

Marina Cristina Calinowski

**UTILIZAÇÃO *in vitro e in vivo* DE MACROALGAS  
SOBRE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS DO CAMARÃO-  
BRANCO-DO-PACÍFICO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-  
Graduação Aquicultura da Universidade Federal  
de Santa Catarina para a obtenção do Grau de  
mestre em Aquicultura

Orientadora: Dra. Leila Hayashi

Coorientador: Dr. Luis Alejandro Vinatea Arana

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Calinowski, Marina Cristina

Utilização in vitro e in vivo de macroalgas sobre  
bactérias probióticas do camarão-branco-do-pacífico /  
Marina Cristina Calinowski ; orientadora, Leila  
Hayashi, coorientador, Luis Alejandro Vinatea  
Arana, 2018.

67 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,  
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura,  
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. camarão. 3. doenças. 4.  
macroalgas. 5. Lactobacillus plantarum. I. Hayashi,  
Leila . II. Vinatea Arana, Luis Alejandro . III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Utilização *in vitro* e *in vivo* de macroalgas sobre bactérias  
probióticas do camarão-branco-do-pacífico**

Por

MARINA CRISTINA CALINOWSKI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura.



---

Profa. Leila Hayashi, Dra.  
Coordenadora do PPG em Aquicultura

Banca Examinadora:



---

Dra. Leila Hayashi – *Orientadora*



---

Dra. Beatriz Castelar Duque Estrada - FIPERJ



---

Dr. Maurício Laterça Martins - UFSC



Esse trabalho é dedicado aos  
meus pais, Mário e Ivani.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a instituição UFSC pela estrutura onde pude realizar meus experimentos.

Ao Carlito pela prestatividade na secretaria da PPGAQI.

A CAPES pelo apoio financeiro concedido para realização dos meus estudos.

Aos professores envolvidos, Felipe Vieira, Marcelo Maraschin o meu muito obrigado por terem compartilhado comigo seus conhecimentos.

A minha orientadora Leila Hayashi, por ter aceitado me orientar, por todo suporte, pelos ensinamentos, pelas conversas e abraços.

Aos amigos da Aquicultura: Gabi Soltes, Moises, Esmeralda, Marco, Henrique, Priscila, Ana Clara, Carol, Isa, Claudinha, Delano, Thalita, Josi e Kennya onde estiveram comigo todos os dias compartilhando frustrações, risadas, aprendizados e colaborando de forma direta ou indireta na realização dos experimentos.

A Fernanda Ramlov (es incrível) e o Bruno Navarro, no qual me ajudaram desde o início, tiveram paciência e me acolheram no laboratório.

A toda equipe do LMVB.

A empresa Soriano SA. pelo fornecimento da biomassa seca de *Undaria pinnatifida*.

Aos meus queridos colegas de laboratório de macroalgas: Arthur, Fernanda, Fernando, Filipe, Fred, Gabriella, Luiza, Rodrigo, Thallis, Ticiane e Vitor que me ajudaram todos os dias principalmente nas horas difíceis. Vou sentir saudades.

A Norha, por toda paciência em me ensinar as coisas do zero, pela ajuda e pelo carinho.

Aos meus pais Mário e Ivani que me incentivaram desde o início, me apoiaram para não desistir e pelo amor eterno. Amo vocês.

Ao meu namorado, Alexandre que foi essencial para eu completar essa jornada.

A minha prima Débora que sempre esteve disposta a me ajudar e aconselhar quando mais precisei.

E por último minha maior saudade, minha vó Giuseppina (in memoriam).

“Seja a mudança que você quer ver no mundo”  
- Mahatma Gandhi



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de macroalgas pardas *in vitro* e *in vivo* em bactérias probióticas do camarão-branco-do-pacífico. No primeiro capítulo, foi avaliado o efeito *in vitro* de diferentes concentrações de extrato de macroalgas no crescimento da bactéria probiótica *Lactobacillus plantarum* de camarões marinhos e a caracterização química dos extratos. O extrato acetônico de *Sargassum filipendula* e metanólico de *Undaria pinnatifida* estimularam o crescimento bacteriano, enquanto o extrato metanólico de *S. filipendula* e acetônico e aquoso de *U. pinnatifida* inibiram o crescimento. Na caracterização química do extrato metanólico de *U. pinnatifida* e acetônico de *S. filipendula*, foi observado a presença de compostos fenólicos, carotenóides e carboidratos, cuja atividade antioxidante poderia contribuir no crescimento bacteriano. No segundo capítulo, o efeito das macroalgas incluídas na ração com e sem probióticos no crescimento do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* foi avaliado. O peso final, ganho de peso semanal e conversão alimentar foram analisados após 4 semanas de cultivo, assim como a sobrevivência dos camarões após desafio com *Vibrio parahaemolyticus*. Macroalgas secas foram incorporadas na ração do camarão em 3 dietas diferentes: a) *U. pinnatifida* (2%) + *S. filipendula* (0,5%) b) *U. pinnatifida* (2%), + *S. filipendula* (0,5%) + probiótico *L. plantarum*, c) somente probiótico. Como controle, foi utilizada a ração sem aditivos. Após 4 semanas, não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros zootécnicos e na contagem de *Vibrio* spp. e bactérias heterotróficas totais do trato intestinal nos diferentes tratamentos e controle. A contagem de bactérias ácido láticas foi significativamente maior no trato intestinal dos camarões que receberam probiótico. Após 8 horas do desafio experimental com *V. parahaemolyticus*, foram observadas as primeiras mortalidades dos camarões e após 24 horas, não foram observadas diferenças na sobrevivência entre os tratamentos e controle. Com base nos resultados, é possível inferir que a adição do probiótico *L. plantarum* na dieta aumentam as contagens de bactérias ácido láticas no intestino do camarão *L. vannamei*, sem alterar as contagens de *Vibrio* spp. e bactérias heterotróficas totais no intestino, e a utilização combinada das duas espécies de macroalgas não interferiu no desempenho do camarão nem das bactérias probióticas. Apesar dos extratos das macroalgas *S. filipendula* e *U. pinnatifida* terem influenciado positivamente no crescimento *in vitro* da bactéria probiótica, o mesmo não parece acontecer quando as algas são incluídas integras na ração do camarão. Assim,

recomenda-se o uso dos extratos das macroalgas especificamente para o crescimento da bactéria probiótica *in vitro*, e posterior utilização dessas bactérias no crescimento do camarão.

Palavras-chave: Aquicultura, camarão, doenças, macroalgas, *Lactobacillus plantarum*.

## ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the influence of brown seaweeds *in vitro* and *in vivo* in probiotic bacteria of pacific-white-shrimp. In the first chapter, the effect of different seaweed extracts on the growth of the probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* from marine shrimp *Litopenaeus vannamei* was evaluated *in vitro* as well as the chemical characterization of those extracts. The results showed that both acetic extract of *Sargassum filipendula* and methanolic and aqueous extract of *Undaria pinnatifida* stimulated the bacterial growth, while methanolic extract of *S. filipendula* and acetone extract of *U. pinnatifida* inhibited the growth. In the chemical characterization, the presence of phenolic compounds, carotenoids and carbohydrates were observed in methanolic extract of *U. pinnatifida* and acetic extract of *S. filipendula*, which have antioxidant activity that could contribute to bacterial growth. In the second chapter, the effects of the seaweed included in the feed with and without probiotic addition in the growth of the shrimp were evaluated. The final weight, weekly weight gain, feed conversion rate after 4 weeks of cultivation, as well as the survival of shrimps after challenge with *Vibrio parahaemolyticus* were analyzed. Seaweeds were included in the feed of *Litopenaeus vannamei* in three different diets: a) *U. pinnatifida* (2%) + *S. filipendula* (0.5%), b) *U. pinnatifida* (2%) + *S. filipendula* (0.5%) + probiotic *L. plantarum*, c) only probiotic bacteria. As control, feed without any additive was used. After four weeks, no significant differences among the treatments and control were observed in the zootechnical parameters, as well as in the *Vibrio* spp. and total heterotrophic bacteria counting in the intestinal tract. The counting of lactic acid bacteria was significantly higher in the intestinal tract of the shrimp that received the probiotic. After challenge with *V. parahaemolyticus*, the first mortality began to happen after eight hours, and after 24 h, no significant difference in the mortality rate was found among the treatments and control. Based on the results, we can infer that the addition of probiotic *L. plantarum* in the diet improved the total lactic acid bacteria counting in the intestinal tract of *L. vannamei*, without changing the *Vibrio* spp. and total heterotrophic bacteria counts. Moreover, the addition of the seaweed in the feed had no effects in the shrimp growth performance or probiotic bacteria growth. Despite the seaweed extracts of *S. filipendula* and *U. pinnatifida* had positively influenced the growth of probiotic bacteria *in vitro*, the same is not true when the role seaweed is added in the feed. So, we recommend the use of

seaweed extracts specifically in the bacteria growth *in vitro*, and after the use of these bacteria for shrimp growth.

Keywords: Aquaculture, shrimp, diseases, macroalgae, *Lactobacillus plantarum*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** (A) Perfil espectrofotométrico UV-visível (200 – 800 nm) dos extratos aquoso, metanólico e acetônico de *Sargassum filipendula*. (B) - Perfil espectrofotométrico UV-visível (200 – 800 nm) dos extratos aquoso, metanólico e acetônico de *Undaria pinnatifida*..... 39
- Figura 2** - Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  do extrato acetônico de *Sargassum filipendula*. Sinal em 0.0 ppm corresponde ao padrão interno tetrametilsilano (TMS)..... 40
- Figura 3** – Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  do extrato metanólico de *Undaria pinnatifida*. Sinal em 0.0 ppm corresponde ao padrão interno tetrametilsilano (TMS)..... 41
- Figura 4** - Sobrevivência de *Litopenaues vannamei* após desafio com *Vibrio parahaemolyticus*. Valores expressos em média. As barras verticais indicam o desvio padrão. .... 57



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Concentração final dos extratos liofilizados das macroalgas *Undaria pinnatifida* e *Sargassum filipendula* em 1 mL. .... 32
- Tabela 2** - Efeito da concentração de extratos (aquoso, metanólico e acetônico) de *Undaria pinnatifida* e *Sargassum filipendula* no tempo de duplicação de crescimento (tdup) de *Lactobacillus plantarum*. Os valores apresentados correspondem a média  $\pm$  desvio padrão. .... 36
- Tabela 3** - Efeito da concentração de extratos (aquoso, metanólico e acetônico) de *Undaria pinnatifida* e *Sargassum filipendula* na velocidade máxima de crescimento de *Lactobacillus plantarum*. Os valores apresentados correspondem a média  $\pm$  desvio padrão. .... 37
- Tabela 4 - Parâmetros zootécnicos de *Litopenaeus vannamei* cultivado em água clara e alimentado com diferentes dietas. Valores expressos em média  $\pm$  desvio..... 56
- Tabela 5- Contagem microbiológica (log) de intestino de *Litopenaeusvanammei* alimentados com diferentes dietas após quatro semanas de cultivo. .... 57



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>C</b>	Controle
<b>P</b>	Probiótico
<b>A</b>	Alga
<b>A + P</b>	Alga + Probiótico
<b>Aq</b>	Aquoso
<b>Mt</b>	Metanólico
<b>Ac</b>	Acetônico



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1. Objetivo geral</b> .....	<b>25</b>
<b>1.1.1. Objetivos específicos</b> .....	<b>25</b>
<b>2. ESTRUTURA DO TRABALHO</b> .....	<b>25</b>
<b>3. CAPITULO 1: Influência de extratos de macroalgas em bactérias probióticas do camarão-branco-do-pacífico</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1. Introdução</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2. Material e Métodos</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2.1. Obtenção das macroalgas</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2.2. Preparação dos extratos</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2.3. Avaliação do efeito dos extratos no crescimento da bactéria probiótica <i>L.plantarum</i></b> .....	<b>32</b>
<b>3.2.4.Caracterização dos extratos via espectrofotometria de varredura UV-visível</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2.5. Caracterização dos extratos via RMN</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2.6. Análises estatísticas</b> .....	<b>34</b>
<b>3.3. Resultados</b> .....	<b>35</b>
<b>3.3.1. Efeito dos extratos no crescimento de <i>Lactobacillus plantarum</i></b> .....	<b>35</b>
<b>3.3.2. Espectrofotometria de varredura UV-visível</b> .....	<b>38</b>
<b>3.3.3. Ressonância magnética nuclear (RMN)</b> .....	<b>40</b>
<b>3.4. Discussão</b> .....	<b>41</b>
<b>Referências</b> .....	<b>44</b>
<b>4. CAPITULO 2: Efeito combinado de duas macroalgas pardas e probióticos no crescimento do camarão-branco-do-pacífico e sua resistência ao <i>Vibrio</i></b> .....	<b>49</b>
<b>4.1. Introdução</b> .....	<b>52</b>
<b>4.2. Material e Métodos</b> .....	<b>53</b>

<b>4.2.1.</b>	<i>Preparação das dietas</i> .....	<b>53</b>
<b>4.2.2.</b>	<i>Testes in vivo de camarões alimentados com macroalgas e probiótico</i> .....	<b>53</b>
<b>4.2.3.</b>	<i>Parâmetros zootécnicos</i> .....	<b>54</b>
<b>4.2.4.</b>	<i>Análise da microbiota intestinal</i> .....	<b>55</b>
<b>4.2.5.</b>	<i>Desafio com V. parahaemolyticus</i> .....	<b>55</b>
<b>4.2.6.</b>	<i>Análises Estatísticas</i> .....	<b>55</b>
<b>4.3.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>56</b>
<b>4.3.1.</b>	<i>Parâmetros zootécnicos</i> .....	<b>56</b>
<b>4.3.2.</b>	<i>Análise da microbiota intestinal</i> .....	<b>56</b>
<b>4.3.3.</b>	<i>Desafio com V. parahaemolyticus</i> .....	<b>57</b>
<b>4.4.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>58</b>
	<b>Referências</b> .....	<b>59</b>
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>65</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo de macroalgas apresenta grande importância dentro da aquicultura mundial. Segundo a FAO (2016), a produção mundial de algas no ano de 2014 foi de 26.772.638 toneladas, rendendo um total de 5,3 bilhões de dólares, sendo 95% dessa produção proveniente da aquicultura.

Dentre as algas produzidas, a macroalga do gênero *Sargassum* do grupo de algas pardas (Classe Phaeophyceae), possui importância ecológica pois serve de abrigo, alimento e local de desova para diversas espécies marinhas (HWANG et al., 2006). Possui também importância econômica pela presença de fucoïdanas (LIU et al., 2012), um polissacarídeo com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticoagulantes, antivirais, antitumorais e imunomodulatórias muito utilizado em indústrias de cosméticos, alimentícias e farmacêuticas (LI et al., 2008). A *Sargassum filipendula*, é uma macroalga nativa do Estado de Santa Catarina (BOUZON et al., 2006) e está distribuída entre as zonas tropicais e subtropicais do Atlântico Norte e Atlântico Sul. Pode ser encontrada também no Sudeste e Sudoeste asiático (REDMOND, 2014).

A espécie *Undaria pinnatifida*, também conhecida por “wakame”, é uma macroalga parda que pode atingir até três metros de comprimento. É rica em vitaminas, hidratos de carbono, lipídios, aminoácidos essenciais e minerais. É ainda uma fonte rica em fucoxantina, um pigmento que tem sido referenciado por conter propriedades dietéticas. Esta espécie é a segunda mais consumida no mundo e pode ser encontrada na parte superior do infralitoral em profundidades de até 18 metros (PEREIRA, 2015). Além disso, a fucoxantina atrai muita atenção devido às suas propriedades antioxidantes, anticancerígenas, anti-hipertensivas, anti-obesidade e anti-inflamatória (PENG et al. 2011).

Apesar de todas essas propriedades, o interesse pelo potencial biotecnológico dos polissacarídeos de algas marinhas é recente (PENGZHAN et al., 2003) e nas últimas décadas, a descoberta de metabólitos com atividade biológica a partir de macroalgas cresceu significativamente (HOLDT et al., 2011).

Os metabólitos bioativos encontrados da flora marinha incluem fenóis bromados, polissacarídeos, peptídeos, heterocíclicos oxigenados, nitrogenados e de enxofre, terpenóides e proteínas (BHAGAVATHY et al., 2011; MAYER et al., 2005). Bansemir et al. (2006) identificaram extratos de 26 espécies de algas que demonstraram ser uma fonte promissora de compostos biologicamente ativos, podendo ser utilizados

em tratamentos terapêuticos e profiláticos de doenças infecciosas que agridem, por exemplo, a aquicultura, e em particular, a carcinicultura.

A carcinicultura no Brasil diminuiu significativamente a produtividade nos últimos anos e uma das razões está relacionada com o surgimento de enfermidades virais e bacterianas no início do ano 2000. Devido à grande quantidade de surtos, ocorreu redução da produção entre 2003 a 2005. Em 2004, foi registrado um declínio de 15,84% na produção e de 24% na produtividade dos cultivos de camarões marinhos (FEIJÓ, 2009; MACIEL, 2002; MADRID, 2005; NEW et al., 2010).

Produtos químicos e antibióticos têm sido usados para o controle de doenças bacterianas na aquicultura. Os usos dessas substâncias em grandes proporções deixam os microrganismos mais resistentes (DEFOIRDT et al., 2007). Como alternativa para a melhoria dessas enfermidades, estão sendo usados prebióticos, probióticos e simbióticos, que tem chamado atenção da indústria aquícola (GATESOUBE, 2008). Os prebióticos são considerados ingredientes não digeríveis da dieta, que beneficiam o hospedeiro ao selecionar e estimular o crescimento de bactérias benéficas no trato intestinal (COLLINS et al., 1999). Os probióticos são microrganismos vivos que colonizam o trato digestivo do animal e melhoram a saúde do hospedeiro (DE VRESE & SCHREZENMEIR, 2008). Entre as bactérias probióticas utilizadas na aquicultura, as que mais se destacam são as ácidos láticas, pois produzem compostos antimicrobianos (bacteriocinas, ácido lático, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio), são de manipulação fácil e estimulam a resposta não específica dos animais (GATESOUBE, 2008). A combinação de probióticos e prebióticos em um mesmo alimento, é chamada de simbiótico (COLLINS et al., 1999).

Para serem considerados probióticos, os microorganismos vivos precisam cumprir algumas características essenciais, como por exemplo: ser efetivo na melhoria da saúde do hospedeiro, não serem patogênicos e nem tóxicos, precisam ser viáveis e capazes de sobreviver ao metabolismo digestivo, serem capazes de colonizar o trato intestinal e de se manterem estáveis por longo período de tempo, além de possuírem estabilidade em condições de armazenamento e campo (FULLER, 1989). Trabalhos demonstraram que dietas suplementadas com bactérias lácticas *Lactobacillus plantarum* para camarão *Litopenaeus vannamei*, auxiliaram no desenvolvimento de sua eficiência imunológica, além de terem contribuído para resistência a *Vibrio alginolyticus* (CHIU et al., 2007). Segundo Schleder et al. (2017) a macroalga *U. pinnatifida* melhorou a imunidade dos camarões e reduziu *Vibrio* spp., enquanto que *S. filipendula* aumentou a resistência de camarões ao choque térmico.

Entretanto, estudos com extratos de macroalgas *U. pinnatifida* e *S. filipendula* em conjunto com bactérias probióticas *L. plantarum* ainda não foram observados para o crescimento e a melhoria da resposta imunológica do camarão branco-do-pacífico.

### **1.1. Objetivo geral**

Avaliar a influência de macroalgas pardas *in vitro* e *in vivo* em bactérias probióticas do camarão-branco-do-pacífico.

#### *1.1.1. Objetivos específicos*

Avaliar o efeito *in vitro* de extratos de macroalgas no crescimento da bactéria probiótica *Lactobacillus plantarum*.

Avaliar o efeito das macroalgas incluídas na ração com e sem probióticos, em relação ao peso final, ganho de peso semanal, conversão alimentar e na sobrevivência após desafio com *Vibrio parahaemolyticus*.

## **2. ESTRUTURA DO TRABALHO**

A dissertação foi dividida em dois capítulos, de acordo com cada objetivo específico, e serão geradas duas publicações na revista Journal of Applied Phycology.



### **3. CAPITULO 1: Influência de extratos de macroalgas em bactérias probióticas do camarão-branco-do-pacífico**

Marina Cristina Calinowski<sup>1</sup>, Fernanda Ramlov<sup>2</sup>, Norha Constanza Bolívar Ramírez<sup>1</sup>, Marcelo Maraschin<sup>2</sup>, Felipe de Nascimento Vieira<sup>1</sup>, Luis Alejandro Vinatea Arana<sup>1</sup>, Leila Hayashi<sup>1</sup>

Marina Cristina Calinowski  
+55 48 98853-2020, marinacalinowski@hotmail.com

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos, Servidão dos Coroas, 503, Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

## Resumo

As macroalgas possuem compostos bioativos com potencial para tratamentos terapêuticos e profiláticos de doenças que acometem o cultivo de camarão. Por outro lado, as bactérias probióticas, quando incluídas na dieta destes organismos, têm demonstrado capacidade de diminuir populações de bactérias patogênicas, alterando a microbiota intestinal e melhorando a saúde do hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de extratos das macroalgas pardas *Undaria pinnatifida* e *Sargassum filipendula* sobre bactérias probióticas *Lactobacillus plantarum*. Os extratos foram obtidos utilizando 10 g de alga seca adicionados em 100 mL de água, metanol 80% ou acetona 80%, seguido de maceração. O efeito dos extratos nas concentrações de 0,25; 0,50; 1,0; 5,0; 7,5 e 10 mg mL<sup>-1</sup> foram testados sobre o crescimento de *L. plantarum*. Além disso, foi realizado a caracterização dos extratos via espectrofotometria de varredura e via ressonância magnética nuclear (RMN). O crescimento bacteriano foi determinado a cada duas horas durante 24 h. Ao final do experimento, foram calculadas a velocidade máxima de crescimento e tempo de duplicação. Nas concentrações de 0,25 e 5 mg mL<sup>-1</sup> de extrato aquoso de *U. pinnatifida*, o crescimento da bactéria foi inibido, enquanto em extratos metanólicos (5 a 10 mg mL<sup>-1</sup>) estimularam o crescimento bacteriano; maiores concentrações de extrato acetônico (10 mg mL<sup>-1</sup>) inibiram o crescimento. Não foram observadas diferenças significativas no crescimento bacteriano nas diferentes concentrações do extrato aquoso da *S. filipendula*; o extrato metanólico inibiu o crescimento da bactéria a partir da concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup>, sendo observada a morte de *L. plantarum* a partir de 5,0 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto o extrato acetônico de *S. filipendula* estimulou o crescimento de *L. plantarum* em todas as concentrações. A partir da caracterização dos extratos, pode-se concluir que as atividades estimulantes ao crescimento de *L. plantarum* poderiam ser devido a presença de metabólitos secundários com características físico-químicas e de estrutura química distintas, como compostos fenólicos, carotenoides e carboidratos, no qual podem estar contribuindo ao crescimento bacteriano.

Palavras-chave: Aquicultura, *Litopenaeus vannamei*, macroalgas, bactéria ácido láctica.

## Abstract

Seaweeds have bioactive compounds with potential for therapeutic and prophylactic treatment of diseases that occurs in shrimp rearing. On the other hand, probiotic bacteria, when included in the diet of those animals, have the capacity to reduce the population of pathogenic bacteria, changing the intestinal microbiota and improving the host health. The aim of this work was to evaluate the influence of extracts from brown seaweed *Undaria pinnatifida* and *Sargassum filipendula* in probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum*. Extracts were obtained from 10 g of dried seaweed, adding 100 mL of water, methanol diluted by 80% or acetone diluted by 80%, followed by maceration. Effects of the extracts in *L. plantarum* were tested in different concentrations: 0.25, 0.5, 1.0, 5.0, 7.5 and 10 mg mL<sup>-1</sup>. Besides, the characterization of the extracts was made by scanning spectrometry and by nuclear magnetic resonance (RMN). Bacterial growth was determined every two hours for 24 h. At the end of the experiment, the maximum growth speed and duplication time have been calculated. At concentrations of 0.25 and 5 mg mL<sup>-1</sup> aqueous extract of *U. pinnatifida*, bacterial growth was inhibited, while methanolic extracts (from 5 to 10 mg mL<sup>-1</sup>) stimulated bacterial growth; higher concentrations of acetonic extract (10 mg mL<sup>-1</sup>) inhibited the growth. No significant differences were observed in aqueous extract of *S. filipendula*; methanolic extract inhibits bacterial growth in concentration above to 1.0 mg mL<sup>-1</sup>, causing bacteria death in higher concentrations (from 5.0 mg mL<sup>-1</sup>) while all concentrations of acetonic extract stimulated *L. plantarum* growth. The characterization of the extracts showed that growth stimulant activities of *L. plantarum* could come from secondary metabolites with different physical-chemical profile and different chemical structures, as phenolic compounds, carotenoids and carbohydrates, whose may contribute to bacterial growth.

Keywords: Aquaculture, *Litopenaeus vannamei*, seaweed, lactic acid bacteria.

### 3.1. Introdução

De acordo com a FAO (2016), o setor econômico de produção de algas aumentou 8% ao ano na última década, sendo cultivado em 50 países. Atualmente, existe um interesse crescente na utilização de algas marinhas e seus extratos devido a suas atividades bioativas promotoras de crescimento, melhoramento de sistema imune e propriedades antibacterianas e antivirais contra patógenos hospedeiros (Van hai, 2015). A utilização de algas e seus extratos na aquicultura é econômico e caracteriza uma atividade sustentável, pois são biodegradáveis e podem manter a qualidade de água dentro dos padrões da sanidade ambiental (Thanigaivel et al. 2016).

A carcinicultura em particular, tem sido afetada nos últimos anos por bacterioses, e alguns trabalhos tem demonstrado que a utilização de compostos isolados ou extratos de plantas e algas podem ajudar a prevenilas. Segundo Chiu (2007), as infecções causadas por bactérias do gênero *Vibrio* é um grande problema em cultivos de camarões, tendo como sintomas necrose muscular, anorexia, baixa taxa de crescimento, inatividade e mortalidades.

Diversos trabalhos apresentaram bons resultados em relação à prevenção de enfermidades de camarões utilizando componentes isolados ou extratos de plantas e algas (Chakraborty et al. 2014; Immanuel et al. 2012). Além disso, os polissacarídeos sulfatados (PS) e os extratos de algas marinhas, em particular, vêm apresentando resultados significativos na sobrevivência de camarões expostos experimentalmente, às condições de estresse e aos microrganismos patógenos (Huang et al. 2006; Fu et al. 2007; Barroso et al. 2007).

Coronel (2016) observou que extratos aquosos da macroalga vermelha *Kappaphycus alvarezii*, e das macroalgas pardas *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida* exerceram atividade antimicrobiana *in vitro* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas patogênicas de organismos aquáticos. Outros trabalhos relatam que extratos de algas pardas também apresentaram alto potencial na resposta imune e na inibição da proliferação de agentes patogênicos no camarão, como bactérias e vírus (Chotigeat et al. 2004; Immanuel et al. 2012).

Extratos de macroalgas, assim como de qualquer outro organismo, podem apresentar propriedades e/ou atividades biológicas distintas de acordo com o solvente utilizado como etanol, metanol, clorofórmio, éter de petróleo e diclorometano. Cada solvente poderá otimizar a extração de um composto bioativo específico. Cruz-Suárez et al. (2008) testou o extrato aquoso da macroalga *Gracilaria tenuistipitata* incluída na ração

do camarão *Litopenaeus vannamei*. Esses autores observaram que os camarões apresentaram maior capacidade imunológica, assim como resistência a infecção ao *Vibrio alginolyticus*. Wang et al. (2009) afirmaram que extratos com 70% de acetona são mais eficientes para a extração de polifenóis do que extratos aquosos em algas como a *Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus*, *Fucus vesiculosus*, *Ulva lactuca* entre outras. Segundo Yeh et al. (2006), extratos de *Sargassum duplicatum* com água quente quando utilizados por imersão ou injeção aumentou a resposta imune de *L. vannamei* e resistência contra *V. alginolyticus*. A partir desses dados, é possível concluir que diferentes solventes extraem diferentes compostos bioativos, sendo possível a melhoria do sistema imune do camarão e resistência a vibrios.

Extratos de macroalgas podem, portanto, apresentar atividades biológicas interessantes do ponto de vista do cultivo do camarão. Existem atualmente alternativas para melhorar a produção de camarões marinhos, como o uso de probióticos. As bactérias ácido láticas, em particular, são probióticos apontados como agentes de controle biológico na aquicultura (Balcázar et al. 2006; Aly, 2009). A bactéria *Lactobacillus* é do gênero Gram-positivo, não esporulantes, com catalase negativa e fermentam carboidratos, principalmente lactato e acetato. A espécie *Lactobacillus plantarum* em particular, é considerada uma das mais importantes na fermentação de vários produtos vegetais (Ashenafi; Busse, 1991). É conhecida por produzir substâncias antimicrobianas, como a plantaricina, que são ativas contra alguns patógenos (Muck, 1996).

O uso combinado dos extratos de macroalga com probióticos poderia ser uma alternativa sustentável para melhorar a produção da carcinicultura. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos extratos de macroalgas no crescimento *in vitro* da bactéria probiótica *L. plantarum*.

## 3.2. Material e Métodos

### 3.2.1. Obtenção das macroalgas

A macroalga *S. filipendula* foi coletada na praia do Sambaqui, em Florianópolis (27.488° S 48.532° O), na região do infralitoral superior em aproximadamente um metro de profundidade. Talos não férteis foram coletadas e levados para a Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM-UFSC). As plantas foram lavadas em água do mar esterilizada e limpas manualmente para a retirada de epífitas e outros organismos associados. A macroalga *Undaria pinnatifida*, na forma

moída e seca, foi fornecida pela empresa Soriano S/A, localizada na Argentina.

### 3.2.2. Preparação dos extratos

A macroalga *S. filipendula* foi dessalinizada com adição da solução de formiato de amônio a 0,5 M, por 30 s. Após esse período, foi lavada com água destilada três vezes. As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido, liofilizadas e mantidas em freezer (-20°C) até o momento das análises. *U. pinnatifida* foi fornecida como pó seco, portanto, não foi necessário o processo de liofilização. Para a preparação dos extratos para cada espécie de alga, foram adicionados 10 g de biomassa seca triturada em 100 mL de solvente (água, metanol 80% e acetona 80%) sendo mantidos em um Becker por uma hora. Após esse período, a solução foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min e o extrato resultante foi evaporado com auxílio de rotaevaporador a vácuo a uma temperatura de 55 °C. Os resíduos aquosos recuperados foram filtrados em papel filtro Whatman e armazenados em recipiente de vidro âmbar a - 20 °C. Para o controle negativo, os solventes utilizados (metanol 80% e acetona 80%) foram evaporados no rotaevaporador a vácuo a uma temperatura de 55 °C, até que o resíduo aquoso pudesse ser recuperado. Para determinar a concentração final de cada extrato, foram retirados 1 mL de amostra e liofilizados. A concentração de cada extrato em 1 mL<sup>-1</sup> está descrita na tabela 1.

**Tabela 1** - Concentração final dos extratos liofilizados das macroalgas *Undaria pinnatifida* e *Sargassum filipendula* em 1 mL.

Macroalgas	Solvente		
	Água	Metanol	Acetona
<i>U. pinnatifida</i>	21,5 mg mL <sup>-1</sup>	58,5 mg mL <sup>-1</sup>	52 mg mL <sup>-1</sup>
<i>S. filipendula</i>	15 mg mL <sup>-1</sup>	30,5 mg mL <sup>-1</sup>	68 mg mL <sup>-1</sup>

### 3.2.3. Avaliação do efeito dos extratos no crescimento da bactéria probiótica *Lactobacillus plantarum*

A bactéria *Lactobacillus plantarum* foi isolada dos camarões adultos *L. vannamei* (Vieira et al. 2007) e mantidas no setor de microbiologia do LCM/UFSC.

Cada extrato de macroalga foi diluído em tubos de ensaio contendo meio de cultura MRS (Man, Rogosa e Sharpe). As quantidades de extrato foram ajustadas em 0,25 mg mL<sup>-1</sup>, 0,50 mg mL<sup>-1</sup>, 1,0 mg mL<sup>-1</sup>, 5,0 mg mL<sup>-1</sup>, 7,5 mg mL<sup>-1</sup> e 10 mg mL<sup>-1</sup>. A bactéria probiótica foi semeada em cada tubo e o crescimento da bactéria foi observado em leituras a cada duas horas durante 24 h em leitora de microplaca de fundo chato (DO, densidade óptica, 630) (Vieira, 2013). Posteriormente, foram calculados a velocidade máxima de crescimento (Eq. 1), tempo de duplicação (tdup) (Eq. 2) e concentração final da bactéria (Madigan et al. 2004).

Velocidade Máxima (Eq. 1)

$$\mu_{\max} = \frac{\ln(Z) - \ln(Z_0)}{dt} \quad (1)$$

Onde:  $\mu_{\max}$  = velocidade máxima de crescimento;  
 Z = concentração (UFC mL<sup>-1</sup>);  
 Z<sub>0</sub> = concentração inicial do inóculo (UFC mL<sup>-1</sup>);  
 dt = tempo de cultivo (horas).

Tempo de Duplicação (Fórmula 2)

$$td = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}} \quad (2)$$

Onde: td = tempo de duplicação;  
 $\mu_{\max}$  = velocidade máxima de crescimento.

A concentração do probiótico foi determinada de acordo com a curva de crescimento realizada previamente em UFC mL<sup>-1</sup> (unidades formadoras de colônias por mililitros). Para cada extrato, foram realizadas cinco repetições (n = 5). Como controle, foi utilizado caldo MRS com adição da *L. plantarum* sem extrato de macroalgas. Como “branco” foi considerado somente o MRS e os diferentes extratos sem adição da bactéria.

### 3.2.4. Caracterização dos extratos via espectrofotometria de varredura UV-visível

O perfil espectral UV-visível das amostras de extratos das algas foi determinado a partir de uma varredura exploratória. Para obtenção das medidas de absorção óptica dos compostos bioativos presentes nos extratos aquosos, metanólicos e acetônicos foi utilizado um Espectrofotômetro UV-Vis (Gold Spectrum lab 53 UV-Vis spectrophotometer, BEL photonics, Brasil) operando na região de 200 a 800 nm.

### 3.2.5. Caracterização dos extratos via RMN

Para a análise do perfil metabólico por Ressonância Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN) de *Undaria pinnatifida* e *Sargassum filipendula*, os extratos em metanol 80% de *U. pinnatifida* e em acetona 80% de *S. cymosum* foram concentrados em rotaevaporador e posteriormente liofilizados. Estes extratos secos foram posteriormente solubilizados em 700  $\mu\text{L}$  de metanol deuterado para *U. pinnatifida* e acetona deuterada para *S. filipendula* e centrifugados (5000 rpm, 5 min). O sobrenadante (650  $\mu\text{L}$ ) foi transferido para tubos de RMN (5mm  $\varnothing$  interno) para obtenção de espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ( $^1\text{H}$ -RMN). Os espectros foram adquiridos em espectrômetro Bruker Avance DRX 400 (Bruker GmbH, Rheinstetten, Germany), operando em frequência de ressonância de 400.13MHz e equipado com uma sonda de detecção inversa de 5 mm. Para cada amostra, 16 scans (FIDs) foram recuperados ( $T = 300\text{K}$ ) com os seguintes parâmetros: 64 k pontos de dados; duração do pulso 8.5  $\mu\text{s}$  ( $90^\circ$ ), comprimento espectral de 6000 Hz, tempo de aquisição de 7.5 s e tempo de relaxação de 10 s. Para o processamento dos espectros, 64 k pontos de dados foram usados e uma função de multiplicação exponencial associada a um fator de alargamento de linha de 0.5 Hz foi aplicada previamente à transformação de Fourier. Os espectros foram processados e analisados utilizando-se o software Chenomx Inc. e seu banco de dados. Tetrametil-silano (TMS, 0.024%) foi usado como padrão interno em  $\delta$  ( $^1\text{H}$ ) 0.0 ppm.

### 3.2.6. Análises estatísticas

Os dados de tempo de duplicação, velocidade máxima e concentração foram transformados para  $\log(x+1)$  para homogeneização de variância e normalização de dados. A homocedasticidade foi avaliada

pelo teste de Bartlett. Os dados da cinética microbiana foram submetidos a análises de variância fatorial ( $p < 0,05$ ). Em caso de diferenças significativas, foi utilizado o teste de separação de médias HSD de Tukey. As análises foram realizadas utilizando o programa STATISTICA (Versão 8.0).

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Efeito dos extratos no crescimento de *Lactobacillus plantarum*

As concentrações de 0,25 e 5 mg mL<sup>-1</sup> de extrato aquoso de *Undaria pinnatifida*, o crescimento da bactéria foi inibido. Os extratos metanólicos de *U. pinnatifida* (5 a 10 mg mL<sup>-1</sup>) estimularam o crescimento bacteriano em relação ao controle, enquanto o extrato acetônico (10 mg mL<sup>-1</sup>) apresentou efeito inverso (Tabela 2).

Não foram observadas diferenças significativas no crescimento bacteriano nas diferentes concentrações do extrato aquoso da *Sargassum filipendula*. O extrato acetônico de *S. filipendula* estimulou o crescimento de *L. plantarum* em todas as concentrações. O extrato metanólico inibiu o crescimento da bactéria a partir da concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup>, sendo observada a morte de *L. plantarum* a partir de 5,0 mg mL<sup>-1</sup>. Foi observado que quanto maior o valor de tempo de duplicação, maior inibição do crescimento da bactéria (Tabela 2). Os resultados de tempo de duplicação praticamente se repetiram nos resultados de velocidade máxima, como esperado. Nesse caso, quanto maior o valor, maior a velocidade de multiplicação da bactéria, demonstrando que o crescimento foi estimulado (Tabela 3).

**Tabela 2** - Efeito da concentração de extratos (aquoso, metanólico e acetônico) de *Undaria pinnatifida* e *Sargassum filipendula* no tempo de duplicação de crescimento (tdup) de *Lactobacillus plantarum*. Os valores apresentados correspondem a média  $\pm$  desvio padrão.

Tempo de duplicação						
<i>U. pinnatifida</i>						
	Controle	0,25 mg mL <sup>-1</sup>	0,50 mg mL <sup>-1</sup>	1,0 mg mL <sup>-1</sup>	5,0 mg mL <sup>-1</sup>	10 mg mL <sup>-1</sup>
<b>Aq</b>	5,88 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	7,13 $\pm$ 0,21 <sup>Cc</sup>	5,90 $\pm$ 0,04 <sup>Cab</sup>	6,02 $\pm$ 0,14 <sup>Cab</sup>	6,38 $\pm$ 0,49 <sup>Cb</sup>	6,01 $\pm$ 0,20 <sup>Cab</sup>
<b>Mt</b>	5,88 $\pm$ 0,26 <sup>d</sup>	5,74 $\pm$ 0,06 <sup>Acd</sup>	5,89 $\pm$ 0,03 <sup>Ad</sup>	5,68 $\pm$ 0,06 <sup>Abcd</sup>	5,41 $\pm$ 0,09 <sup>Aab</sup>	5,57 $\pm$ 0,05 <sup>Aabc</sup>
<b>Ac</b>	5,88 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	6,22 $\pm$ 0,12 <sup>Ba</sup>	5,83 $\pm$ 0,11 <sup>Ba</sup>	5,60 $\pm$ 0,07 <sup>Ba</sup>	5,60 $\pm$ 0,14 <sup>Ba</sup>	8,29 $\pm$ 1,74 <sup>Bb</sup>
<i>S. filipendula</i>						
	Controle	0,25 mg mL <sup>-1</sup>	0,50 mg mL <sup>-1</sup>	1,0 mg mL <sup>-1</sup>	5,0 mg mL <sup>-1</sup>	10 mg mL <sup>-1</sup>
<b>Aq</b>	5,88 $\pm$ 0,26	5,21 $\pm$ 0,10 <sup>A</sup>	5,23 $\pm$ 0,09 <sup>A</sup>	5,10 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	5,53 $\pm$ 0,09 <sup>A</sup>	5,66 $\pm$ 0,18 <sup>A</sup>
<b>Mt</b>	5,88 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	5,57 $\pm$ 0,07 <sup>Ba</sup>	5,49 $\pm$ 0,07 <sup>Bab</sup>	6,58 $\pm$ 0,30 <sup>Bb</sup>	-	-
<b>Ac</b>	5,88 $\pm$ 0,26 <sup>c</sup>	5,40 $\pm$ 0,07 <sup>Aa</sup>	5,40 $\pm$ 0,10 <sup>Aa</sup>	5,53 $\pm$ 0,08 <sup>Ab</sup>	5,37 $\pm$ 0,10 <sup>Aa</sup>	5,53 $\pm$ 0,25 <sup>Aab</sup>

Aq- Aquoso; Mt- Metanólico; Ac- Acetônico.

Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações e as letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os extratos.

**Tabela 3** - Efeito da concentração de extratos (aquoso, metanólico e acetônico) de *Undaria pinnatifida* e *Sargassum filipendula* na velocidade máxima de crescimento de *Lactobacillus plantarum*. Os valores apresentados correspondem a média  $\pm$  desvio padrão.

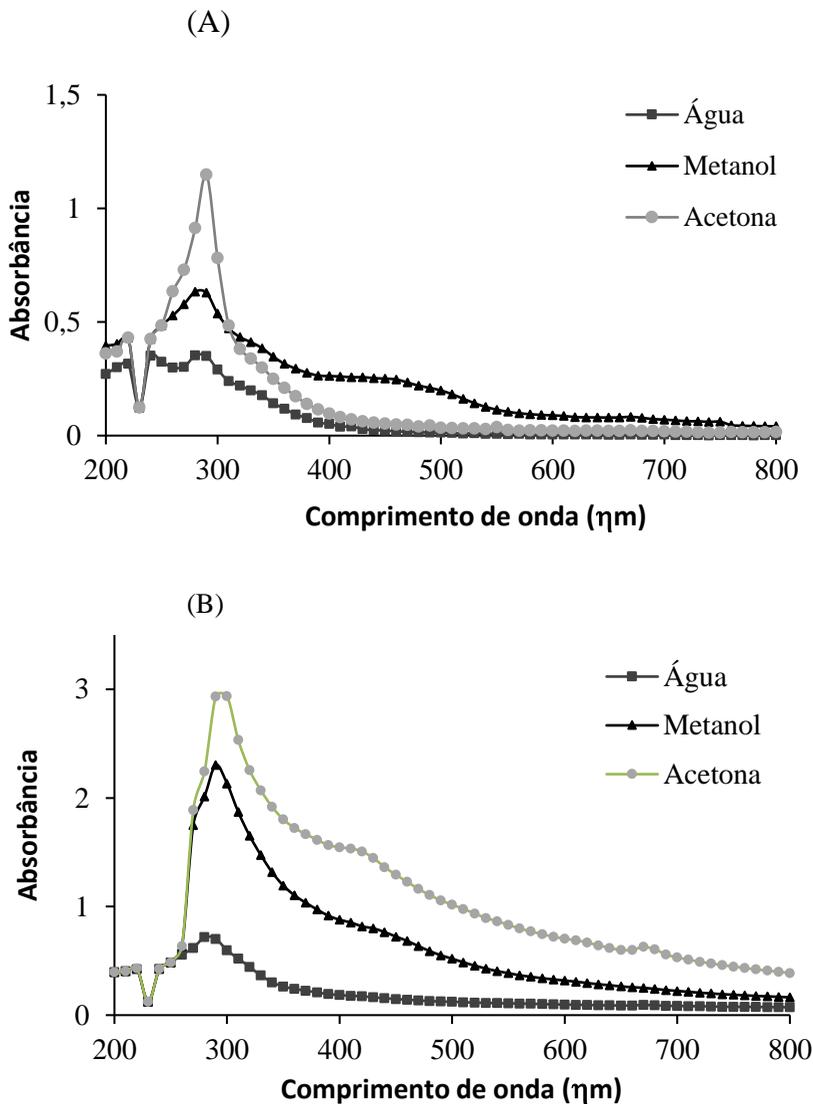
Velocidade máxima						
<i>U. pinnatifida</i>						
Controle	0,25 mg mL <sup>-1</sup>	0,50 mg mL <sup>-1</sup>	1, mg mL <sup>-1</sup>	5,0 mg mL <sup>-1</sup>	7,5 mg mL <sup>-1</sup>	10 mg mL <sup>-1</sup>
Aq	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,09 $\pm$ 0,00 <sup>Cc</sup>	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>Cab</sup>	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>Cab</sup>	0,10 $\pm$ 0,00 <sup>Cb</sup>	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>Cab</sup>
Mt	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	0,12 $\pm$ 0,00 <sup>Abc</sup>	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>Ac</sup>	0,12 $\pm$ 0,00 <sup>Abc</sup>	0,12 $\pm$ 0,00 <sup>Aa</sup>	0,12 $\pm$ 0,00 <sup>Aab</sup>
Ac	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>Ba</sup>	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>Ba</sup>	0,12 $\pm$ 0,00 <sup>Ba</sup>	0,12 $\pm$ 0,00 <sup>Ba</sup>	0,08 $\pm$ 0,02 <sup>Bb</sup>
<i>S. filipendula</i>						
Controle	0,25 mg mL <sup>-1</sup>	0,50 mg mL <sup>-1</sup>	1,0 mg mL <sup>-1</sup>	5,0 mg mL <sup>-1</sup>	7,5 mg mL <sup>-1</sup>	10 mg mL <sup>-1</sup>
Aq	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>	0,13 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>	0,13 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>	0,12 $\pm$ 0,0 <sup>A</sup>	0,12 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>	0,12 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>
Mt	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>B<sup>a</sup></sup>	0,12 $\pm$ 0,00 <sup>Ba</sup>	0,12 $\pm$ 0,00 <sup>Ba</sup>	-	-	-
Ac	0,12 $\pm$ 0,00 <sup>A<sup>d</sup></sup>	0,13 $\pm$ 0,00 <sup>Aab</sup>	0,13 $\pm$ 0,00 <sup>Aab</sup>	0,13 $\pm$ 0,00 <sup>Aab</sup>	0,13 $\pm$ 0,00 <sup>Aa</sup>	0,13 $\pm$ 0,00 <sup>Aabc</sup>

Aq- Aquoso; Mt- Metanólico; Ac- Acetônico.

Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as concentrações e as letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os extratos.

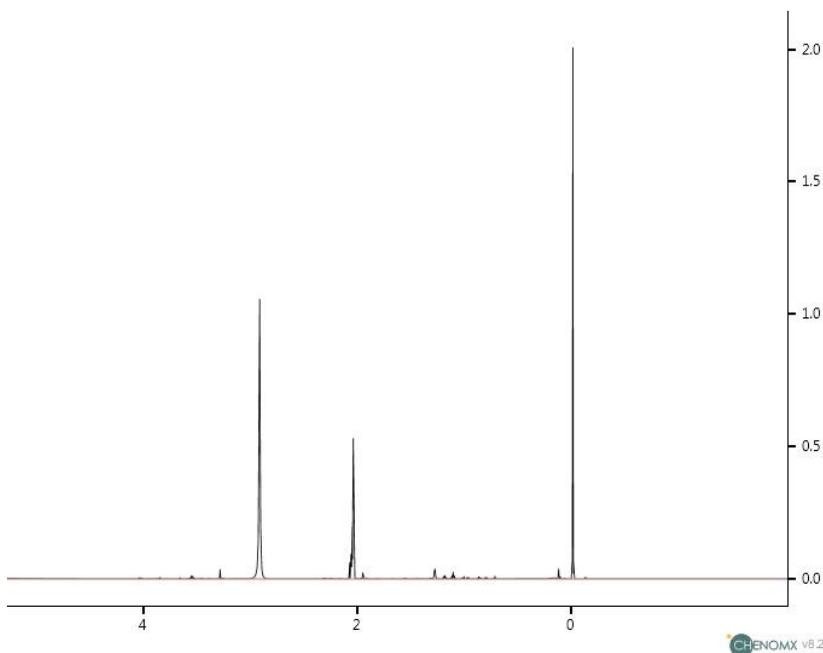
### 3.3.2. Espectrofotometria de varredura UV-visível

Para ambas as espécies, foi observado que a água foi o solvente com menor eficiência na extração de compostos de interesse (Figuras 1 (A) e (B)). Em extratos de *S. filipendula* (Figura 1 (A)) foi observado um pico com maior absorção entre 250 e 350 nm nos extratos metanólico e acetônico, sendo mais acentuado no extrato acetônico. No extrato metanólico foi observado ainda absorbâncias nas regiões entre 400 e 550 nm. Os perfis espectrais UV-vis obtidos nos extratos de *U. pinnatifida* (Figura 1 (B)) foram semelhantes aos de *S. filipendula*, com picos máximos de absorção entre 250 e 350 nm e 400 e 550 nm para os extratos metanólicos e acetônicos. Foi ainda observado absorbâncias significativas no intervalo entre 670 e 690 nm



### 3.3.3. Ressonância magnética nuclear (RMN)

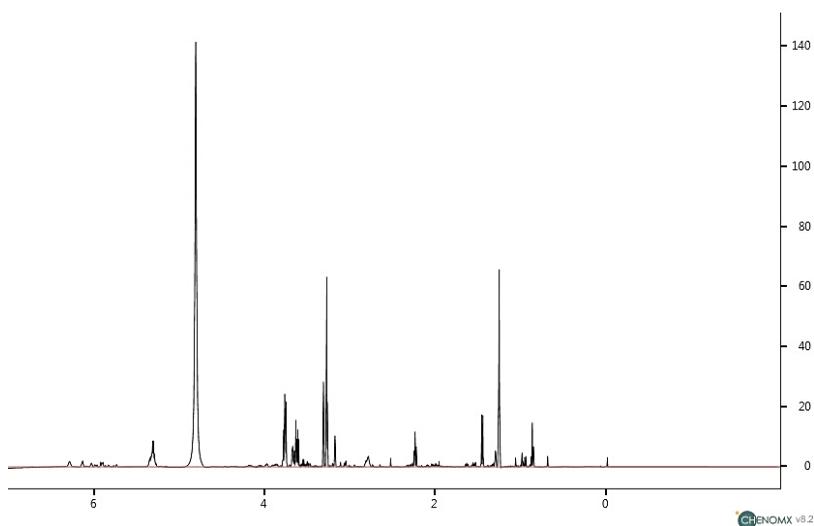
Para auxiliar no processo de identificação dos compostos obtidos por  $^1\text{H}$ -RMN, o banco de dados espectrais disponíveis no software Chenomx foi acessado. O perfil espectral de  $^1\text{H}$ -RMN de *S. filipendula* pode ser observado na Figura 2. As concentrações de sinais encontrados correspondem a região alifática do espectro (0,5 ppm a 3,0 ppm). Sinais detectados em 2,1 ppm (possível triplete) 2,9 ppm (singlete) apresentaram maiores intensidade de sinal. No entanto, os deslocamentos químicos encontrados do perfil espectral de *S. filipendula* não foram associados a nenhum dos compostos disponíveis no banco de dados.



**Figura 2** - Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  do extrato acetônico de *Sargassum filipendula*. Sinal em 0.0ppm corresponde ao padrão interno tetrametilsilano (TMS).

A Figura 3 apresenta o espectro de  $^1\text{H}$  do extrato metanólico de *Undaria pinnatifida*. Os picos desse extrato são mais intensos que os observados no extrato acetônico de *S. filipendula*, com uma maior riqueza de deslocamentos químicos. Muitos deslocamentos químicos se

concentraram na região espectral de compostos alifáticos (0,5 a 3 ppm). Deslocamentos químicos na região de 4 a 5 ppm provavelmente indicam a presença de compostos nitrogenados. Os deslocamentos químicos observados na região de 5,5 a 6,5 ppm podem estar associados a pigmentos e compostos fenólicos (Fan, 1996). Utilizando a base de dados do software Chenomx, é possível inferir a presença dos seguintes compostos: aminoácidos (alanina, glicina e metionina), ácidos orgânicos (acetato, piruvato e malonato) carboidratos (frutose, glucose, fucose e manose) e compostos orgânicos com função álcool (glicerol e manitol).



**Figura 3** – Espectro de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  do extrato metanólico de *Undaria pinnatifida*. Sinal em 0,0ppm corresponde ao padrão interno tetrametilsilano (TMS).

### 3.4. Discussão

Para os extratos de ambas as espécies, foram observadas absorvâncias significativas em duas principais regiões do espectro UV-vis: entre 250 e 350 nm, 400 – 550 nm e para extratos de *U. pinnatifida* também em 600 e 700 nm. A primeira região é caracterizada por compostos que absorvem luz na região do ultravioleta (UV), como os florotaninos, que são uma classe de compostos fenólicos típicos de algas

pardas. Estes compostos, segundo Solovchenko e Merlzlyak (2008) possuem duas bandas de absorção na região do UV, entre 240 e 280 nm. Esta classe de compostos apresenta uma grande diversidade química e divide-se em polifenóis, fenóis simples ou ácidos. Os compostos fenólicos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis (Brand-Williams; Cuvelier; Berset, 1995). Estes metabólitos têm grande importância nos processos fisiológicos e nas algas marinhas estão envolvidos na proteção contra a radiação UV, defesa anti-herbivoria, resistência a patógenos e defesa contra o crescimento de epífitas (Amsler; Fairhead, 2006).

Segundo Adam et al. (1998) a presença de compostos fenólicos justifica a atividade antimicrobiana de extratos de algas e plantas. Na região espectral de 290 a 380 nm, estão presentes os compostos fenólicos que contribuem à absorção da luz UV, além de ácidos nucleicos e proteínas (Bachereau et al. 1998). No presente trabalho, o extrato metanólico de *S. filipendula* inibiu o crescimento da bactéria probiótica, fato este que pode estar relacionado a ação antimicrobiana e antioxidante dos compostos fenólicos (em especial os florotaninos) encontrados na espécie. Em contrapartida, segundo Ibtissam et al. (2009), ao utilizarem o extrato metanólico de *Sargassum vulgari*, não foi observado atividade antibacteriana nem o estímulo do crescimento contra as bactérias *Escherichia coli* (Gram -) e *Staphylococcus aureus* (Gram +). Estes resultados não corroboram ao encontrado no presente trabalho, onde o extrato metanólico de *U. pinnatifida* estimulou o crescimento da bactéria probiótica, que é uma bactéria Gram positiva. Osman et al. (2010), verificaram a ação antibacteriana de extratos metanólicos, acetônicos e etanólicos de nove espécies de algas (vermelhas, pardas e verdes), concluindo que os extratos acetônicos mostraram maior atividade bioativa do que os metanólicos, que por sua vez foram mais eficientes que o etanólico. Todas as algas e extratos apresentaram ação contra as bactérias Gram positivas e negativas, sendo comparável ao resultado do presente trabalho, onde o extrato acetônico de *Undaria pinnatifida* inibiu o crescimento bacteriano. Segundo Lopes (2014) a porcentagem de florotaninos nas algas é afetada pelo seu tamanho, idade, salinidade e temperatura da água, estação do ano e intensidade de luz.

O estímulo ao crescimento da bactéria probiótica com o extrato acetônico de *S. filipendula* foi observado no presente trabalho. Os resultados encontrados são interessantes, uma vez que como citado anteriormente, grande parte dos trabalhos presentes na literatura apontam para o efeito inibitório ao crescimento bacteriano dos extratos de

macroalgas. No entanto, trabalhos combinando o uso de *Laminaria japonica* (alga parda) e probióticos tem demonstrado efeito protetor do trato intestinal humano (Ko et al. 2014a) e de ratos (Ko et al. 2014b), bem como o estímulo do crescimento de bactérias probióticas, incluindo *L. plantarum*.

Ainda, para ambas as espécies, a presença de compostos que absorvem na região da luz visível entre 400 e 550 nm foi observado, indicando a presença de clorofila e carotenoides (Solovchenko e Merlzlyak, 2008). A presença de clorofila pode também estar contribuindo para as absorvâncias na região do vermelho do espectro visível, entre 670 e 690 nm (Roleda et al. 2006). Alguns trabalhos têm apontado a fucoxantina, um carotenoide exclusivo de algas pardas e diatomáceas, como princípio ativo de vários extratos. Existe na literatura diversos trabalhos que indicam os efeitos benéficos da fucoxantina, além de suas propriedades antioxidantes, anticancerígena, anti-hipertensiva, anti-obesidade e anti-inflamatória, bem como o efeito protetivo de algumas linhagens celulares (Peng, et al. 2011).

Como os melhores resultados em relação aos parâmetros de crescimento da bactéria probiótica foram em relação aos extratos metanólicos de *U. pinnatifida* e acetônico de *S. filipendula*, os mesmos foram submetidos à ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H, a fim de caracterizar os metabólitos possivelmente relacionados ao estímulo do crescimento bacteriano. Essa caracterização, mesmo que preliminar, indicou a presença de aminoácidos, ácidos orgânicos, carboidratos e compostos com função álcool presentes no extrato metanólico de *U. pinnatifida*. Embora espectros de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C sejam necessários para confirmar a identidade de alguns compostos, pode-se observar a presença de fucose, manose e manitol que são compostos de reserva característicos do grupo de algas pardas. Fucose e manose, por exemplo, são carboidratos que compõe as fucoidanas, polissacarídeos presentes nas paredes celulares de algas pardas. Estes polissacarídeos são sulfatados e a sua composição é variável entre as espécies de algas pardas (Li et al. 2008). Estes polissacarídeos são relacionados a diversas atividades biológicas, como atividade anticoagulante e antitrombótica, antioxidante, antiviral, antitumoral, gastro e hepatoprotetiva, entre outras (Li et al. 2008).

Em relação ao extrato de *S. filipendula*, somente o espectro de <sup>1</sup>H não foi o suficiente para o apontamento da identidade dos compostos presentes no extrato. Além da necessidade de um espectro de <sup>13</sup>C para a identificação dos compostos, a falta de uma base de dados de organismos

marinhos dificulta o processo de identificação das estruturas químicas presentes nestes organismos.

Os resultados deste trabalho indicam os efeitos do estímulo de dois extratos no crescimento da bactéria probiótica *L. plantarum*: o extrato metanólico de *U. pinnatifida* e acetônico de *S. filipendula*. Embora não se possa atribuir esta atividade a um único composto, as técnicas utilizadas para a caracterização química destes extratos (varredura UV-vis e 1H-RMN) evidenciaram a presença de compostos fenólicos, carotenoides e carboidratos que conhecidamente apresentam atividades biológicas, como a atividade antioxidante, que pode ter contribuído para o crescimento bacteriano.

## Referências

- Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis, M (1998). Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. Hirtum, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1739- 1745.
- Aly S (2009). Probióticos e aquicultura. Revisões CAB: Perspectivas na Agricultura, Veterinária Ciência, Nutrição e Res naturalources, 4 (074): 1-16.
- Amsler C, Fairhead V (2006) Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Advances in Botanical Research* 43:1-91.
- Ashenafi M, Busse M, Growth, (1991). Potential of *Salmonella infantis* and *Escherichia coli* in fermenting tempeh made from horsebean, pea and chickpea and their inhibition by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Science of Food and Agriculture* 55: 607-615.
- Bachereau F, Marigo G, Asta J (1998). Effects of solar radiation (UV and visible) at high altitude on CAM-cycling and phenolic compound biosynthesis in *Sedum album*. *Physiologia Plantarum* 104: 203-210.
- Balcázar JL, de Blas I, Cunningham D, Vendrell D and Múzquiz JL. (2006). The role of probiotic in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114: 173 -186.

Barroso F, Rodrigues J, Torres W, Sampaio A, Farias W (2007). Effect of sulfated polysaccharides extracted from the red marine alga *Botryocladia occidentalis* in shrimp post-larvae (*Litopenaeus vannamei*). *Revista Ciência Agronômica*, 38: 58-63.

Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lwt - Food Science and Technology*, 28: 25-30.

Chakraborty K, Thilakan B, Raola V (2014). Polyketide Family of novel antibacterial 7-o-methyl-5'-hydroxy-3'-heptenoate-macrolactin from seaweed associated *Bacillus subtilis* MTCC 10403. *Journal Agricultural and Food Chemistry*.

Chiu C, Guu Y, Liu C, Pan T, Cheng W (2007). Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23: 364-377.

Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K, Phongdara A (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture* 30:233-237.

Coronel L (2016) Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de algas frente a bactérias patogênicas para aquicultura. Dissertação Universidade Federal de Santa Catarina.

Cruz-Suárez L, Tapia-Salazar M, Nieto-López M, Ricque-Merie D (2008). A review of the effects of macroalgae in shrimp feeds and in co-culture. In: Cruz-Suárez L, Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López M, Cavazos D, Lazo J (eds) *Avances en Nutrición Acuícola IX*. UANL, Monterrey, 304-333.

Fan T (1996). Metabolite profiling by one- and two-dimensional RMN analysis of complex mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 28: 161-219.

Food and agriculture organization of United Nations (2016). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Roma: Food Microbiol, 511 – 518.

Fu YW, Hou WY, Yeh ST, Li CH, Chen JC (2007). The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish and Shellfish Immunology, 22:673-685.

Huang X, Zhou H & Zhang H (2006). The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharidae extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Fish and Shellfish Immunology, 20: 750-757.

Ibtissam C, Hassane R, Jose M, Francisco D, Antonio G, Hass B, Mohamed K (2009). Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. African Journal of Biotechnology, 8:1258-1262

Immanuel G, Sivagnanavelmurugan M, Marudhupandi T, Radhakrishnan S, Palavesama A (2012). The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune 99 activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). Fish and Shellfish Immunology, 32:551-564.

Ko SJ, Kim J, Han G, Kim SK, Kim HG, Yeo I, Ryu B, Park JW (2014a). *Laminaria japonica* Combined with Probiotics Improves Intestinal Microbiota: A Randomized Clinical Trial. Journal Of Medicinal Food, 17:76-82.

Ko SJ, Bu Y, Bae J, Bang Y, Kim J, Lee H, Joon L, Hyun Y, Park J (2014b). Protective Effect of *Laminaria japonica* with Probiotics on Murine Colitis. Mediators of Inflammation, 2014: 1-10.

Li B, Lu F, Wei X, Zhao R (2008). Fucoidan: Structure and Bioactivity. Molecules, 13(8): 1671-1695.

Lopes G (2014). Seaweeds from the Portuguese coast: chemistry, antimicrobial and anti-inflammatory capacity. Universidade do Porto.

Madigan M, Martinko J, Parker J. (2004) Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 991.

Muck R (1996). Silage Inoculation. Informational Conference with Dairy and Forage Industries. Dairy Forage Research Center, 43-51.

Osman M, Abushady A, Elshobary M (2010). In vitro screening of antimicrobial activity of extracts of some macroalgae collected from Abu-Qir bay Alexandria, Egypt. *African Journal of Biotechnology*, 9:7203-7208.

Peng J, Yuan JP, Wu CF and Wang JH (2011). Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweed and diatoms: metabolism and bioactives relevant to human health. *Marine Drugs*, 9:1806–1828.

Roleda M, Clayton M, Wiencke C (2006). Screening capacity of UV-absorbing compounds in spores of Arctic Laminariales, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 338:123-133.

Solovchenko AE, Merzlyak MN (2008). Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 55 (6) 7–19.

Thanigaivel S, Chandrasekaran N, Mukherjee A, Thomas J (2016) Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture* 464: 529-536.

Van Hai N (2015). The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture. *Aquaculture*, 446: 88-96.

Vieira FN, Pedrotti FS, Buglione CC, Mouriño JLP, Beltrame E, Martins ML, Ramires C, Vinatea LA (2007) Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Brazilian Journal of Oceanography*, 55: 251-255.

Vieira FN; Jatobá A, Mourino JLP, Vieira PA, Soares M, Silva BC, Seiffert WQ, Martins ML, Vinatea LA (2013). *In vitro* selection of bacteria with potential for use as probiotics in marine shrimp culture. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 48: 998-1004.

Wang T, Jónsdóttir R, Ólafsdóttir G (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116: 240- 248.

Yeh S, Lee C, Chen J (2006). Administration of hotwater extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the

immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 20: 332-345.

**4. CAPITULO 2: Efeito combinado de duas macroalgas pardas e probióticos no crescimento do camarão-branco-do-pacífico e sua resistência ao *Vibrio***

Marina Cristina Calinowski<sup>1</sup>, Norha Constanza Bolívar Ramírez<sup>1</sup>, Fernanda Ramlov<sup>2</sup>, Marcelo Maraschin<sup>2</sup>, Luis Alejandro Vinatea Arana<sup>1</sup>, Felipe de Nascimento Vieira<sup>1</sup>, Leila Hayashi<sup>1</sup>

Marina Cristina Calinowski  
+55 48 98853-2020, marinacalinowski@hotmail.com

<sup>1</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos, Servidão dos Coroas, 503, Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

## Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso em conjunto do probiótico *Lactobacillus plantarum* e de macroalgas *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida* no desempenho do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* e resistência após desafio com *Vibrio parahaemolyticus*. As algas secas foram incorporadas na ração resultando em 3 dietas: a) macroalgas *U. pinnatifida* (2%) + *S. filipendula* (0,5%) b) macroalgas *U. pinnatifida* (2%) + *S. filipendula* (0,5%) + probiótico, c) probiótico. Como controle, foi utilizado somente a ração sem aditivos. Os camarões foram alimentados durante 4 semanas e os parâmetros zootécnicos e a microbiota intestinal foram avaliados. Posteriormente, os camarões foram desafiados com *V. parahaemolyticus*, e depois de 24 h foi avaliada a sobrevivência. Após 4 semanas, não houve diferença significativa nos parâmetros zootécnicos nos diferentes tratamentos e controle. Nas contagens de *Vibrio* spp. e bactérias heterotróficas totais do trato intestinal tampouco houve diferenças significativas entre os tratamentos. Contudo, a contagem de bactérias ácido lácticas foi superior no trato intestinal dos camarões que receberam probiótico. Após oito horas do desafio com *V. parahaemolyticus* os camarões começaram a apresentar as primeiras mortalidades. Após 24 h, não foram observadas diferenças na sobrevivência entre os diferentes tratamentos e controle. Conclui-se que a inclusão de macroalgas não afetou o desempenho zootécnico do camarão e nem aumentou a sobrevivência após o desafio com *V. parahaemolyticus*. A adição do probiótico *L. plantarum* na dieta aumentou a contagem de bactérias ácido lácticas no intestino do camarão, sem alterar as contagens de *Vibrio* spp. e bactérias heterotróficas totais no intestino.

Palavras-chave: Aquicultura, *Litopenaeus vannamei*, probiótico, macroalgas, *Vibrio* spp.

## Abstract

The present work aimed to evaluate the use of probiotic *Lactobacillus plantarum* and the seaweeds *Sargassum filipendula* and *Undaria pinnatifida* in marine shrimp *Litopenaeus vannamei* growth performance and its resistance against *Vibrio parahaemolyticus*. The additives were incorporated in the shrimp feed, resulting in three diets: a) seaweed *U. pinnatifida* (2%) + *S. filipendula* (0.5%), b) seaweed *U. pinnatifida* (2%) + *S. filipendula* (0.5%) + probiotic, c) probiotic. As control shrimp feed without additives was used. Shrimps were fed for four weeks and zootechnical parameters and intestinal microbiota were analyzed. Subsequently, a challenge with *V. parahaemolyticus* was done and the survival rate was evaluated. No significant differences were observed among the treatments and control in growth performance of the shrimp or in the *Vibrio* spp. and total heterotrophic bacteria counting in the midgut. However, lactic bacteria count was higher in the shrimp fed with probiotics. In the experimental challenge with *V. parahaemolyticus*, the first mortality began to happen after eight hours, and after 24 h, no significant difference in the mortality rate was found between the treatments and control. We conclude that the addition of seaweeds did not affect the shrimp growth performance, nor increased the shrimp survival after challenge with *V. parahaemolyticus*. The addition of probiotic *L. plantarum* in the diet improves the total lactic acid bacteria counting in the intestinal tract of *L. vannamei*, without changing the *Vibrio* spp. and total heterotrophic bacteria counts.

Keywords: Aquaculture, *Litopenaeus vannamei*, probiotic, seaweed, *Vibrio* spp.

## 4.1. Introdução

Devido ao cenário de enfermidades virais e bacterianas que afeta as fazendas marinhas de camarões nos últimos anos, diversos trabalhos têm sido realizados para desenvolver diferentes formas de tratamento e/ou prevenção. A utilização de prebióticos, probióticos, suplementos alimentares, micro e macroalgas é destacada dentro desse contexto. A utilização de macroalgas, em particular, tem sido explorada devido a suas propriedades nutricionais, imunoestimulantes, antivirais, antibacterianas e de indução do crescimento para camarões marinhos (Cruz-Suárez et al. 2008; Fleurence et al. 2012; Immanuel et al. 2012).

As macroalgas dos gêneros *Sargassum* e *Undaria* pertencem ao grupo das algas pardas (Classe Phaeophyceae). As algas pardas possuem alto valor nutricional e grande diversidade de compostos bioativos. Devido a esses compostos, a aplicação desse grupo de algas como ingrediente nutricional para alimentação humana e animal tem crescido nos últimos anos (Fleurence et al. 2012; Miyashita et al. 2013; Thanigaivel et al. 2016). Esse grupo se destaca pelas propriedades terapêuticas de seus compostos bioativos, principalmente os polissacarídeos, fenóis e polifenóis, lipídeos e os terpenoides (Liu et al., 2012; Sinurat et al. 2012). Schleder et al. (2017) observaram que a inclusão de 0,5% e 2% de *S. filipendula* na ração de camarão marinho aumentou a resistência dos animais ao choque térmico, e que a inclusão combinada de 0,5% de *S. filipendula* e 2% *U. pinnatifida* na ração do camarão diminuiu a mortalidade quando comparado aos não suplementados após o desafio com o vírus da mancha branca. Entretanto, o uso combinado dessas duas espécies para desafio com vibrios ainda não foi verificada.

Assim como as macroalgas, os probióticos possuem um importante papel na aquicultura. Os probióticos possuem capacidade de diminuir bactérias patogênicas, modificando a microbiota intestinal e permitindo a colonização de bactérias boas, melhorando assim a saúde do animal (Ringo et al. 1998). Essas bactérias competem por nutrientes e, desse modo, inibem o crescimento de *Vibrio* e de outras bactérias, permitindo que bactérias resistentes não transfiram genes de resistência e nem se multipliquem (Hong et al. 2005). Ao colonizar o trato intestinal, os probióticos inibem os patógenos e são capazes de estimular o sistema imunológico do hospedeiro por possuírem em suas paredes celulares  $\beta$ -glucanos, lipopolissacarídeos e peptidoglicanos agindo como moléculas sinalizadoras para ativar o sistema imune (Pérez-Sánchez et al. 2014; Akhter et al. 2015).

Segundo Chiu et al. (2007), a bactéria *Lactobacillus plantarum* demonstrou ser benéfica para o camarão *L. vannamei* pois auxiliou na resposta imune humoral e celular após desafio com *V. alginolyticus*. Além disso Vieira et al (2016) observaram que esse mesmo probiótico modificou a microbiota bacteriana intestinal de camarões cultivados em fazendas, diminuiu a população de *Vibrio* spp. e aumentou a quantidade de bactérias ácido lácticas.

Sendo assim, objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso de macroalgas na ração do camarão branco do Pacífico com e sem adição da bactéria *Lactobacillus plantarum* em relação ao peso final, ganho de peso semanal, conversão alimentar e sobrevivência após desafio com *Vibrio parahaemolyticus*.

## 4.2. Material e Métodos

### 4.2.1. Preparação das dietas

Para a preparação das dietas, foi utilizada a ração formulada e utilizada em experimentos prévios realizados no Laboratório de Camarões Marinhos com 30% de proteína. As algas secas e trituradas foram adicionadas na ração moída que posteriormente foi repeletizada. A ração controle passou pelo mesmo procedimento sem a adição das algas. Após esse processo, a ração foi seca em estufa com ventilação por 20 h em temperatura de 35 °C.

Os tratamentos foram divididos nas seguintes dietas experimentais: a) macroalgas *Undaria pinnatifida* (2%) + *Sargassum filipendula* (0,5%) (Tratamento A) segundo Scheleder et al. (2017), b) macroalgas *Undaria pinnatifida* (2%) + *Sargassum filipendula* (0,5%) + probiótico *L. plantarum* (Tratamento A+P), c) probiótico *L. plantarum* (Tratamento P). Como controle (C), foi utilizado somente a ração sem aditivos. As macroalgas foram adicionadas em lugar do Caulim, de acordo com Scheleder et al. (2017). O probiótico foi adicionado na hora de cada alimentação na concentração de 100 mL ( $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) por quilograma, de acordo com a metodologia descrita por Vieira et al. (2008).

### 4.2.2. Testes *in vivo* de camarões alimentados com macroalgas e probiótico

Foram utilizados camarões marinhos da espécie *L. vannamei* provenientes da linhagem *high health* SPEEDLINE HB12, adquirida da

empresa Aquatec Aquacultura Ltda, localizada no Rio Grande do Norte, Brasil. As pós-larvas (PLs) foram transferidas para tanques de 50 toneladas em uma densidade de 1000 PLs m<sup>-3</sup> e cultivados em sistema de bioflocos até atingirem 4,0 ± 0,15 g.

O experimento foi realizado em 16 aquários de 60 L povoados com 15 camarões em cada. Os tratamentos foram executados em delineamento totalmente ao acaso. Os camarões foram alimentados durante quatro semanas e a ração foi fornecida quatro vezes ao dia em uma quantidade equivalente a 3% de biomassa, sendo ajustada semanalmente de acordo com as biometrias.

A temperatura da água foi mantida em 28 ± 1° C (oxímetro YSI modelo Pro20), salinidade em 30‰ (salinômetro digital YSI modelo EC300A) e aeração constante. Foram realizadas análises de pH (pHmetro YSI modelo pH100), nitrito (Strickland e Parsons, 1972) alcalinidade (Apha, 2005) e amônia semanalmente e a água dos tanques foi renovada uma vez ao dia para retirada dos restos de alimento, fezes e mudas. Sendo assim os parâmetros de qualidade de água se mantiveram dentro dos padrões aceitáveis para cultivo de camarões marinhos (Boyd e Gautier, 2000) sem grandes variações de temperatura (29 ± 0,30 °C), oxigênio (6,00 ± 0,05 mg L<sup>-1</sup>), pH (8,25 ± 0,05), amônia (0,75 ± 0,28 mg L<sup>-1</sup>), nitrito (0,008 ± 0,01 mg L<sup>-1</sup>) e alcalinidade (133,25 ± 5,74 mg L<sup>-1</sup>).

#### 4.2.3. Parâmetros zootécnicos

Biometrias semanais foram realizadas (15 animais por tanque) junto com a quantificação do consumo da ração. No final do experimento foi avaliado peso final, ganho de peso semanal, conversão alimentar e sobrevivência, de acordo com as seguintes equações:

$$\text{Ganho de peso semanal (g)} = \frac{\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}}{\text{Semanas}} \quad (3)$$

$$\text{Conversão alimentar (g)} = \frac{\text{Ingestão alimentar (g)}}{\text{Biomassa final (g)}} \quad (4)$$

$$\text{Sobrevivência (\%)} = \frac{\text{Número de animais sobreviventes}}{\text{Número total inicial de animais}} \times 100 \quad (5)$$

#### 4.2.4. *Análise da microbiota intestinal*

Foram amostrados tratos digestivos de cinco camarões por tanque após quatro semanas de cultivo. Os tratos intestinais foram homogeneizados em um graal e diluídos serialmente (1/10) em solução salina estéril 3% e semeados em meio de cultura Agar Marinho, TCBS e Agar MRS para contagem de bactérias heterotróficas totais, *Vibrio* spp. totais e bactérias lácticas totais, respectivamente. Os intestinos semeados nas placas de Petri foram incubados em estufa a 30 °C. Posteriormente, foram efetuadas contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC) após 24 h de incubação nos meios de cultura Agar Marine e Agar TCBS. No meio Agar MRS, as contagens foram feitas após 48 h. Das colônias crescidas em MRS, foi feita a coloração de Gram para comparação morfológica da cepa probiótica.

#### 4.2.5. *Desafio com V. parahaemolyticus*

No final do experimento, 10 camarões de cada tanque foram colocados em recipientes de 20 L de água (salinidade 30‰) para realização do desafio experimental. Em cada camarão, foi injetado na parte dorsal do primeiro segmento abdominal 100 µL de *V. parahaemolyticus* diluído em solução salina em uma concentração de  $3 \times 10^7$  de acordo com a DL50 realizada previamente. Adicionalmente, foi utilizado um grupo controle que foi injetado com solução salina estéril 3%. Após 24 h da infecção foi avaliada a sobrevivência (Vieira, 2007).

#### 4.2.6. *Análises Estatísticas*

Depois de verificadas as premissas de normalidade e homocedasticidade, os dados foram submetidos a análise de variância fatorial suplementada pelo teste Tukey de separação de médias, ambos ao nível de significância de 5%.

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Parâmetros zootécnicos

Após quatro semanas de alimentação com as diferentes dietas, os camarões dos diferentes tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre peso final, ganho de peso semanal (Eq. 3), conversão alimentar (Eq. 4) e sobrevivência (Eq. 5) (Tabela 4).

**Tabela 4** - Parâmetros zootécnicos de *Litopenaeus vannamei* cultivado em água clara e alimentado com diferentes dietas. Valores expressos em média  $\pm$  desvio.

Dietas	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganho de peso semanal (g)	Conversão alimentar	Sobrevivência (%)
Controle	4,50 $\pm$ 0,26	8,12 $\pm$ 0,19	0,91 $\pm$ ,08	1,92 $\pm$ 0,19	90 $\pm$ 6,67
Probiótico (P)	4,5 $\pm$ 0,09	8,19 $\pm$ 0,59	0,92 $\pm$ 0,13	1,89 $\pm$ 0,16	86,67 $\pm$ 9,43
Alga (A)	4,3 $\pm$ 0,09	7,99 $\pm$ 0,29	0,92 $\pm$ 0,08	1,81 $\pm$ 0,12	86,67 $\pm$ 7,70
Alga + probiótico (A+P)	4,33 $\pm$ 0,09	7,90 $\pm$ 0,25	0,89 $\pm$ 0,06	1,85 $\pm$ 0,12	96,67 $\pm$ 3,85

#### 4.3.2. Análise da microbiota intestinal

Para a contagem de v́brios e de bactérias heterotróficas totais no intestino, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. No entanto, as dietas P e A + P apresentaram uma quantidade significativamente maior de bactérias ácido lácticas quando comparados as dietas A e C (Tabela 5).

**Tabela 5-** Contagem microbiológica (log) de intestino de *Litopenaeus vannamei* alimentados com diferentes dietas após quatro semanas de cultivo.

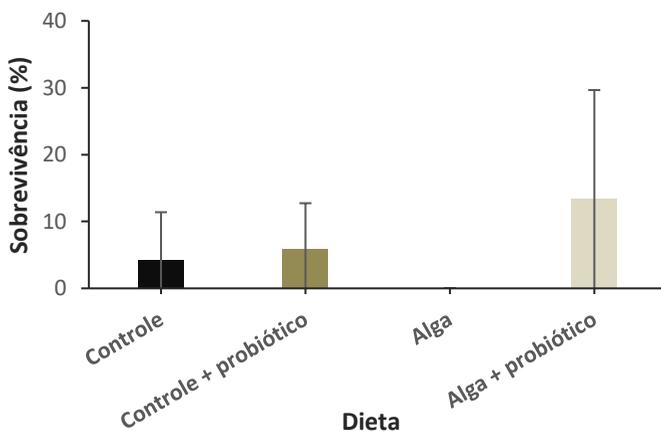
Dietas	Bactéria heterotróficas totais	<i>Vibrio sp.</i>	Bactérias ácido-láticas
Controle	7,87 ± 0,43	5,61 ± 0,19	0,00 ± 0,00 <sup>c</sup>
P	7,55 ± 1,36	5,33 ± 0,23	4,39 ± 0,40 <sup>a</sup>
A	8,20 ± 0,78	5,10 ± 1,10	1,92 ± 1,30 <sup>b</sup>
A +P	7,29 ± 1,06	3,34 ± 1,67	3,72 ± 0,82 <sup>a</sup>

C- Controle; P- Probiótico; A-Alga; A+P- Alga + Probiótico

Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey.

#### 4.3.3 Desafio com *V. parahaemolyticus*

Oito horas após desafio experimental com *V. parahaemolyticus*, os camarões começaram a apresentar os primeiros sintomas de letargia seguido das primeiras mortalidades. Após 24 h, não foram observadas diferenças na sobrevivência entre os diferentes tratamentos (Figura 4).



**Figura 4 -** Sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* após desafio com *Vibrio parahaemolyticus*. Valores expressos em média. As barras verticais indicam o desvio padrão.

#### 4.4. Discussão

O uso de macroalgas como aditivo alimentar nas dietas com adição de probiótico não foi prejudicial aos animais ou as bactérias, e não mostraram diferença significativa na taxa de crescimento, corroborando o estudo de Vieira et al. (2010) onde camarões alimentados com *L. plantarum* não apresentaram diferença no ganho de peso. Porém Niu et al. (2015) relataram que a adição de 1 a 3% somente da alga seca na ração de *U. pinnatifida* potencializou o desempenho zootécnico do camarão *Penaeus monodon* e nas porcentagens de 5 e 6%, resultaram na diminuição no crescimento dos animais. Os efeitos das algas no desempenho zootécnico dos camarões são variáveis, dependendo da espécie utilizada, níveis de inclusão, métodos de processamento e substituição de ingredientes (Cruz-Soárez et al. 2008; Pallaoro et al. 2016; Yu et al. 2016).

Schleder et al (2017) observaram que as algas pardas utilizadas como aditivo alimentar melhoraram a fisiologia digestiva e nas concentrações de 0,5 e 2% de *S. filipendula* aumentaram a resistência dos camarões ao choque térmico, o que pode ser vantajoso para a carcinicultura em regiões com condições climáticas instáveis. Segundo Milledge et al. (2016) e Thanigaivel et al. (2016), as algas pardas apresentam alto teor de compostos bioativos, como fenólicos, fucanos terpenóides e esteróis, que podem ser associados diretamente na resposta imunológica e nas defesas antimicrobianas de diferentes animais.

No presente trabalho, não foi possível provar que a combinação das duas algas com adição de probiótico tenha inibido o *V. parahaemolyticus*, ao contrário do observado por Schleder (2017) em relação ao desafio com o vírus da mancha branca (WSSV), onde a combinação de 0,5% de *S. filipendula* e 2% e 4% de *U. pinnatifida* sem probiótico causou maior resistência nos animais infectados por WSSV em comparação ao grupo não suplementado. Provavelmente, o efeito combinado das duas espécies de macroalgas deve ser diferente em vírus e bactérias.

Os animais que receberam o probiótico *L. plantarum* na dieta apresentaram maiores contagens de bactérias ácidos lácticas no intestino do que os grupos que não receberam, comprovando que a bactéria probiótica consegue manter-se na ração e chegar ao intestino do animal por meio de ingestão de alimento.

Trabalhos prévios similares com *L. vannamei* com adição de *L. plantarum* mostraram que foi possível alterar a microbiota intestinal aumentando a concentração das bactérias ácido lácticas e como

consequência, diminuindo as concentrações de vibrios (Vieira et al. 2010). Segundo Kongnum et al. (2012), camarões *L. vannamei* alimentados com a bactéria probiótica *L. plantarum* apresentaram melhores resultados no controle e prevenção da infecção por *V. harveyi*, além da sobrevivência dos animais ter aumentado, contrário do observado no presente trabalho. Por outro lado, o uso combinado das macroalgas com probióticos não interferiu na sobrevivência após o desafio.

A utilização combinada das duas espécies de macroalgas não interferiu no desempenho do camarão nem das bactérias probióticas, tampouco aumentou a sobrevivência do camarão após desafio com *Vibrio parahaemolyticus*. A adição do probiótico *L. plantarum* na dieta aumentou a contagem de bactérias ácido lácticas no intestino do camarão como esperado, sem alterar as contagens de *Vibrio* spp e bactérias heterotróficas totais.

## Referências

- Akhter N, Wu B, Memon AM, Mohsin M (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. *Fish and Shellfish Immunology*, 45: 733- 741.
- Apha (2005). Standart Methods for the Examination of Water and Wasterwater, 21° ed. American Public Health Association, Washington.
- Boyd C, Gautier D (2000). Effluent composition and water quality standards. *Global Aquaculture Advocate*, 3: 61–66.
- Chiu C, Guu Y, Liu C, Pan T, Cheng W (2007). Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23: 364-377.
- Cruz-Suárez L, Tapia-Salazar M, Nieto-López M, Ricque-Merie D (2008). A review of the effects of macroalgae in shrimp feeds and in co-culture. In: Cruz-Suárez L, Marie D, Tapia-Salazar M, Nieto-López M, Cavazos D, Lazo J (eds) *Avances en Nutrición Acuícola IX*. UANL, Monterrey, 304-333.
- Fleurence J, Morançais M, Dumay J, Decottignies P, Turpin V, Munier M, Garcia-Bueno N, Jaouen P (2012). What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture. *Trends in Food Science and Technology* 27:57-61.

Hong H, Duc le H, Cutting S (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *Fems Microbiology Reviews*, 29(4): 813-835.

Immanuel G, Sivagnanavelmurugan M, Marudhupandi T, Radhakrishnan S, Palavesama A (2012). The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). *Fish and Shellfish Immunology*, 32:551-564.

Kongnum K, Hongpattarakere T (2012). Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish and Shellfish Immunology*, 32: 170-177.

Liu L, Heinrich M, Myers S, Dworjanyn SA (2012). Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: A phytochemical and Pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 142: 591-619.

Milledge J, Nielsen B, Bailey D (2016). High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*. *Food Science and Biotechnology*, 15: 67–88.

Miyashita K, Mikamia N, Hosokawa M (2013). Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: *Journal of Functional Foods*, 5: 1507-1517.

Niu J, Chen X, Lu X, Jiang S, Lin H, Liu Y, Huang Z, Wang J, Wang Y, Tian L (2015). Effects of different levels of dietary wakame (*Undaria pinnatifida*) on growth, immunity and intestinal structure of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 435:78–85.

Pallaoro M, Vieira FN, Hayashi L (2016). *Ulva lactuca* (Chlorophyta Ulvales) as co-feed for Pacific white shrimp. *Journal Applied Phycology*, 28: 3659-3665.

Pérez-Sánchez T, Ruiz-Zarzuola I, Blas I, Balcázar JL (2014). Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Aquaculture*, 6: 133-146.

Ringo E, Gatesoupe F (1998). Lactic acid bacteria in fish: *Aquaculture*, 160: 177-203.

Schleder D, Rosa JR, Guimarães AM, Ramlov F, Maraschin M, Seiffert WQ, Vieira FN, Hayashi L, Andreatta ER (2017). Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on thermal stress resistance, midgut microbiology, and immunology. *Journal of Applied Phycology*, 29: 2471-2477.

Sinurat E, Marraskuranto E (2012). Fucoidan from brown seaweed and its bioactivity. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology* 7:131-138.

Strickland JD, Parsons TR (1972). *Practical Handbook of Seawater Analysis*, 1° ed. Fish Research Board of Canada, Ottawa.

Thanigaivel S, Chandrasekaran N, Mukherjee A, Thomas J (2016) Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture* 464: 529-536.

Vieira FN, Pedrotti FS, Buglione CC, Mouriño JLP, Beltrame E, Martins ML, Ramires C, Vinatea LA (2007) Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. *Brazilian Journal of Oceanography*, 55: 251-255.

Vieira FN, Buglione CC, Mouriño JLP, Jatobá A, Ramires C, Martins ML, Barracco MAAM, Vinatea LA (2008). Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Florianópolis, 43: 763-769.

Vieira FN, Cublione CC, Mouriño JPL, Jatobá A, Martins ML, Schleder DD, Andreatta ER, Barroco MA, Vinatea LA (2010). Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62: 631-638.

Vieira FN, Jatobá A, Mouriño JLP, Buglione CC, Silva JS, Seiffert WQ, Soares M, Vinatea LA (2016). Use of probiotic- supplemented diet on a Pacific white shrimp farm. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 45:203-207.

Yu Y, Chen W, Liu Y, Niu J, Chen M, Tian L (2016). Effect of different dietary levels of *Gracilaria lemaneiformis* dry power on growth performance, hematological parameters and intestinal structure of

juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 450: 356-362.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos metanólico de *Undaria pinnatifida* e acetônicos de *Sargassum filipendula* promoveram o crescimento *in vitro* da bactéria probiótica entretanto, quando essas mesmas espécies eram utilizadas em formato seco na dieta do camarão, esses efeitos não foram repetidos. Da mesma maneira, a combinação de *U. filipendula* a 2% e *S. filipendula* a 0,5% não apresentou efeito no crescimento e sobrevivência do camarão-branco-do-pacífico, como observado para o vírus da Mancha Branca. Provavelmente, a concentração dos extratos nas algas testadas *in vivo* está superior ao observado nas condições *in vitro*, o que pode ter influenciado nos resultados.

A utilização das macroalgas em seu formato seco é a opção mais barata para a indústria, e em alguns casos, tem apresentado bons resultados, como no caso do trabalho de Schleder et al. (2017). Entretanto, novas concentrações e/ou combinações deverão ser utilizadas dependendo da aplicabilidade: desempenho zootécnico, ou sobrevivência a vírus ou bactérias.

Em relação aos extratos, devido a sua eficácia no crescimento *in vitro* das bactérias probióticas, uma opção seria seu uso *in vitro* para incrementar a produção das mesmas, e depois aplicá-las nos cultivos em grande escala. A utilização dos extratos diretamente nos cultivos não é remendada, por requerer grandes volumes e, portanto, um aumento de gastos nos cultivos.



## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

BANSEMIR, A.; BLUME, M.; SCHRÖDER, S.; LINDEQUIST, U. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, v. 252, p. 79-84, 2006.

BHAGAVATHY, S.; SUMATHI, P.; JANCY SHERENE BELL, I. Green algae *Chlorococcum humicola* - a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 1, n. 7, 2011.

BOUZON, J.L.; SALLES, J.P.; BOUZON, Z.; HORTA P.A. Floristic and phytogeographic aspects of the seaweeds of the bays at Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Insula*, n. 35, p. 69-84, 2006.

CHIU, C.H.; GUU, Y.K.; LIU, C.H.; PAN, T.M.; CHENG, W. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, v.23, p.364-377, 2007.

COLLINS, M.D.; GIBSON, G.R. Probiotics, prebiotics, and symbiotic: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.69, p.1052S-1057S, 1999.

DE VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, prebiotics, and symbiotics. *Food Biotechnology*, v.111, p.1-66, 2008.

DEFOIRDT, T.; BOON, N.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOSSIER, P. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology*, v.25, p.472-479, 2007.

FAO (2016) <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production>. Acessado em: 23/12/17.

FEIJÓ, R.G. Prospecção de genes relacionados à ocorrência de enfermidades no camarão *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) sob condições de cultivo. 2009. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

GATESOUBE, F.J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v.14, p.107-114, 2008.

HOLDT, S.L.; KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, v. 23, n. 3, p. 543-597, 2011.

HWANG E.K.; PARK C.E.; BAEK J.M. Artificial seed production and cultivation of the edible brown alga, *Sargassum fulvellum* (Turner). C. Agardh: Developing a new species for seaweed cultivation in Korea. *Journal of Applied Phycology* 18, 251-257, 2006.

LI, B.; LU, F.; WEI, X.; ZHAO, R. Fucoïdan: Structure and Bioactivity. *Molecules*, v. 13, p. 1671-1695, 2008.

LIU L.; HEINRICH M.; MYERS S.; DWORJANYN S. A. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: a phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*, 142, 591-619, 2012.

MACIEL, M.L.T. Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação zootécnica em cultivo de camarão marinho no Estado de Santa Catarina. 2002. 35f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

MADRID, R.M.M. A crise econômica da carcinicultura. *Revista Panorama da Aquicultura*, v. 15, n. 90, 2005.

MAYER, A.M.S.; HAMANN, M.T. Marine pharmacology in 2001-2002. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 140, p. 265-286, 2005.

NEW, M.B.; TIDWELL, V.J.H.; D'ABRAMO, L.R.; KUTTY, M.N. *Freshwater prawns: biology and farming*. Wiley- Blackwell, Oxford, England, 2010, 560 pp, 2010.

PENG, J.; YUAN J.P.; WU, C.F.; WANG, J.H. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweed and diatoms: metabolism and bioactives relevant to human health. *Marine Drugs*, v. 9, 1806–1828, 2011.

PENGZHAN, Y.; QUANBIN, Z.; NING, L.; ZUHONG, X.; YANMEI, W.; ZHIEN, L. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. *Journal of Applied Phycology*, v. 15, p. 21-27, 2003.

PEREIRA, L. Portuguese Seaweeds Website. World-wide Electronic Publication. IMAR, Department of Life Sciences, University of Coimbra, October 20, 2015.

REDMOND, S.; KIM, J.K.; YARISH, C.; PIETRAK.; BRICKNELL, I. Culture of *Sargassum* in Korea: Techniques and Potential for Culture in the U.S. NOAA, Sea Grant & University Of Maine, p. 1-16, 2014.

SCHLEDER, D.D.; ROSA, J.R.; GUIMARÃES, A.M, RAMLOV, F.; MARASCHIN, M.; SEIFFERT, W.Q.; VIEIRA, F.N.; HAYASHI, L.; ANDREATTA, E.R. Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on thermal stress resistance, midgut microbiology and immunology. *Journal of Applied Phycology*, v. 29, p.2471-2477, 2017.