ácido araquidónico (C20:4 n-6), as dietas Pel 5% e 10% apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) com as restantes outras.

Tabela 8: Ácidos gordos presentes nas douradas alimentadas com diferentes dietas, durante 44 dias (média \pm DP, n=6). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).

Parâmetros	CTRL	Pel 1%	Pel 5%	Pel 10%	Resíduo 1%	Resíduo 10%
C14:0	3,1 \pm 0,1 ^{ab}	3,1 \pm 0,1 ^{ab}	3,2 \pm 0,1 ^b	3,2 \pm 0,1 ^a	3,0 \pm 0,1 ^b	3,1 \pm 0,0 ^{ab}
C15:0	0,3 \pm 0,0 ^{ab}	0,3 \pm 0,0 ^a	0,3 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,1 ^{ab}	0,2 \pm 0,0 ^b	0,3 \pm 0,0 ^a
C16:0	16,3 \pm 0,4 ^{ab}	16,6 \pm 0,7 ^a	16,0 \pm 0,5 ^{ab}	16,0 \pm 0,6 ^{ab}	16,7 \pm 0,3 ^a	15,4 \pm 0,4 ^b
C17:0	0,3 \pm 0,1 ^a	0,2 \pm 0,0 ^a	0,4 \pm 0,0 ^b	0,2 \pm 0,0 ^a	0,2 \pm 0,1 ^a	0,2 \pm 0,0 ^a
C18:0	4,4 \pm 0,2 ^{ab}	4,4 \pm 0,2 ^{ab}	4,3 \pm 0,1 ^{ab}	4,3 \pm 0,1 ^a	4,6 \pm 0,1 ^b	3,9 \pm 0,1 ^c
C21:0	0,3 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1	0,34 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0	0,4 \pm 0,1
C16:1 n-7	5,1 \pm 0,1	5,2 \pm 0,1	5,2 \pm 0,1	5,1 \pm 0,2	5,1 \pm 0,1	5,2 \pm 0,1

trans C18:1 n-9	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0
C18:1 n-9	23,5 ± 0,7	23,1 ± 0,8	24,1 ± 1,8	23,5 ± 2,2	25,3 ± 1,6	35,4 ± 0,3
C18:1 n-7	3,5 ± 0,1 ^a	3,5 ± 0,2 ^a	3,4 ± 0,0 ^a	3,7 ± 0,1 ^a	2,7 ± 0,2 ^b	na
C18:1 n-11	0,7 ± 0,0 ^a	0,6 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,0 ^b	0,6 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^b	0,7 ± 0,0 ^a
C20:1 n-9	0,9 ± 0,10	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,0
C20:1 n-11	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,1
C24:1 n-9	0,6 ± 0,1 ^{ab}	0,6 ± 0,1 ^{ab}	0,6 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,0 ^b	0,5 ± 0,1 ^{ab}
C18:2 n-6	22,6 ± 0,4	23,0 ± 0,7	23,3 ± 0,9	23,3 ± 0,7	23,7 ± 0,7	16,7 ± 0,3
C18:3 n-6	0,4 ± 0,1 ^{ab}	0,4 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^{ab}	0,5 ± 0,1 ^{ab}	0,3 ± 0,0 ^b
C18:3 n-3 (ALA)	2,5 ± 0,0 ^a	2,5 ± 0,1 ^a	2,5 ± 0,1 ^a	2,5 ± 0,1 ^a	2,5 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,1 ^b
C18:4 n-3	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,18 ± 0,02	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
C20:2 n-6	0,4 ± 0,1 ^{ab}	0,4 ± 0,1 ^{ab}	0,4 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,0 ^{ab}	0,4 ± 0,0 ^{ab}	0,3 ± 0,0 ^b
C20:3 n-6	0,3 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^{ab}	0,4 ± 0,1 ^b	0,4 ± 0,0 ^b	0,4 ± 0,0 ^{ab}	0,3 ± 0,0 ^a
C20:4 n-6	0,6 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,1 ^b	0,7 ± 0,1 ^b	0,6 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,0 ^a
C20:5 n-3 (EPA)	5,3 ± 0,2	5,3 ± 0,2	5,4 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5,4 ± 0,1	5,3 ± 0,1
C22:5 n-3	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,0
C22:6 n-3 (DHA)	5,8 ± 0,5	5,7 ± 0,4	6,4 ± 0,3	6,4 ± 0,7	5,5 ± 0,1	5,7 ± 0,2

Nota. CTRL – controlo de alimentação; Pel 1% - 1% pó de algas; Pel 5% - 5% pó de algas, Pel 10% - 10% pó de algas; Resíduo 1% - 1% alga residual; Resíduo 10% - 10% alga residual.

Na tabela 9 estão presentes os valores dos ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA), dos n-3, n-6 e a respetiva relação entre estes (n-6/ n-3), do índice aterogénico (IA), do índice trombogénico (IT) e do índice da razão de ácidos gordos hipocolesterolémicos/ ácidos gordos hipercolesterolémicos (h/H). Estes dois índices são usados regularmente para avaliar os efeitos de biomassa algal em doenças coronárias e o índice h/H mede os efeitos da composição de ácidos gordos no colesterol.

De todos os parâmetros, à exceção dos ácidos gordos monoinsaturados, os menores valores foram registados para a dieta Resíduo 10%. Relativamente aos mais elevados, para os ácidos gordos saturados e n-6/n-3, foram registados na dieta Resíduo 1%, para os ácidos gordos monoinsaturados na dieta Resíduo 10%, para os ácidos gordos

polinsaturados e n-3 nas dietas Pel 5% e 10% e para n-6 nas dietas Pel 5% e 10% e Resíduo 1%. Na relação entre n-6/ n-3, o valor superior foi registado na dieta Resíduo 1% e o menor na Resíduo 10%. Os índices aterogénico e trombogénico apresentaram valores semelhantes entre todas as dietas experimentais.

De todos os parâmetros, o índice trombogénico foi o único a não apresentar diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Em relação aos SFA, a dieta Resíduo 10% apresentou diferenças entre todas as outras, à exceção da Pel 10%. Nos ácidos gordos monoinsaturados, houve diferenças entre a dieta CTRL e a Pel 5% e Resíduo 1% e 10% e entre Resíduo 10% e Pel 1%, 5% e 10% e Resíduo 1%. Para os ácidos gordos polinsaturados, n-6, n-6/ n-3 e o índice da razão de ácidos gordos hipocolesterolémicos/ ácidos gordos hipercolesterolémicos as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram para as mesmas dietas, ou seja, entre a dieta Resíduo 10% e as restantes. Para o n-3 observaram-se diferenças entre Resíduo 10% e Pel 5% e 10%. Por último, o índice aterogénico apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as dietas Resíduo 10% e Pel 1% e Resíduo 1%.

Tabela 9: Ácidos gordos presentes nas douradas alimentadas com diferentes dietas, durante 44 dias (média \pm DP, n=6). Diferenças estatisticamente significativas identificadas com letras diferentes ($p < 0,05$).

Parâmetros	Controlo	Pel 1%	Pel 5%	Pel 10%	Resíduo 1%	Resíduo 10%
SFA	24,7 \pm 0,5 ^a	24,8 \pm 0,8 ^a	24,5 \pm 0,6 ^a	24,2 \pm 0,6 ^{ab}	25,2 \pm 0,3 ^a	23,3 \pm 0,4 ^b
MUFA	35,3 \pm 0,6 ^a	34,8 \pm 0,6 ^{ab}	33,8 \pm 0,9 ^b	34,1 \pm 0,8 ^{ab}	33,9 \pm 0,8 ^b	43,3 \pm 0,3 ^c
PUFA	39,9 \pm 0,8 ^a	40,3 \pm 1,3 ^a	41,6 \pm 0,9 ^a	41,7 \pm 1,3 ^a	40,9 \pm 1,0 ^a	33,4 \pm 0,6 ^b
n-3	15,6 \pm 0,7 ^{ab}	15,6 \pm 0,6 ^{ab}	16,3 \pm 0,5 ^a	16,5 \pm 0,9 ^a	15,5 \pm 0,3 ^{ab}	15,1 \pm 0,3 ^b
n-6	24,3 \pm 0,4 ^a	24,7 \pm 0,9 ^a	25,3 \pm 0,8 ^a	25,2 \pm 0,7 ^a	25,4 \pm 0,8 ^a	18,3 \pm 0,4 ^b
n-6/n-3	1,5 \pm 0,1 ^a	1,6 \pm 0,1 ^a	1,5 \pm 0,1 ^a	1,5 \pm 0,1 ^a	1,6 \pm 0,0 ^a	1,2 \pm 0,0 ^b

h / H	3,2 ± 0,1 ^a	3,2 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,1 ^a	3,2 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,1 ^b
AI	0,4 ± 0,0 ^{ab}	0,4 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^{ab}	0,4 ± 0,0 ^{ab}	0,4 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^b
TI	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0

Nota. SFA – ácidos gordos saturados, MUFA – ácidos gordos monoinsaturados, PUFA – ácidos gordos polinsaturados, h/H - razão de ácidos gordos hipocolesterolémicos/ ácidos gordos hipercolesterolémicos IA - índice aterogénico e IT - índice trombogénico. CTRL – controlo de alimentação; Pel 1% - 1% pó de algas; Pel 5% - 5% pó de algas, Pel 10% - 10% pó de algas; Resíduo 1% - 1% alga residual; Resíduo 10% - 10% alga residual.

4. Discussão

Muitas espécies de algas marinhas são normalmente utilizadas na forma não processada, principalmente na medicina, dietas humanas, rações para animais e para melhorias no solo agrícola, como fertilizantes (Mišurcová *et al.*, 2011; Hamed *et al.*, 2018; Øverland *et al.*, 2019; Ismail *et al.*, 2020; Morais *et al.*, 2020). Em geral, aceita-se que as algas verdes e vermelhas possuem um maior valor nutricional do que as algas castanhas, devido ao seu baixo teor de proteína e alto teor de minerais (Misurcova, 2011). No entanto, estas últimas possuem um conteúdo superior e mais diversificado de moléculas bioativas com alto interesse comercial (Morais *et al.*, 2020). Atualmente, são diversos os estudos já realizados sobre a utilização de algas como suplementação na alimentação animal, ou mesmo na substituição da farinha de peixe utilizada na aquacultura (Guerreiro *et al.*, 2019; Gomes, 2020; Passos *et al.*, 2021; Pires *et al.*, 2022). O crescimento sustentável da aquacultura depende, em grande parte, do uso de novas fontes de nutrientes, de forma a substituir parcialmente a farinha de peixe, sem comprometer o crescimento dos mesmos, a sua saúde e o valor nutricional dos produtos finais (Batista *et al.*, 2020). Os óleos vegetais são amplamente utilizados pelos consumidores, nomeadamente na fritura, uma forma eficaz de cozedura, que consiste na imersão dos alimentos em gorduras ou óleos alimentares (Aladedunye, 2014). Do ponto de vista químico, a fritura é um processo complexo, englobando inúmeras reações, tal como oxidação, hidrólise, polimerização e isomerização (Nayak *et al.*, 2016). Contudo, a vida útil limitada dos óleos alimentares, sob repetidos ciclos de fritura, dá origem a preocupações ambientais, uma vez que apenas uma pequena fração é reciclada. Por outro lado, também a estabilidade oxidativa limitada destes é um dos

principais problemas para a indústria alimentar, porque leva à perda de valor nutricional, diminuição da validade e desenvolvimento de sabores menos desejáveis (Sousa *et al.*, 2021), estando a resistência dos óleos à oxidação associada à sua composição de ácidos gordos, teor de antioxidantes e condições de processamento, armazenamento e manuseio (Sousa *et al.*, 2021). Assim, o uso de antioxidantes que prolongam a validade dos óleos trará efeitos positivos na saúde e na economia (Aladedunye, 2014; Márquez-Ruiz, 2014). No entanto, o uso de antioxidantes sintéticos, como 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), 2,3-terc-butyl-4-hidroxianisol (BHA) e Tert-butyl-hydroquinone (TBHQ), apresenta efeitos limitados na fritura, devido à sua alta volatilidade e instabilidade em temperaturas elevadas (Márquez-Ruiz, 2014). Por isso, a suplementação dos óleos com antioxidantes naturais, provenientes de algas marinhas neste caso, tem sido cada vez mais popular.

O presente estudo mostra claramente que a biomassa de *P. canaliculata*, pode ser um ingrediente valioso, utilizada de maneira a substituir certa parte das farinhas de peixe, nas dietas de douradas, sem afetar o crescimento dos peixes. Neste estudo, as douradas juvenis foram alimentadas durante 44 dias, com diferentes dietas suplementadas com *P. canaliculata* liofilizada e com o resíduo, resultante da sua incorporação em óleo de girassol. Apesar de em todas as dietas ter sido observado um crescimento dos peixes, foi perceptível que com a dieta Resíduo 1% foi obtido um maior ganho de peso, o que pode ser explicado através da maior quantidade de hidratos de carbono presentes nesta. Assim, estes resultados sugerem que as dietas suplementadas com a alga não comprometem o aumento da taxa de crescimento. Também de acordo com o estudo de Gomes (2020), a suplementação da dieta de *S. aurata* com *Gracilaria gracilis* não apresentou efeitos negativos, pelo contrário, teve um efeito benéfico no crescimento das douradas, tal como em Valente *et al.* (2021) e Passos *et al.* (2021). Para além disso, foi possível verificar que a inclusão de algas na ração não afetou o desempenho de crescimento, utilização de ração e índices somáticos, nem a palatibilidade, conforme verificado pelo VFI, o que significa que a inclusão de extratos nas dietas é bem aceite pelos peixes (Passos *et al.*, 2021). Isto também é demonstrado no estudo de Guerreiro *et al.* (2019), onde a ração é suplementada com as algas *Chondrus crispus* e *Ulva lactuca*.

Os estudos dos parâmetros hematológicos já remontam a 1943 (Field *et al.*, 1943). Estes são comumente utilizados como uma ferramenta valiosa para avaliar o estado de saúde, resposta fisiológica e alterações patológicas em peixes (Jain, 1993; Banaee *et*

al., 2008; Sotoudeh & Jafari, 2017). Contudo, é difícil interpretar os parâmetros sanguíneos devido a variações causadas por fatores internos e externos, como o gênero, tamanho, densidade de *stock* e efeitos ambientais (Fazio, 2019). Os parâmetros hematológicos em peixes incluem contagem de leucócitos, eritrócitos, determinação do hematócrito, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH) e concentração média de hemoglobina corpuscular (MCHC). Segundo Fazio *et al.* (2015), os WBC, ou seja, as células de defesa do organismo, são considerados um parâmetro importante para avaliar o estado de saúde dos peixes, sendo que a sua concentração no sangue tem implicações na resposta imune e na capacidade do animal de combater a infecção. Além disso, esta concentração depende de vários fatores, como temperatura da água, stress ambiental, idade e sexo dos peixes. Neste estudo, os peixes dos tratamentos Pel 10% e Resíduo 1% apresentaram os menores valores destas células, quando comparadas com as outras dietas, sendo que não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre estas duas. Os níveis mais elevados de leucócitos permitem que os peixes consigam combater uma infecção de forma mais eficaz que outros, sugerindo assim que, para além do CTRL, a dieta Pel 5% proporcionará uma resposta imunológica mais eficiente. De acordo com Fazio *et al.* (2015), os parâmetros hematológicos estão intimamente ligados ao nível metabólico, sendo que isto pode ser atribuído à maior atividade metabólica e alta demanda energética durante o crescimento. Assim, este aumento da atividade metabólica durante o desenvolvimento de *S. aurata*, pode justificar o aumento do volume de eritrócitos, levando a um conseqüente aumento do valor de hematócrito (Fazio *et al.*, 2015). Neste estudo, foi possível confirmar esta afirmação de Fazio *et al.* (2015), pois a dieta Resíduo 1% apresentou o valor mais elevado de volume corpuscular médio (MVC), bem como o valor maior de hematócrito. A existência de uma relação entre o aumento do tamanho dos peixes e o aumento dos valores de eritrócitos (RBC), hematócrito e hemoglobina (Hb) (Jawad *et al.*, 2004), justifica o valor superior do Ht para a dieta Resíduo 1%. Porém, neste estudo não houve nenhuma correlação entre o tamanho do peixe e RBC e Hb, visto que os valores mais elevados destes dois últimos parâmetros foram observados no CTRL. No estudo de Passos *et al.* (2021), foi verificado isto mesmo, ou seja, que há um padrão de influência hematológica, relacionada à inclusão de algas em pó.

A atividade da peroxidase, um dos biomarcadores plasmáticos, é utilizada para avaliar mecanismos de defesa imune inata e não específica, em peixes (Li *et al.*, 2021). Esta é uma enzima importante que atua como agente microbicida, ao eliminar o peróxido de hidrogénio e manter o balanço *redox* das células e sistemas imunes (Guardiola *et al.*, 2018). De acordo com Alvarez-Pellitero (2008), a enzima é libertada dos grânulos citoplásmicos dos fagócitos, participando na resposta oxidativa contra patógenos. No estudo de Valente *et al.* (2021), onde houve a suplementação da ração de *D. labrax* com *Gracilaria* sp., este parâmetro não foi afetado por esta inclusão na dieta, tendo o mesmo acontecido em Batista *et al.* (2020). Neste estudo, a atividade da peroxidase foi superior ao CTRL, em todas as dietas, sendo que não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), o que pode ser explicado através do facto do provável aumento do número de neutrófilos, visto que noutros estudos realizados, os aumentos nos valores da peroxidase foram associados ao aumento no número de neutrófilos (Costas *et al.*, 2011).

O *stress* oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre os níveis de produção de espécies de oxigénio reativas (ROS) e de antioxidantes, sendo que as ROS deixam de ser removidas adequadamente (Pascual *et al.*, 2003). O comprometimento deste equilíbrio, tem sido relacionado a uma maior suscetibilidade a diferentes *stresses* ambientais ou bióticos e ao desenvolvimento de diferentes tipos de patologia em diferentes espécies (Blier, 2014). O aumento de ROS vai, conseqüentemente, provocar a acumulação de peróxido de hidrogénio que, por sua vez, provoca a peroxidação lipídica (Londero *et al.*, 2021), podendo danificar moléculas e o próprio sistema de defesa antioxidante (Jia *et al.*, 2016). As enzimas antioxidantes, como SOD e CAT, ou moléculas não enzimáticas, tais como o ácido ascórbico e a glutathiona (Gerber *et al.*, 2020), são um mecanismo de defesa contra o desequilíbrio do estado oxidativo e são amplamente utilizadas como índices imunes inespecíficos em peixes (Passos *et al.*, 2021). No presente estudo, a atividade antioxidante apresentou diferentes respostas, sendo que para CAT, houve uma maior atividade nas douradas alimentadas com a dieta Pel 10%, quando comparada com CTRL. Este resultado indica-nos que esta dieta pode, de facto, induzir uma proteção para as douradas contra ROS, através do aumento da sua atividade enzimática (Magnoni *et al.*, 2017). Relativamente a SOD, esta apresentou melhores resultados quando a dieta foi suplementada com Resíduo 1%, Pel 10% e Pel 5%, após a comparação com a dieta CTRL, sendo que estes resultados corroboram os obtidos para a CAT, mais especificamente, tendo sido verificado que a suplementação de *P. canaliculata* aumenta a atividade antioxidante.

No estudo de Peixoto *et al.* (2019), também se verificou um aumento na atividade da CAT, quando a dieta de *Dicentrarchus labrax* foi suplementada com 5% de *Gracilaria* sp., após a infecção com *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*. Contrariamente, no estudo de Magnoni *et al.* (2017) e de Passos *et al.* (2021), a suplementação de *Gracilaria gracilis* na dieta de *S. aurata*, inibiu a atividade destas duas enzimas, quando os peixes foram sujeitos a um fator *stressante* (hipoxia). O mesmo aconteceu no estudo de Valente *et al.* (2021), com a mesma alga, mas para *D. labrax*. A peroxidação lipídica é um efeito adverso provocado pelos radicais livres, sendo estas moléculas altamente instáveis que clivam as ligações de carbono das moléculas lipídicas, extraem hidrogénio e formam radicais peróxil e hidroperóxidos (Sharma *et al.*, 2019; Passos *et al.*, 2021). Neste estudo, não foram verificadas diferenças para a LPO, entre os tratamentos, sugerindo, assim, que as diferentes dietas não causaram desequilíbrios oxidativos (Pires *et al.*, 2022), pelo contrário, induziram uma maior proteção contra possíveis futuros fatores *stressantes*. De acordo com Londero *et al.* (2021), a peroxidação lipídica é originada quando ocorre a formação de ROS, que por sua vez é originada pela inibição de CAT e SOD. Esta afirmação está de acordo com os resultados obtidos neste estudo. A glutathione-s-transferase (GST), produzida no fígado, está envolvida na desintoxicação dos produtos aldeídicos da peroxidação lipídica, sendo que os converte em espécies não tóxicas, por conjugação com a glutathione (Bagnyukova *et al.*, 2006). Neste parâmetro também não foram verificadas diferenças, sendo que os resultados das dietas não diferiram muito dos do controlo, o que está de acordo com os resultados obtidos para o LPO, visto que se se tivessem obtido resultados superiores a CTRL, significaria que estaria a ocorrer uma eliminação dos produtos tóxicos, provenientes da peroxidação lipídica. De acordo com Gerber *et al.* (2020), a glutathione total (tGSH) permite verificar os danos, provenientes do *stress* oxidativo, efetuados ao organismo. Como todos os valores para a tGSH, neste trabalho, foram menores ou semelhantes ao controlo, pode-se admitir que a suplementação de *P. canaliculata* na ração de *S. aurata* não provoca danos aos organismos.

Os níveis de glucose no plasma podem ser utilizados como um indicador de *stress* (Laiz-Carrión *et al.*, 2005). Para além disso, é a principal fonte de energia do sistema nervoso central (Jahan *et al.*, 2019). No presente estudo, os níveis de glucose foram semelhantes em todas as dietas, indicando-nos que as diferentes alimentações não provocaram *stress* aos indivíduos. Tal como em Vizcaíno *et al.* (2016), foi verificada uma relação inversa da concentração de glucose, ao aumentar o nível de macroalgas na dieta (*Ulva* e *Gracilaria* sp, 25%), podendo isto ser uma consequência indireta da

redução dos hidratos de carbono digestíveis, à medida que o nível de incorporação de algas foi aumentado. Também no estudo de Guerreiro *et al.* (2019) os valores de glucose diminuíram com a suplementação de *Chondrus crispus* e *Ulva lactuca*. As dietas Pel 1% e 5% apresentaram os menores valores, sendo que isto pode estar relacionado com o facto desses peixes terem apresentado um maior crescimento, implicando um maior gasto energético e a posterior utilização das reservas de glucose. A diminuição deste monossacarídeo pode também estar relacionada com o menor nível de amido em dietas que contêm algas marinhas (Basto-Silva *et al.*, 2021; Passos *et al.*, 2021). Relativamente ao colesterol, lípidos totais e triglicéridos, estes apresentaram diferenças entre as diferentes dietas, sendo que, por isso, devem ser monitorizados, visto que são marcadores importantes para a saúde (Pires *et al.*, 2022). Os valores superiores foram apresentados nas dietas Resíduo 1% e 10%, sugerindo que podem não ser as melhores para *S. aurata*. No entanto, estes resultados não estão de acordo com o estudo de Vizcaíno *et al.* (2016), onde houve uma diminuição do teor de lípidos plasmáticos, quando a dieta das douradas foi suplementada com *Ulva* e *Gracilaria* sp., em 25%. De acordo com Martino *et al.* (2002), o aumento dos níveis de lípidos na dieta, geralmente, está associado a um aumento do depósito destes nas vísceras. Contudo, no presente estudo, o VSI não foi afetado pelo aumento dos níveis de lípidos na dieta, tal como aconteceu em Du *et al.* (2005). Como mencionado anteriormente, no estudo de Guerreiro *et al.* (2019), não só os valores de glucose diminuíram com a suplementação de algas marinhas, mas também os do colesterol, sendo que o contrário aconteceu para os triglicéridos. No trabalho de Basto-Silva *et al.* (2021), esta molécula apresentou níveis mais baixos, em peixes alimentados com dietas com menor teor de proteína e maior teor de hidratos de carbono, e níveis de colesterol e lípidos totais mais elevados nas douradas alimentadas com farinha de peixe, do que com rações suplementadas. ALT e AST, enzimas específicas do fígado, servem como medidas sensíveis de hepatotoxicidade e alterações histopatológicas, respetivamente (Sheikhzadeh *et al.*, 2012). Visto que no presente estudo houve diferenças na atividade da aspartato aminotransferase, entre as dietas Pel 10% e Resíduo 10%, é proposto que esta última dosagem já seja considerada tóxica, causando o enfraquecimento ou dano da função hepática normal neste grupo (Sheikhzadeh *et al.*, 2012).

Segundo Rasyid *et al.* (2019), o teor de água é um critério importante na determinação da validade de ração de aquacultura, suplementada com algas marinhas, pois se tiver um elevado teor, este pode acelerar o crescimento de microrganismos. No presente estudo, foi verificado que as dietas com suplementação de *P. canaliculata* apresentaram

todas um maior teor de água, sendo que Pel 10% e Resíduo 10% obtiveram os maiores valores, o que está de acordo com a quantidade superior de alga utilizada. O teor de cinza é avaliado para obter uma quantificação de resíduos inorgânicos, ou minerais, numa amostra (Freire, 2022), sendo que a elevada quantia de cinzas em algas marinhas, é causada pela sua capacidade de absorver minerais do ambiente (Li *et al.*, 2018). Neste estudo, tal como para o teor de água, nas dietas suplementadas o conteúdo de cinzas foi superior ao controlo, devido ao elevado conteúdo de minerais presentes nas algas castanhas. No entanto, estes valores não estão de acordo com o estudo de Praiboon *et al.* (2018), onde *S. oligocystum* obteve valores bastantes superiores (21.9 ± 0.3). Estas diferenças podem ser influenciadas pelas condições ambientais, tal como localização geográfica, estação do ano, exposição às ondas, temperatura, salinidade, nível mineral e pH da água do mar (Mišcová *et al.* 2011). Também no trabalho de Dantagnan *et al.* (2009), onde houve a adição da alga *Macrocystis pyrifera* à dieta de *O. mykiss*, tendo-se verificado um aumento significativo da quantidade total de minerais. A proteína, a partir de uma determinada idade, ou fase de desenvolvimento, torna-se um parâmetro bastante fixo (Senso *et al.*, 2007). Martínez & Rico (2002), afirmaram que a acumulação de proteína está associada com o desenvolvimento e maturação de estruturas reprodutivas. Tal como para o teor de água e cinzas, todas as dietas que sofreram a suplementação, apresentaram valores superiores a CTRL. O mesmo se verificou nos estudos de Guerreiro *et al.* (2019), com *C. crispus* e *Ulva lactuca*, e de Dantagnan *et al.* (2009). De entre as importantes funções biológicas que os lípidos desempenham, destacam-se a reserva energética de elevado valor calórico, o transporte de vitaminas lipossolúveis, a formação de membranas celulares e manutenção da sua integridade estrutural e funcional, sinalização intra e intercelular e isolamento térmico e elétrico (Alves, 2014). Os principais locais de armazenamento de lípidos nos peixes são o fígado, a gordura visceral e o músculo, sendo que destes apenas o músculo é realmente adequado para consumo humano (Dantagnan *et al.*, 2009). A composição nutricional do músculo é um fator importante para os consumidores, que preferem comprar e consumir peixes com menor teor de lípidos e mais proteínas (Safavi *et al.*, 2019). Neste estudo, apenas os peixes alimentados com as dietas Resíduo 1% e 10% apresentaram valores de lípidos maiores que o CTRL. Os peixes alimentados com a dieta Pel 5% apresentaram o maior teor de proteína e o menor teor de lípidos, sendo isto, possivelmente, devido ao facto de os lípidos terem sido a principal fonte de energia para o metabolismo (em vez dos compostos proteicos), e a proteína ter sido utilizada para a produção de tecido e para o crescimento (Safavi *et al.*, 2019). O mesmo foi verificado nos estudos de Valente *et al.* (2006), para *D. labrax* com a alga *G. arcuata*, de Soler-Vila *et al.* (2009),

para *O. mykiss* com a suplementação de *Porphyra dioica*, e de Xu *et al.* (2011), para *Siganus canaliculatus* com *G. lemaneiformis*. Mohan *et al.* (2019) e Safavi *et al.* (2019) sugeriram duas hipóteses para o facto de isto acontecer: a primeira é que a suplementação das dietas melhorou as enzimas digestivas, incluindo a protease e a lipase, e, como resultado, estas influenciaram a digestibilidade de proteínas e gorduras; a segunda é que os polissacarídeos sulfatados, devido às suas propriedades antioxidantes, podem impedir a oxidação de moléculas biológicas, em particular lípidos e proteínas, e, assim, melhorar os processos de digestão e absorção. Para além disso, Guerreiro *et al.* (2019), sugeriu que a redução do teor de lípidos corporais, pode estar relacionada com o menor peso corporal dos peixes, alimentados com essas dietas.

Os ácidos gordos são a unidade estrutural das gorduras que formam e caracterizam os triacilgliceróis (Assunção, 2007). Estes são compostos orgânicos simples, constituídos por carbono (C), hidrogénio (H) e oxigénio (O), sendo que cada molécula tem, no extremo da cadeia, um grupo carboxílico que lhe confere carácter ácido e, no extremo oposto, apresenta um grupo metilo não funcional (Alves, 2014). São classificados de acordo com o comprimento da cadeia de carbonos, número, posição e configuração das duplas ligações e a dimensão da cadeia de átomos de carbono determina, em muitas instâncias, as propriedades químicas, físicas e metabólicas do ácido gordo (Alves, 2014; Breda, 2003). Estes podem ser divididos em três grupos: saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA). A nível estrutural, a grande diferença entre ácidos gordos insaturados e saturados, é o facto de as moléculas destes últimos não possuírem nenhuma ligação dupla, ao contrário das moléculas dos ácidos gordos monoinsaturados, que possuem uma, e dos polinsaturados, que possuem duas ou mais ligações duplas (Alves, 2014; Assunção, 2007; Breda, 2003). De acordo com Balboa *et al.* (2016), o grau de insaturação depende principalmente da temperatura da água, ou seja, as algas marinhas colhidas em regiões frias têm maiores teores de ácidos gordos polinsaturados e graus de insaturação, do que aquelas colhidas em águas tropicais. Os ácidos gordos são nutrientes fundamentais à vida, sendo utilizados pelos organismos como fonte energética (Assunção, 2007). Estão envolvidos direta ou indiretamente na regulação metabólica e na modulação imunitária, ao participar na regulação homeoviscosa das membranas celulares (Spector & Yorek, 1985; Wahle, 1983), ao servir de precursores na síntese de eicosanóides (Mathias & Dupont, 1979), ou como mensageiros químicos intracelulares (Assunção, 2007). O perfil de ácidos gordos no corpo dos peixes reflete o perfil destes na sua dieta (Turchini *et al.* 2009; Matani Bour *et al.* 2018; Roohani *et al.* 2019; Safavi *et al.*, 2019).

Relativamente aos ácidos gordos saturados, vários estudos (Kromhout *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2000; Kromhout *et al.*, 2001) demonstraram que a ingestão de gorduras saturadas está associada com o aumento do risco de doenças cardiovasculares. Em termos fisiológicos, os SFA podem ser divididos em ácidos gordos de cadeia curta ($\leq 4:0$), cadeia média ($6:0 \pm 10:0$) e de cadeia longa ($\geq 12:0$) (Molkentin, 2000). O ácido palmítico (C16:0) é um dos SFA mais abundantes (Morais *et al.*, 2020). No presente estudo, os SFA detetados em maior percentagem foram o ácido palmítico (C16:0), seguido do ácido esteárico (C18:0), o que está de acordo com a quantidade de AG presentes no óleo de girassol (Orsavova *et al.*, 2015), visto que os valores superiores se encontram na dieta Resíduo 1%. Os mesmos valores foram registados no estudo de Freire (2022), para *S. scombrus*, no de Praiboon *et al.* (2018), com *S. oligocystum*, no de Rasyid *et al.* (2019), com *G. gracilis*, e no de Li *et al.* (2018), para *S. fusiforme*.

Para os PUFA, o ácido oleico (C18:1 n-9) é o mais abundante na Natureza (Assunção, 2007; El Oudiani *et al.*, 2019), representando cerca de 40% das gorduras alimentares, sendo acompanhado nas gorduras vegetais, e sobretudo nas gorduras de animais marinhos, de um homólogo do ácido palmítico, o ácido palmitoleico (C16:1 n-7) (Assunção, 2007). Segundo Molkentin (2000), o consumo elevado de ácido oleico diminui o nível do colesterol. No presente estudo, os MUFA detetados em maior quantidade no músculo da dourada foram o C18:1 n-9, o ácido palmitoleico (C16:1 n-7) e o ácido vacénico (C18:1 n-7). O mesmo resultado foi relatado em Li *et al.* (2018), para *S. fusiforme*, em Terasaki *et al.* (2009), Borquez *et al.* (2011), para *O. mykiss*, e Moraes *et al.* (2020). Estes ácidos gordos monoinsaturados são também os mais abundantes no óleo de girassol (Orsavova *et al.*, 2015), que está presente no resíduo da *P. canaliculata* usado nas rações.

Os ácidos gordos polinsaturados desempenham papéis essenciais na resposta à infeção, são essenciais no crescimento e desenvolvimento do nosso organismo e na produção de metabolitos essenciais, que contribuem de modo decisivo para a modelação da resposta cardiovascular (Alves, 2014). Para além disso, o organismo humano não consegue sintetizá-los, ou não os sintetiza em quantidade suficiente, por isso têm de ser fornecidos pelo regime alimentar (Assunção, 2007). Neste grupo, os PUFA mais importantes são o ácido linoleico (C18:2 n-6), ácido α -linolénico (C18:3 n-3 (ALA)) e o ácido araquidónico (C20:4 n-6). O C18:2 n-6 é abundante em óleos de sementes, como de milho, girassol e soja, e noutros vegetais (Breda, 2003), sendo que tem funções importantes na síntese de prostaglandinas (Assunção, 2007). O ALA,

presente em grandes quantidades nos peixes gordos, é muito importante na formação de estruturas celulares do sistema nervoso e na proteção cardiovascular (Assunção, 2007; Breda, 2003). O ácido araquidônico também desempenha um papel importante em sistemas biológicos, como na resposta imune e função cerebral (Li *et al.*, 2018). O ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosa-hexaenóico (DHA) são os precursores de vários metabólitos, potentes mediadores lipídicos, considerados como benéficos na prevenção ou tratamento de diversas doenças (Swanson *et al.*, 2012). Além de mais, são também essenciais para o desenvolvimento fetal adequado e envelhecimento saudável (Dunstan *et al.*, 2007). Segundo Øverland *et al.* (2019), a proporção de EPA pode ser bem superior a 50% dos ácidos gordos totais, enquanto a de DHA é menor e só é observada em algumas espécies. Neste estudo, os PUFAs detetados em maior quantidade no músculo da dourada, foram o C18:2 n-6, DHA, EPA, ALA, C22:5 n-3 e C20:4 n-6. De acordo com Dawczynski *et al.* (2007), as algas castanhas *Undaria pinnatifida*, *Laminaria* sp. e *Hizikia fusiforme* contêm, predominantemente, EPA e C20:4 n-6, tendo sido obtidos resultados semelhantes para *P.canaliculata* (Tabela 8). Para além disso, Terasaki *et al.* (2009) e Li *et al.*, (2018) referem que os principais PUFAs, encontrados na alga *S. fusiforme*, foram os C20:4 n-6, EPA e ALA. No entanto, nos estudos de Gomes *et al.* (1993), de Francesco *et al.* (2004) e Morris *et al.* (2005), verificou-se que uma alta inclusão de proteína vegetal em dietas para salmonídeos, resultou no aumento de C18:2 n-6 e na diminuição dos teores de ALA, EPA e DHA, o que pode causar alterações no valor nutritivo dos peixes e influenciar a fisiologia dos destes (Borquez *et al.*, 2011).

Os n-3 PUFA são conhecidos por serem os ácidos gordos mais importantes nas espécies de peixes marinhos (Seong *et al.*, 2020). De acordo com Moussa *et al.* (2014), os principais efeitos dos ácidos gordos n-3 na saúde humana podem ser divididos em três categorias principais: a sua essencialidade em órgãos específicos, o seu papel significativo na redução de lípidos no sangue e, por último, a sua função como precursores na mediação de respostas bioquímicas e fisiológicas, nomeadamente como anti-inflamatórios (Lee *et al.*, 2018). Neste trabalho, as dietas que conduziram a maiores teores de ómega-3 no músculo da dourada, foram a Pel 5% e a Pel 10%, enquanto os peixes alimentados com a dieta Resíduo 10% foram os que apresentaram os menores teores. No estudo de Safavi *et al.* (2019), todas as dietas suplementadas com *U. intestinalis* e *G. persica*, para *O. mykiss*, resultaram num valor de $\Sigma n3$ superiores ao controlo, o que significa que, provavelmente, n-3 foi bem digerido e utilizado pelas trutas. Neste estudo, aconteceu o mesmo com *P.*

canaliculata, podendo isto significar que a acumulação de EPA e DHA no músculo da dourada, está associado a propriedades antioxidantes de polissacarídeos derivados de algas marinhas (Wang *et al.* 2016) que podem proteger os ácidos gordos n-3 da oxidação. Contrariamente, no estudo de Guerreiro *et al.* (2019), os valores de $\Sigma n3$ diminuíram com a suplementação de *C. crispus*, na dieta de douradas. Os PUFA n-6, contrariamente aos n-3, exercem efeitos pró-inflamatórios (Lee *et al.*, 2018) e estão presentes na maioria das sementes, nomeadamente da semente de girassol, óleos vegetais e carne (Covington, 2004). Tal como para n-3, os maiores valores foram registados no músculo dos peixes alimentados com as dietas Pe1 5% e 10%. Conforme relatado por Simopoulos (2002), recomenda-se que a proporção de n-6/ n-3 seja de 1:1 a 2:1. No presente estudo, esta relação variou de 1,22 a 1,64, indicando-nos assim que a alga utilizada na suplementação das rações, é uma fonte alimentar saudável de ácidos gordos (Li *et al.*, 2018). Como já referido anteriormente, IA e TI são índices nutricionais, propostos por Ulbricht & Southgate (1991), utilizados regularmente para avaliar os efeitos de biomassa algal em doenças coronárias, sendo que o índice de aterogenicidade relaciona os diferentes efeitos dos AG na saúde humana e o índice de trombogenicidade considera o efeito trombogénico, resultante da relação entre os diferentes efeitos na saúde humana dos vários AG. Conforme Assunção (2007), não há valores recomendados para estes índices e, por isso, considera-se que valores mais baixos exprimem uma relação de ácidos gordos mais favorável em termos de saúde. Visto que, no presente estudo, todas as dietas conduziram a valores inferiores a 1 e semelhantes ao CTRL, pode-se afirmar que a alga *P. canaliculata*, é uma escolha saudável para a suplementação da dieta de *S. aurata*. Em relação à razão de ácidos gordos hipocolesterolémicos/ ácidos gordos hipercolesterolémicos (h/H), este parâmetro mede os efeitos da composição de ácidos gordos no colesterol. No estudo de Carvalho *et al.* (2020), onde houve a suplementação da dieta de alevins de dourada com um óleo à base de microalgas, os valores de h/H variaram entre 7.8 ± 0.4 e 8.9 ± 2.0 . Comparativamente ao presente estudo, pode-se verificar que a adição de *P. canaliculata* à dieta de *S. aurata* produz resultados bem mais saudáveis, variando de $3,2 \pm 0,1$ a $3,6 \pm 0,1$.

5. Conclusão e perspectivas futuras

Este estudo oferece uma ampla abordagem sobre os efeitos da utilização da macroalga castanha *P. canaliculata* como suplemento alimentar, no crescimento, desempenho metabólico e hematológico e na saúde, da dourada (*Sparus aurata*), uma espécie de peixe com elevado valor comercial. Ao utilizar diferentes percentagens de alga e diferentes maneiras de incorporação na ração, foi possível entender melhor os seus benefícios e mecanismos de ação no metabolismo dos peixes, podendo também perceber os possíveis efeitos negativos que esta suplementação traria ao seu organismo. Não foram observados efeitos prejudiciais da inclusão, nas dietas de juvenis de dourada, da alga liofilizada ou do seu resíduo obtido após a suplementação de óleo de girassol. Os parâmetros de *stress* oxidativo indicam que as dietas não causaram desequilíbrios oxidativos, parecendo induzir maior proteção contra fatores de *stress*, em particular as dietas Pel 5% e 10%. Para além disso, o perfil nutricional do músculo é um fator importante para os consumidores, que preferem comprar e consumir peixes com menor teor de lípidos e mais proteínas. No presente estudo, verificou-se que os peixes alimentados com as dietas Pel 5% e Pel 10% apresentaram maior teor de proteína e menor teor de lípidos, significativamente diferentes ($p < 0,05$) dos valores registados com a dieta controlo, mostrando que estas formulações são as que mais se adequam à suplementação de ração de douradas. Assim, é possível utilizar a alga *P. canaliculata* e o seu resíduo obtido após suplementação de óleos alimentares, como complemento de rações para douradas.

Como perspectivas futuras, de forma a avaliar mais especificamente os efeitos na saúde dos peixes, causados pela inclusão de algas nas rações, deverão ser efetuados estudos a nível histológico, de maneira a perceber se esta suplementação prejudica a estrutura e microbiota intestinal da dourada, visto que é um peixe maioritariamente carnívoro. Também deverá ser aumentado o período de estudo, para que seja possível entender os efeitos a longo prazo, e incluir um patógeno (por exemplo *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*), para avaliar se a resposta imune e as enzimas antioxidantes apresentam maior atividade.

6. Referências

- Afonso, A., Lousada, S., Silva, J., Ellis, A. E., & Silva, M. T. (1998). Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Diseases of aquatic organisms*, 34(1), 27-37.
- Ahmed, N., & Thompson, S. (2019). The blue dimensions of aquaculture: A global synthesis. *Science of the Total Environment*, 652, 851-861.
- Al Khawli, F., Pateiro, M., Domínguez, R., Lorenzo, J. M., Gullón, P., Kousoulaki, K., Ferrer, E., Berrada, H., & Barba, F. J. (2019). Innovative green technologies of intensification for valorization of seafood and their by-products. *Marine drugs*, 17(12), 689.
- Aladedunye, F.A. (2014). Natural antioxidants as stabilizers of frying oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 116, 688-706.
- Almeida, J.R., Oliveira, C., Gravato, C., & Guilhermino, L. (2010). Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax* L. exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion. *Ecotoxicology* 19, 1369-1381.
- Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126, 171-198. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.07.013>
- Alves, F. J. P. C. (2014). Bioacessibilidade de Ácidos Gordos Omega-3: Dourada Versus Suplementos Alimentares (Doctoral dissertation, Universidade de Lisboa (Portugal)).
- AOAC, G. (2016). Official Methods of Analysis of AOAC International. Rockville, MD: AOAC International, ISBN: 978-0-935584-87-5
- Assunção, J. M. P. (2007). Contribuição para o estudo da composição lipídica e do valor nutricional de leites e produtos lácteos dos açores (Doctoral dissertation).
- Bagnyukova, T. V., Chahrak, O.I., & Lushchak, V.I. (2006). Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78, 325-331. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.04.005>
- Balina, K., Romagnoli, F., & Blumberga, D. (2017). Seaweed biorefinery concept for sustainable use of marine resources. *Energy Procedia*, 128, 504-511.

- Baker, M., Cemiglia, G., & Zaman, A. (1990). Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* 190, 360-365.
- Balboa, E. M., Gallego-Fábrega, C., Moure, A., & Domínguez, H. (2016). Study of the seasonal variation on proximate composition of oven-dried *Sargassum muticum* biomass collected in Vigo Ria, Spain. *Journal of Applied Phycology*, 28(3), 1943-1953.
- Banaee, M., Mirvagefei, A.R., Rafei, G.R., & Amiri, B.M. (2008). Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. *Int. J. Environ. Res.* 2, 189–198.
- Basto-Silva, C., Enes, P., Oliva-Teles, A., Balbuena-Pecino, S., Navarro, I., Capilla, E., & Guerreiro, I. (2021). Dietary protein source and protein/carbohydrate ratio affects appetite regulation-related genes expression in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 533, 736142.
- Batista, S., Pereira, R., Oliveira, B., Baião, L. F., Jessen, F., Tulli, F., Messina, M., Silva, J. L., Abreu, H., & Valente, L. M. (2020). Exploring the potential of seaweed *Gracilaria gracilis* and microalga *Nannochloropsis oceanica*, single or blended, as natural dietary ingredients for European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Applied Phycology*, 32(3), 2041-2059.
- Blier, P., 2014. Fish Health: An Oxidative Stress Perspective. *Fish. Aquac. J.* 5, 4172. <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000e105>
- Bird, R. P., & Draper, H. H. (1984). Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 299-305). Academic Press.
- Bligh, E.G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Borquez, A., Serrano, E., Dantagnan, P., Carrasco, J., & Hernandez, A. (2011). Feeding high inclusion of whole grain white lupin (*Lupinus albus*) to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on growth, nutrient digestibility, liver and intestine histology and muscle fatty acid composition. *Aquaculture Research*, 42(8), 1067-1078.
- Breda, J. (2003) – Fundamentos de Alimentação, Nutrição e Dietética. *Coimbra Mar da Palavra* – Edições Lda. 2003. p. 21-25.
- Caipang, C. M. A., Berg, I., Brinchmann, M. F., & Kiron, V. (2009). Short-term crowding stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. modulates the humoral immune response. *Aquaculture*, 295(1-2), 110-115.

Campbell, L. M., Fairbanks, L., Murray, G., Stoll, J. S., D'Anna, L., & Bingham, J. (2021). From Blue Economy to Blue Communities: reorienting aquaculture expansion for community wellbeing. *Marine Policy*, 124, 104361.

do Carmo, B. I. S. (2021). Ensaio em Time Course com Patógenos Bacterianos em Dourada (*Sparus Aurata*) e Robalo (*Dicentrarchus Labrax*) (Doctoral dissertation, Instituto Politecnico de Leiria (Portugal)).

Carvalho, M., Montero, D., Rosenlund, G., Fontanillas, R., Ginés, R., & Izquierdo, M. (2020). Effective complete replacement of fish oil by combining poultry and microalgae oils in practical diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fingerlings. *Aquaculture*, 529, 735696.

Cavaco, M. M. P. (2022). Variação sazonal das propriedades antimicrobianas e antioxidantes das espécies *Asparagopsis armata* e *Gelidium corneum*, S. Martinho do Porto, Portugal (Doctoral dissertation).

Cesário, M. T., da Fonseca, M. M. R., Marques, M. M., & de Almeida, M. C. M. (2018). Marine algal carbohydrates as carbon sources for the production of biochemicals and biomaterials. *Biotechnology Advances*, 36(3), 798-817, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.006>

Clairborne, A. (1985). Catalase activity, in: Grenwald, R.A. (Ed.), *Handbook of Methods of Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 283-284.

Clark, J. H., Farmer, T. J., Herrero-Davila, L., & Sherwood, J. (2016). Circular economy design considerations for research and process development in the chemical sciences. *Green Chemistry*, 18(14), 3914-3934.

Costas, B., Aragão, C., Dias, J., Afonso, A., & Conceição, L. E. (2013). Interactive effects of a high-quality protein diet and high stocking density on the stress response and some innate immune parameters of Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Fish physiology and biochemistry*, 39(5), 1141-1151.

Costas, B., Conceição, L. E., Dias, J., Novoa, B., Figueras, A., & Afonso, A. (2011). Dietary arginine and repeated handling increase disease resistance and modulate innate immune mechanisms of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). *Fish & Shellfish Immunology*, 31(6), 838-847.

Covington, M. (2004). Omega-3 fatty acids. *American family physician*, 70(1), 133-140.

Dantagnan, P., Hernández, A., Borquez, A., & Mansilla, A. (2009). Inclusion of macroalgae meal (*Macrocystis pyrifera*) as feed ingredient for rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*): effect on flesh fatty acid composition. *Aquaculture Research*, 41(1), 87-94.
- Dawczynski, C., Schubert, R., & Jahreis, G. (2007). Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food chemistry*, 103(3), 891-899.
- Du, Z. Y., Liu, Y. J., Tian, L. X., Wang, J. T., Wang, Y., & Liang, G. Y. (2005). Effect of dietary lipid level on growth, feed utilization and body composition by juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquaculture Nutrition*, 11(2), 139-146.
- Dunstan, J. A., Mitoulas, L. R., Dixon, G., Doherty, D. A., Hartmann, P. E., Simmer, K., & Prescott, S. L. (2007). The effects of fish oil supplementation in pregnancy on breast milk fatty acid composition over the course of lactation: a randomized controlled trial. *Pediatric research*, 62(6), 689-694.
- El Oudiani, S., Chetoui, I., Darej, C., & Moujahed, N. (2019). Sex and seasonal variation in proximate composition and fatty acid profile of *Scomber scombrus* (L. 1758) fillets from the Middle East Coast of Tunisia. *Grasas y aceites*, 70(1), e285-e285.
- Erkan, N. & Özden, Ö. (2007). Proximate composition and mineral contents in aqua cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*), sea bream (*Sparus aurata*) analyzed by ICP-MS. *Food Chemistry*. 2007, 102, 721–725.
- FAO Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. (2019). FishStatJ, a tool for fishery statistics analysis, Release: 3.5.0, Universal Software for Fishery Statistical Time Series. Global aquaculture production: Quantity 1950–2017; Value 1950–2017; Global capture production. Rome, Italy: FAO. p. 1950–2017.
- FAO (2022). Fisheries and aquaculture resources. *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758).
- Fazio, F. (2019). Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. *Aquaculture*, 500, 237-242.
- Fazio, F., Marafioti, S., Filiciotto, F., Buscaino, G., Panzera, M., & Faggio, C. (2013). Blood hemogram profiles of farmed onshore and offshore gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from Sicily, Italy. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13(3).
- Fazio, F., Saoca, C., Casella, S., Fortino, G., & Piccione, G. (2015). Relationship between blood parameters and biometric indices of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* cultured in onshore tanks. *Marine and freshwater behaviour and physiology*, 48(4), 289-296.

- Fernández, A., Grienke, U., Soler-Vila, A., Guihéneuf, F., Stengel, D. B., & Tasdemir, D. (2015). Seasonal and geographical variations in the biochemical composition of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) from Ireland. *Food chemistry*, 177, 43-52.
- Field, J. B., Elvehjem, C. A., & Juday, G. (1943). A study of the blood constituents of carp and trout. *Journal of Biological Chemistry*, 148, 261-269.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509.
- Fountoulaki, E., Alexis, M. N., Nengas, I., & Venou, B. (2005). Effect of diet composition on nutrient digestibility and digestive enzyme levels of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research*, 36(13), 1243-1251.
- de Francesco, M., Parisi, G., Médale, F., Lupi, P., Kaushik, S. J., & Poli, B. M. (2004). Effect of long-term feeding with a plant protein mixture-based diet on growth and body/fillet quality traits of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 236(1-4), 413-429.
- Frankic, A., & Hershner, C. (2003). Sustainable aquaculture: developing the promise of aquaculture. *Aquaculture international*, 11(6), 517-530.
- Freire, C. F. P. D. (2022). Aplicação de revestimentos comestíveis, suplementados com macroalgas e plantas halófitas, em filetes de sarda (*Scomber scombrus*) para redução do teor de gordura em processos de fritura (Doctoral dissertation).
- Ganesan, A. R., Shanmugam, M., Palaniappan, S., & Rajauria, G. (2018). Development of edible film from *Acanthophora spicifera*: Structural, rheological and functional properties. *Food Bioscience*, 23, 121–128. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2017.12.009>
- Gerber, L., Clow, K. A., Mark, F. C., & Gamperl, A. K. (2020). Improved mitochondrial function in salmon (*Salmo salar*) following high temperature acclimation suggests that there are cracks in the proverbial 'ceiling'. *Scientific reports*, 10(1), 1-12.
- Gomes, E. A. F. O. (2020). Efeito da suplementação da dieta com *Gracilaria gracilis* na performance do crescimento, resposta imune e stress oxidativo de *Sparus aurata* (Doctoral dissertation, Instituto Politecnico de Leiria (Portugal)).
- Gomes, E. F., Corraze, G., & Kaushik, S. (1993). Effects of dietary incorporation of a co-extruded plant protein (rapeseed and peas) on growth, nutrient utilization and muscle fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 113(4), 339-353.

Grant, K. R. (2015). Fish hematology and associated disorders. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 18(1), 83-103.

Guardiola, F.A., Bahi, A., & Esteban, M.A. (2018). Effects of dietary administration of fenugreek seeds on metabolic parameters and immune status of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 74, 372-379. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.010>

Guerreiro, I., Magalhães, R., Coutinho, F., Couto, A., Sousa, S., Delerue-Matos, C., Domingues, V. F., Oliva-Teles, A. & Peres, H. (2019). Evaluation of the seaweeds *Chondrus crispus* and *Ulva lactuca* as functional ingredients in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 2115-2124.

Gosch, B. J., Paul, N. A., de Nys, R., & Magnusson, M. (2015). Seasonal and within-plant variation in fatty acid content and composition in the brown seaweed *Spatoglossum macrodontum* (Dictyotales, Phaeophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 27(1), 387-398.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.

Hackbarth, F. V., Girardi, F., de Souza, S. M. G. U., de Souza, A. A. U., Boaventura, R. A., & Vilar, V. J. (2014). Marine macroalgae *Pelvetia canaliculata* (Phaeophyceae) as a natural cation exchanger for cadmium and lead ions separation in aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*, 242, 294-305.

Hamed, S. M., Abd El-Rhman, A. A., Abdel-Raouf, N., & Ibraheem, I. B. (2018). Role of marine macroalgae in plant protection & improvement for sustainable agriculture technology. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(1), 104-110.

Hu, X., Jandacek, R. J. & White, W.S. (2000) - Intestinal absorption of beta-carotene ingested with a metal rich in sunflower oil beef tallow: Postprandial appearance in triacylglycerol-rich lipoproteins in women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 71 (2000) 1170-1180.

INE, (2022). https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=36828280&PUBLICACOESmodo=2

Inhamuns, A. J., & Franco, M. R. B. (2008). EPA and DHA quantification in two species of freshwater fish from Central Amazonia. *Food Chemistry*, 107(2), 587-591.

- Ismail, M. M., Alotaibi, B. S., & El-Sheekh, M. M. (2020). Therapeutic uses of red macroalgae. *Molecules*, 25(19), 4411.
- Iverson, S. J., Lang, S. L., & Cooper, M. H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, 36(11), 1283-1287.
- Izquierdo, M. S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Rosenlund, G., & Ginés, R. (2005). Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture*, 250(1-2), 431-444.
- Jain, N., C. (1993). Essentials of veterinary hematology. *Philadelphia*: Lea & Febiger.
- Jahan, A., Nipa, T. T., Islam, S. M., Uddin, M. H., Islam, M. S., & Shahjahan, M. (2019). Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) could be suitable for coastal aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology*, 35(4), 994-1003.
- Jawad, L. A., Al-Mukhtar, M. A., & Ahmed, H. K. (2004). The relationship between haematocrit and some biological parameters of the Indian shad, *Tenuulosa ilisha* (Family Clupeidae). *Animal biodiversity and conservation*, 27(2), 47-52.
- Jia, R., Liu, B-L., Feng, W-R., Han, C., Huang, B., Lei, J-L. 2016. Stress and immune responses in skin of turbot (*Scophthalmus maximus*) under different stocking densities. *Fish and Shellfish Immunology* 55. Pp 131-139.
- Kaplow, L.S. (1965). Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. *Blood* 26, 215-219. <https://doi.org/10.15537/smj.2019.9.24484>
- Kraan, S. (2013). Mass-cultivation of carbohydrate rich macroalgae, a possible solution for sustainable biofuel production. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18(1), 27-46, <https://doi.org/10.1007/s11027-010-9275-5>
- Kromhout, D., Menotti, A. e Bloemberg, B. (1995) - Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25 - year mortality from coronary heart disease: The Seven Countries Study. *Preventive Medicine*. 24 (1995) 308-31
- Kromhout, D. (2001) - Epidemiology of cardiovascular diseases in Europe. *Public Health Nutrition*. 4(2B) (2001) 441-457.
- Kusumowardani, N., & Tjahjono, B. (2020). Circular economy adoption in the aquafeed manufacturing industry. *Procedia CIRP*, 90, 43-48.

- Laiz-Carrión, R., Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J. M., del Río, M. P. M., Soengas, J. L., & Mancera, J. M. (2005). Growth performance of gilthead sea bream *Sparus aurata* in different osmotic conditions: implications for osmoregulation and energy metabolism. *Aquaculture*, 250(3-4), 849-861.
- Lee, S., Lee, J., Choi, I. J., Kim, Y. W., Ryu, K. W., Kim, Y. I., & Kim, J. (2018). Dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids, the FADS gene, and the risk of gastric cancer in a Korean population. *Scientific reports*, 8(1), 1-7.
- Li, L., Cardoso, J. C. R., Félix, R. C., Mateus, A. P., Canário, A. V. M., Poer, D. M. (2021). Fish lysozyme gene family evolution and divergent function in early development. *Developmental and Comparative Immunology* 114. 103772.
- Li, Y., Fu, X., Duan, D., Xu, J., & Gao, X. (2018). Comparison study of bioactive substances and nutritional components of brown algae *Sargassum fusiforme* strains with different vesicle shapes. *Journal of Applied Phycology*, 30(6), 3271-3283.
- Londero, É. P., Bressan, C. A., Pês, T. S., Saccol, E. M., Baldisserotto, B., Finamor, I. A., & Pavanato, M. A. (2021). Rutin-added diet protects silver catfish liver against oxytetracycline-induced oxidative stress and apoptosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 239, 108848.
- Lopes, J. S. (2005). Criação de uma aplicação para modelar o crescimento da dourada (*Sparus aurata*) em aquacultura (Bachelor's thesis).
- Lusková, V. (1997). Annual cycles and normal values of hematological parameters in fishes.
- Machado, M., Azeredo, R., Diaz-Rosales, P., Afonso, A., Peres, H., Oliva-Teles, A., & Costas, B. (2015). Dietary tryptophan and methionine as modulators of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) immune status and inflammatory response. *Fish & Shellfish Immunology*, 42(2), 353-362.
- Magnoni, L. J., Martos-Sitcha, J. A., Queiroz, A., Calduch-Giner, J. A., Gonçalves, J. F. M., Rocha, C. M. R., Abreu, H. T., Schrama, J. W., Ozório, R. O. A., & Pérez-Sánchez, J. (2017). Dietary supplementation of heat-treated Gracilaria and Ulva seaweeds enhanced acute hypoxia tolerance in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biology open*, 6(6), 897-908.
- Marques, A. I. C. (2019). Conversão de uma unidade de dourada para modo de produção biológica (Doctoral dissertation, ISA/UL).

- Márquez-Ruiz, G., Ruiz-Méndez, M. V., & Velasco, J. (2014). Antioxidants in frying: Analysis and evaluation of efficacy. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(11), 1441-1450.
- Martínez, B. & Rico, J. M. (2002). Seasonal variation of p content and major n pools in *Palmaria palmata* (Rhodophyta) *Journal of Phycology*, 38(6), 1082-1089, <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01217.x>
- Matani Bour, H. A., Esmaeili, M., & Abedian Kenari, A. (2018). Growth performance, muscle and liver composition, blood traits, digestibility and gut bacteria of beluga (*Huso huso*) juvenile fed different levels of soybean meal and lactic acid. *Aquaculture Nutrition*, 24(4), 1361-1368.
- Mathias, M. M. & Dupont, J. (1979) - The relationship of dietary fats to prostaglandin biosynthesis. *Lipids*. 14 (1979) 247-252.
- Mišurcová, L., Machů, L., & Orsavová, J. (2011). Seaweed minerals as nutraceuticals. *Advances in food and nutrition research*, 64, 371-390.
- Mišurcová, L. (2012). Chemical composition of seaweeds. *Handbook of Marine Macroalgae, Biotechnology and Applied Phycology*. 171–192.
- Modra, H., Svobodova, Z., & Kolářová, J. (1998). Comparison of differential leukocyte counts in fish of economic and indicator importance. *Acta Veterinaria Brno*, 67(4), 215-226.
- Mohan, K., Ravichandran, S., Muralisankar, T., Uthayakumar, V., Chandirasekar, R., Seedeve, P., Abirami, R. G, & Rajan, D. K. (2019). Application of marine-derived polysaccharides as immunostimulants in aquaculture: A review of current knowledge and further perspectives. *Fish & shellfish immunology*, 86, 1177-1193.
- Molkentin, J. (2000). Occurrence and biochemical characteristics of natural bioactive substances in bovine milk lipids. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 47-53.
- Morais, T., Inácio, A., Coutinho, T., Ministro, M., Cotas, J., Pereira, L., & Bahcevandziev, K. (2020). Seaweed potential in the animal feed: A review. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(8), 559.
- Morris, P. C., Gallimore, P., Handley, J., Hide, G., Haughton, P., & Black, A. (2005). Full-fat soya for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in freshwater: Effects on performance, composition and flesh fatty acid profile in absence of hind-gut enteritis. *Aquaculture*, 248(1-4), 147-161.

- Moussa, E. R. W., Shereen, A. N., Manal, A., Mehanni, A. H. E., & Rasha, A. E. (2014). Nutritional value and fatty acid composition of household cooking on fish fatty acids profile using atherogenicity and thrombogenicity indices. *Journal of Food Chemistry and Nutrition*, 2(1), 27-41.
- Nakagawa, H. (2010). Quality control of cultured fish by feed supplements. In *Global change: Mankind-marine environment interactions* (pp. 31-34). Springer, Dordrecht.
- Nayak, P. K., Dash, U. M. A., Rayaguru, K., & Krishnan, K. R. (2016). Physio-chemical changes during repeated frying of cooked oil: A Review. *Journal of Food Biochemistry*, 40(3), 371-390.
- Neelima, P., Sunitha, K., Gopala Rao, N., Chandra Sekhara Rao, J. 2015. Haematological alterations in *Cyprinus carpio* as biomarker of Cypermethrin toxicity. *International Journal of Current Research* 7 (8). Pp 18864–18870.
- Okomoda, V. T., Ataguba, G. A., & Ayuba, V. O. (2013). Hematological response of *Clarias gariepinus* fingerlings exposed to acute concentrations of Sunsate®. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 9(2), 271-278.
- Orsavova, J., Misurcova, L., Vavra Ambrozova, J., Vicha, R., & Mlcek, J. (2015). Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 12871-12890.
- Øverland, M., Mydland, L. T., & Skrede, A. (2019). Marine macroalgae as sources of protein and bioactive compounds in feed for monogastric animals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 13-24.
- Pascual, P., Pedrajas, J. R., Toribio, F., López-Barea, J., & Peinado, J. (2003). Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chemico-biological interactions*, 145(2), 191-199.
- Passos, R., Correia, A. P., Ferreira, I., Pires, P., Pires, D., Gomes, E., do Carmo, B., Santos, P., Simões, M., Afonso, C., & Baptista, T. (2021). Effect on health status and pathogen resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed with diets supplemented with *Gracilaria gracilis*. *Aquaculture*, 531, 735888.
- Pateiro, M., Munekata, P. E., Domínguez, R., Wang, M., Barba, F. J., Bermúdez, R., & Lorenzo, J. M. (2020). Nutritional profiling and the value of processing by-products from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Marine drugs*, 18(2), 101.

Pavlidis, M. A., & Mylonas, C. C. (Eds.) (2011). *Sparidae: Biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species*. John Wiley & Sons.

Peixoto, M. J., Ferraz, R., Magnoni, L. J., Pereira, R., Gonçalves, J. F., Caldach-Giner, J., Pérez-Sánchez, J. & Ozório, R. O. (2019). Protective effects of seaweed supplemented diet on antioxidant and immune responses in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) subjected to bacterial infection. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.

Pires, D., Passos, R., do Carmo, B., Tchobanov, C. F., Forte, S., Vaz, M., Antunes, M., Neves, M., Tecelão, C. & Baptista, T. (2022). *Pelvetia canaliculata* as an Aquafeed Supplement for Gilthead Seabream *Sparus aurata*: A Biorefinery Approach for Seaweed Biomass Valorisation. *Sustainability*, 14(18), 11469.

Praiboon, J., Palakas, S., Noiraksa, T., & Miyashita, K. (2018). Seasonal variation in nutritional composition and anti-proliferative activity of brown seaweed, *Sargassum oligocystum*. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 101-111.

Quade, M. J., & Roth, J. A. (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary immunology and immunopathology*, 58(3-4), 239-248.

Rasyid, A., Ardiansyah, A., & Pangestuti, R. (2019). Nutrient composition of dried seaweed *Gracilaria gracilis*. *Indones J Mar Sci*, 24, 1-6, 10.14710/ik.ijms.24.1.1-6.

Regueiro, L., Newton, R., Soula, M., Méndez, D., Kok, B., Little, D. C., Pastres, R., Johansen, J., & Ferreira, M. (2021). Opportunities and limitations for the introduction of circular economy principles in EU aquaculture based on the regulatory framework. *Journal of Industrial Ecology*.

Rigos, G., Kogiannou, D., Padrós, F., Cristofol, C., Florio, D., Fioravanti, M., & Zarza, C. (2021). Best therapeutic practices for the use of antibacterial agents in finfish aquaculture: a particular view on European seabass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Mediterranean aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 13(3), 1285-1323.

Rodrigues, A. C., Gravato, C., Quintaneiro, C., Bordalo, M. D., Barata, C., Soares, A. M., & Pestana, J. L. (2017). Energetic costs and biochemical biomarkers associated with esfenvalerate exposure in *Sericostoma vittatum*. *Chemosphere*, 189, 445-453.

Rodriguez-Jasso, R. M., Mussatto, S. I., Pastrana, L., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1137-1144.

- Roohani, A. M., Abedian Kenari, A., Fallahi Kapoorchali, M., Borani, M. S., Zoriezahra, S. J., Smiley, A. H., Esmaeili, M., & Rombenso, A. N. (2019). Effect of spirulina *Spirulina platensis* as a complementary ingredient to reduce dietary fish meal on the growth performance, whole-body composition, fatty acid and amino acid profiles, and pigmentation of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*, 25(3), 633-645.
- Ruiz-Salmón, I., Margallo, M., Laso, J., Villanueva-Rey, P., Mariño, D., Quinteiro, P., Dias, A. C., Nunes, M. L., Marques, A., Feijoo, G., Moreira, M. T., Loubet, P., Sonnemann, G., Morse, A., Cooney, R., Clifford, E., Rowan, N., & Aldaco, R. (2020). Addressing challenges and opportunities of the European seafood sector under a circular economy framework. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 13, 101-106.
- Safavi, S. V., Kenari, A. A., Tabarsa, M., & Esmaeili, M. (2019). Effect of sulfated polysaccharides extracted from marine macroalgae (*Ulva intestinalis* and *Gracilariopsis persica*) on growth performance, fatty acid profile, and immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 4021-4035.
- Saito, H., & Ishihara, K. (1996). Docosahexaenoic acid content of fatty acids in the lipids of two species of frigate mackerel, *Auxis rocheri* and *Auxis thazard*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60, 1014–1016.
- Saito, H., Watanabe, T., & Murase, T. (1995). The fatty acid composition characteristic of a highly migratory fish, with seasonal variation of docosahexaenoic acid content in lipid of bonito (*Euthynnus pelamis*). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59, 2186–2188.
- Santelices, B. (1991). Production ecology of Gelidium. In International Workshop on Gelidium (pp. 31-44). Springer, Dordrecht, https://doi.org/10.1007/978-94-011-3610-5_3
- Seginer, I. (2016). Growth models of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) for aquaculture: A review. *Aquacultural Engineering*, 70, 15-32.
- Senso, L., Suárez, M. D., Ruiz-Cara, T., & García-Gallego, M. (2007). On the possible effects of harvesting season and chilled storage on the fatty acid profile of the fillet of farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*, 101(1), 298-307.
- Seong, T., Kitagima, R., Haga, Y., & Satoh, S. (2020). Non-fish meal, non-fish oil diet development for red sea bream, *Pagrus major*, with plant protein and graded levels of *Schizochytrium* sp.: Effect on growth and fatty acid composition. *Aquaculture Nutrition*, 26(4), 1173-1185.

- Sharma, S., Shah, E., Davla, D., Dixit, G., Patel, A., & Kumar, A. K. (2019). Effect of microalga-based diet on oxidative stress enzymes of African catfish, *Clarias gariepinus*. *International Aquatic Research*, 11(4), 377-387.
- Sheikhzadeh, N., Tayefi-Nasrabadi, H., Khani Oushani, A., & Najafi Enferadi, M. H. (2012). Effects of *Haematococcus pluvialis* supplementation on antioxidant system and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish physiology and biochemistry*, 38(2), 413-419.
- Silva, C. O.; Simões, T; Novais, S. C.; Pimparela, I.; Granada, L.; Soares, A. M. V. M.; Barata, C.; Lemos, M. F. L. (2017) Fatty acid profile of the sea snail *Gibbula umbilicalis* as a biomarker for coastal metal pollution. *Science of The Total Environment* 586, 542-550.
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 56(8), 365-379.
- Soler-Vila, A., Coughlan, S., Guiry, M. D., & Kraan, S. (2009). The red alga *Porphyra dioica* as a fish-feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on growth, feed efficiency, and carcass composition. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 617-624.
- Sotoudeh, E., & Jafari, M. (2017). Effects of dietary supplementation with red seaweed, *Gracilaria pygmaea*, on growth, carcass composition and hematology of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture International*, 25(5), 1857-1867.
- Sousa, G., Trifunovska, M., Antunes, M., Miranda, I., Moldão, M., Alves, V., Vidrih, R., Lopes, P. A., Aparicio, L., Neves, M., Tecelão, C., & Ferreira-Dias, S. (2021). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Pelvetia canaliculata* to sunflower oil. *Foods*, 10(8), 1732.
- Silva-Brito, F., Alexandrino, D. A., Jia, Z., Mo, Y., Kijjoa, A., Abreu, H., Carvalho, M. F., Ozório, R., & Magnoni, L. (2021). Fish performance, intestinal bacterial community, digestive function and skin and fillet attributes during cold storage of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets supplemented with *Gracilaria* by-products. *Aquaculture*, 541, 736808.
- Spector, A. A. & Yorek, M.A. (1985) - Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of Lipid Research*. 26 (1985) 1015-1035.
- Swanson, D., Block, R., & Mousa, S. A. (2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Advances in nutrition*, 3(1), 1-7.

- Tabanez, J. A. B. (2019). Acompanhamento de uma produção aquícola de *Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax* e ensaio experimental da prevalência e incidência parasitária de *Caligus minimus* em *Dicentrarchus labrax* (Doctoral dissertation).
- Tacon, A. G. (2020). Trends in global aquaculture and aquafeed production: 2000–2017. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28(1), 43-56.
- Terasaki, M., Hirose, A., Narayan, B., Baba, Y., Kawagoe, C., Yasui, H., Saga, N., Hosokawa, M. & Miyashita, K. (2009). Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds (Phaeophyta) from Japan with special reference to fucoxanthin and fucosterol contents 1. *Journal of phycology*, 45(4), 974-980.
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E., & Ng, W. K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in aquaculture*, 1(1), 10-57.
- Ulbricht, T.L.V. & Southgate, D.A.T. (1991) - Coronary heart disease: Seven dietary factors. *Lancet*. 338 (1991) 985-992.
- Valente, L. M., Batista, S., Ribeiro, C., Pereira, R., Oliveira, B., Garrido, I., Baião, L. F., Tulli, F., Messina, M., Pierre, R., Abreu, H., Pintado, M. & Kiron, V. (2021). Physical processing or supplementation of feeds with phytogenic compounds, alginate oligosaccharide or nucleotides as methods to improve the utilization of *Gracilaria gracilis* by juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 530, 735914.
- Valente, L. M. P., Gouveia, A., Rema, P., Matos, J., Gomes, E. F., & Pinto, I. S. (2006). Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 252(1), 85-91.
- Vaz, M. C. C. (2022). Avaliação do potencial antiviral de extratos em robalos (*Dicentrarchus labrax*) infetados com o vírus da necrose nervosa (VNN) (Doctoral dissertation).
- Vizcaíno, A. J., Mendes, S. I., Varela, J. L., Ruiz-Jarabo, I., Rico, R., Figueroa, F. L., Abdala, R., Moriñigo, M. A., Mancera, J. M. & Alarcón, F. J. (2016). Growth, tissue metabolites and digestive functionality in *Sparus aurata* juveniles fed different levels of macroalgae, *Gracilaria cornea* and *Ulva rigida*. *Aquaculture research*, 47(10), 3224-3238.
- Wahle, K. W. J. (1983) - Fatty acid modification and membrane lipids. *Proceeding of the Nutrition Society*. 42 (1983) 273-287.

Wang, J., Hu, S., Nie, S., Yu, Q., & Xie, M. (2016). Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

Xu, S., Zhang, L., Wu, Q., Liu, X., Wang, S., You, C., & Li, Y. (2011). Evaluation of dried seaweed *Gracilaria lemaneiformis* as an ingredient in diets for teleost fish *Siganus canaliculatus*. *Aquaculture International*, 19(5), 1007-1018.

Zapelloni, G., Rellán, A. G., & Bugallo, P. M. B. (2019). Sustainable production of marine equipment in a circular economy: deepening in material and energy flows, best available techniques and toxicological impacts. *Science of the total environment*, 687, 991-1010.