



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Ariane Martins Guimarães

**Farinha de microalgas como ingrediente em dietas para o  
camarão-branco-do-pacífico**

Florianópolis,  
2021

**Ariane Martins Guimarães**

**Farinha de microalgas como ingrediente em dietas para o  
camarão-branco-do-pacífico**

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em  
Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina  
para obtenção do título de doutor em Aquicultura e  
Recursos Pesqueiros.

Orientador: Felipe do Nascimento Vieira  
Coorientadora: Gabriella do Vale Pereira

Florianópolis,

2021

Guimarães, Ariane Martins

Farinha de microalgas como ingrediente em dietas para o camarão-branco-do-pacífico / Ariane Martins Guimarães ; orientador, Felipe do Nascimento Vieira, coorientador, Gabriella do Vale Pereira, 2021.

79 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Litopenaeus vannamei. 3. Microalgas. 4. Ácidos graxos. 5. Ômega 3. I. do Nascimento Vieira, Felipe . II. do Vale Pereira, Gabriella . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Ariane Martins Guimarães**

**Farinha de microalgas como ingrediente em dietas para o  
camarão-branco-do-pacífico**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Felipe do Nascimento Vieira, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. André Luiz Braga de Souza, PhD.  
Universidad Autónoma de Baja California

Prof. Geraldo Kipper Fóes, Dr.  
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

Prof. Rodrigo Carvalho, Dr.  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Aquicultura e Recursos Pesqueiros.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Felipe do Nascimento Vieira Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2021.

## AGRADECIMENTOS

E sou grata a toda minha família pelo apoio, torcida e amor. Grata a Deus pela dádiva da vida e tantas possibilidades boas em minha existência.

Gostaria de agradecer à Universidade Federal de Santa Catarina e ao Laboratório de Camarões Marinhos pela acolhida e oportunidade de realizar meu doutorado, por toda a estrutura e apoio e a CAPES pela bolsa de estudos como apoio financeiro para que eu conseguisse realizar minha pesquisa.

Agradeço a todos do Programa de Pós-graduação em Aquicultura pelo profissionalismo e competência, e por todo apoio dado desde o mestrado, especialmente ao Carlito, sempre atencioso e disposto a nos ajudar. Sou grata ao meu orientador, Felipe, pela parceria, amizade e orientação, bem como grata a ajuda de minha coorientadora Gabriella. Grata pelo apoio da querida profa. Débora e toda sua equipe do LABNUTRI/UFSC, Allan, Katy, Maria Fernanda, Bruna e Renatinha pela ajuda na produção e análise das rações experimentais. Um especial agradecimento à Renatinha, que muito me ajudou e ensinou ao longo de toda minha formação.

Um agradecimento especial aos demais integrantes da equipe de servidores do LCM, Déia, Carlos, Davi, Iلسinho, Dimas, Diego e Cláudia pela disponibilidade de sempre, ajuda nos experimentos e amizade no dia a dia do LCM.

Aos amigos do LCM que contribuíram direta e indiretamente no trabalho, sou imensamente grata pela ajuda, principalmente no final do último experimento, em que não pude estar presente. Grata à Camilla, Jaque, Priscila, Mari, Esmeralda, Norha, Luisa, Patriula, Carol e Juliana. Aos amigos e parceiros de coletas e análises: Delano e Cris, o meu muito obrigado pela ajuda, coletas, análises, ensinamentos e amizade.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

O objetivo desta tese foi avaliar o uso da farinha das microalgas *Nannochloropsis* spp. e *Aurantiochytrium* sp. como ingredientes na ração para o camarão-branco-do-pacífico. Foram realizados dois experimentos, no primeiro foi avaliada a digestibilidade da farinha de *Nannochloropsis* spp. pelo *Litopenaeus vannamei* e seus efeitos nos parâmetros imunológicos, microbiologia do intestino e a resistência dos camarões ao choque térmico, após 15 dias de alimentação com dietas contendo 0, 0,5, 1 e 2% da microalga. No segundo experimento ambas as microalgas foram utilizadas na substituição do óleo de peixe das dietas, na taxa de 0, 25, 50, 75 e 100% de substituição. Conforme se substituía o óleo pelas farinhas se manteve a proporção dos ácidos graxos docosahexahenóico (DHA) e eicosapentahenóico (EPA) entre as dietas. Após 49 dias de cultivo se avaliou os parâmetros zootécnicos dos animais e se fez a análise do perfil de ácidos graxos do músculo dos animais. Quanto aos resultados, a digestibilidade da farinha de *Nannochloropsis* spp. foi total para alguns ácidos graxos importantes e para proteína; e alta para lipídeos em geral (78,88%) e ácido graxo EPA (73,86%). Os camarões alimentados com a dieta suplementada com *Nannochloropsis* spp. (0,5 e 2%) apresentaram maior resistência ao teste de estresse térmico em baixa temperatura, em relação ao grupo controle (sem adição). Foi observada diferença significativa nas espécies reativas de oxigênio, onde se pode observar que nos níveis 1 e 2% de inclusão os animais estavam mais imunoestimulados que os demais tratamentos, sendo capazes de produzir mais EROs. A formulação do segundo experimento se mostrou adequada e foi refletida no crescimento dos animais, que foi em média 1,89 gramas por semana. Não houve diferença estatística significativa nos parâmetros zootécnicos entre os tratamentos nem na composição em ácidos graxos no músculo dos animais. A sobrevivência ficou elevada e a substituição total do óleo de peixe não prejudicou esses parâmetros, uma vez que o crescimento foi semelhante entre os camarões do controle e do tratamento com 100 % de substituição. Desta forma, fica evidenciado que a adição de *Nannochloropsis* spp. na dieta de camarões (0,5% e 2%) aumenta sua resistência ao choque térmico e sua capacidade em produzir EROs e que a dieta com 100 % de substituição do óleo de peixe pela farinha de microalgas não prejudicou o crescimento dos camarões, mostrando que é possível a formulação de uma dieta de alto desempenho sem nenhum ingrediente de origem marinha (óleo ou farinha de peixe) contribuindo para a sustentabilidade da aquicultura.

**Palavras-chaves:** Aquicultura, *Litopenaeus vannamei*, microalgas, DHA, EPA.

## ABSTRACT

The objective of this thesis was to evaluate the use of *Nannochloropsis* spp. and *Aurantiochytrium* sp. as ingredients in the ration for white shrimp. Two experiments were carried out, in the first one the digestibility of *Nannochloropsis* spp. by *Litopenaeus vannamei* and its effects on immunological parameters, gut microbiology and resistance of shrimp to heat shock, after 15 days of feeding with diets containing 0, 0.5, 1 and 2% microalgae. In the second experiment, both microalgae were used to replace fish oil in the diets, at a rate of 0, 25, 50, 75 and 100% replacement. As the oil was replaced by flour, the proportion of docosahexahenoic (DHA) and eicosapentahenoic (EPA) fatty acids among the diets was maintained. After 49 days of culture, the zootechnical parameters of the animals were evaluated and the fatty acid profile of the animals' muscles was analyzed. As for the results, the digestibility of *Nannochloropsis* spp. it was total for some important fatty acids and for protein; and high for lipids in general (78.88%) and EPA fatty acid (73.86%). Shrimps fed the diet supplemented with *Nannochloropsis* spp. (0.5 and 2%) showed greater resistance to the thermal stress test at low temperature, compared to the control group (without addition). A significant difference was observed in reactive oxygen species, where it can be observed that at levels 1 and 2% of inclusion the animals were more immunostimulated than the other treatments, being able to produce more ROS. The formulation of the second experiment proved to be adequate and was reflected in the growth of the animals, which averaged 1.89 grams per week. There was no statistically significant difference in the zootechnical parameters between treatments or in the fatty acid composition of the animals' muscle. Survival was high and total replacement of fish oil did not affect these parameters, as growth was similar between control and 100% replacement treatment shrimp. Thus, it is evident that the addition of *Nannochloropsis* spp. in the shrimp diet (0.5% and 2%) it increases its resistance to heat shock and its capacity to produce ROS and that the diet with 100% replacement of fish oil by microalgae flour did not harm the growth of the shrimp, showing that it is possible to formulate a high performance diet without any ingredients of marine origin (oil or fishmeal) contributing to the sustainability of aquaculture.

**Keywords:** Aquaculture, *Litopenaeus vannamei*, microalgae, DHA, EPA.

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo 1:

- Figura 1: Contagem de bactérias do intestino de *Litopenaeus vannamei* alimentado durante 15 dias com dietas contendo 0, 0,5, 1 e 2 % de *Nannochloropsis* spp. ....36
- Figura 2: Mortalidade cumulativa de *Litopenaeus vannamei* alimentado durante 15 dias com dietas contendo 0,5, 1 e 2 % de adição de *Nannochloropsis* spp. e a dieta controle (0 % de inclusão), monitorados durante 48 h após choque térmico. ....37
- Figura 3: Análise de espécies reativas de oxigênio no nível basal e induzido (Laminarina) no período pré choque térmico (0 hora) e pós choque térmico (após 1 e 24horas), de *Litopenaeus vannamei* alimentado durante 15 dias com dietas contendo 0, 0,5, 1 e 2 % de inclusão de *Nannochloropsis* spp.....39



## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1:

- Tabela 1: Composição centesimal e informações nutricionais da farinha de *Nannochloropsis* spp. detalhando os ácidos graxos mais representativos. ....25
- Tabela 2: Formulação das dietas do ensaio de digestibilidade e composição centesimal. ....27
- Tabela 3: Formulação e composição centesimal das dietas experimentais contendo adição da farinha de microalgas (*Nannochloropsis* spp.) para o camarão *Litopenaeus vannamei*. ....29
- Tabela 4: Composição da dieta e coeficiente de digestibilidade aparente de nutrientes da farinha de *Nannochloropsis* spp utilizados pelo camarão-branco-do-pacífico. ....35
- Tabela 5: Análises imunológicas (contagem total de hemócitos, concentração protéica, atividade da fenoloxidase e título de aglutinação) de *Litopenaeus vannamei* alimentado durante 15 dias com dietas contendo 0, 0,5, 1 e 2 % de *Nannochloropsis* spp. ....38
- Tabela 6: Análise de espécies reativas de oxigênio – basal, de *Litopenaeus vannamei* alimentado durante 15 dias com dietas contendo 0, 0,5, 1 e 2 % de *Nannochloropsis* spp. ....38

### Artigo 2:

- Tabela 1: Resumo das informações nutricionais\* e composição centesimal\*\* do óleo de peixe, da farinha de *Aurantiochytrium* sp. e da farinha de *Nannochloropsis* spp, detalhando seus ácidos graxos mais representativos.....57
- Tabela 2: Formulação das dietas experimentais e composição centesimal para o camarão *Litopenaeus vannamei* contendo diferentes níveis de substituição de óleo de peixe pela farinha de microalgas (*Aurantiochytrium* sp. e *Nannochloropsis* spp.).....58
- Tabela 3: Parâmetros zootécnicos de camarões (*Litopenaeus vannamei*) alimentados com dietas com substituição do óleo de peixe por farinha de *Aurantiochytrium* sp. e *Nannochloropsis* spp, cultivados em sistema de água clara por 49 dias. ....61
- Tabela 4: Perfil de ácidos graxos do músculo dos camarões (*Litopenaeus vannamei*) alimentados com dietas com substituição do óleo de peixe por farinha de *Aurantiochytrium* sp. e *Nannochloropsis* spp, cultivados em sistema de água clara por 49 dias.....61

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>11</b>
	FARINHA E ÓLEO DE PEIXE .....	12
	MICROALGAS NA SAÚDE DOS CAMARÕES.....	13
	ÁCIDOS GRAXOS .....	16
	ÁCIDOS GRAXOS E OS CAMARÕES .....	17
	ÁCIDOS GRAXOS E O ESTRESSE TÉRMICO.....	18
<b>1.1</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2</b>	<b>ESTRUTURA DO TRABALHO .....</b>	<b>20</b>
<b>2.</b>	<b>ARTIGOS .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>ARTIGO 1 .....</b>	<b>21</b>
	<b>RESUMO .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1.1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
	DIETAS EXPERIMENTAIS.....	25
	DELINEAMENTO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	30
	Ensaio de digestibilidade .....	30
	Ensaio como aditivo alimentar.....	31
	ANÁLISE DAS DIETAS .....	32
	ANÁLISE DA MICROBIOTA DO TRATO INTESTINAL.....	32
	RESISTÊNCIA AO CHOQUE TÉRMICO.....	32
	ANÁLISE IMUNOLÓGICA.....	32
	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	33
<b>2.1.3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
	DIGESTIBILIDADE DA FARINHA DE <i>Nannochloropsis</i> spp. ....	34
	ANÁLISE DA MICROBIOTA DO TRATO INTESTINAL.....	35
	RESISTÊNCIA AO CHOQUE TÉRMICO.....	36
	ANÁLISE IMUNOLÓGICA.....	37
<b>2.1.4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1.5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>

<b>2.1.6</b>	<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>44</b>
<b>2.1.7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>
<b>2.2</b>	<b>ARTIGO 2 .....</b>	<b>51</b>
	<b>RESUMO .....</b>	<b>51</b>
<b>2.2.1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>2.2.2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
	DIETAS EXPERIMENTAIS.....	55
	ANÁLISES DE COMPOSIÇÃO.....	59
	DELINEAMENTO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS .....	59
	PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS .....	60
	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	61
<b>2.2.3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
	PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS .....	61
	ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO MÚSCULO .....	61
<b>2.2.4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>2.2.5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>2.2.6</b>	<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>64</b>
<b>2.2.7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção aquícola atingiu recorde histórico em 2018 e deve ser cada vez mais desenvolvida e ter suas tecnologias de produção aprimoradas, visto que os estoques naturais de peixes estão diminuindo e o consumo de pescados está aumentando. Na década de 60 o consumo estava em 9,9 kg e passou para 20,3 kg per capita em 2017, aliado ao aumento da renda das famílias, crescimento populacional e a busca por alimentos mais saudáveis e de qualidade nutricional. Desde 2016 a aquicultura já é considerada a principal fonte de peixes disponíveis para consumo humano e se expandiu de tal forma que gerou uma melhor nutrição e segurança alimentar em locais onde havia de forma limitada ou não havia. A aquicultura engloba a produção de peixes, moluscos, plantas aquáticas, crustáceos; sendo que dentro desse último grupo há 62 espécies cultivadas registradas nas estatísticas da FAO (FAO, 2016; 2020). O cultivo de camarões representa um importante ramo na aquicultura e destaca-se o *Litopenaeus vannamei*, camarão marinho conhecido como o camarão-branco-do-pacífico, a principal espécie cultivada mundialmente e no Brasil (FAO, 2014; 2016).

Para que a carcinicultura e a aquicultura no geral continuem crescendo, e principalmente, de maneira sustentável, a atividade deve prezar pelo cuidado no âmbito social, econômico e ambiental. É indiscutível que a aquicultura incentiva a economia e atividade local, gerando emprego e crescimento; fornecendo também um alimento de qualidade e altamente nutritivo. No que diz respeito a parte ambiental deve prezar e conservar os recursos naturais, com o cuidado desde a aquisição dos insumos que são utilizados, até a entrega final do produto e tratamento do efluente gerado. Dentre os insumos utilizados o que tem maior importância no cultivo e maior representatividade nos seus custos é a ração (AMAYA et al., 2007; TACON; METIAN, 2008; OLSEN; HASAN, 2012; FAO, 2020).

Dentre os principais ingredientes da ração de camarões estão à farinha e o óleo de peixe. Comparada a outras atividades zootécnicas, a aquicultura é a que tem a maior demanda por farinha e óleo de peixe (TACON et al., 2002; NUNES et al., 2011), sendo que a carcinicultura é o segundo maior grupo de espécies aquáticas a utilizar esses insumos (TACON et al., 2002; TACON; METIAN, 2008). Estes ingredientes possuem alto valor nutritivo e alta digestibilidade, contudo, muitas vezes são provenientes da pesca extrativista, onde uma parte significativa dos peixes ainda é processada para virar farinha e óleo de peixe (AMAYA et al., 2007; TACON; METIAN, 2008; OLSEN; HASAN, 2012; FAO, 2020). Em 2018, 12% da produção total de pescados foi utilizada para fins não alimentares, o que equivaleu a 21,48 milhões de toneladas. Nos últimos anos, por questões éticas, ambientais e pelo aumento dos

preços do insumo - visto que o óleo de peixe também está sendo usado como suplemento nutricional para a saúde humana, houve uma tendência de queda em seu uso. Tendências apontam uma diminuição ainda maior nas próximas décadas, onde se acredita que esses ingredientes serão utilizados apenas estrategicamente, em pequenas quantidades e fases específicas de cultivo (FAO, 2014; 2020).

## FARINHA E ÓLEO DE PEIXE

A farinha e óleo de peixe ainda são as principais fontes de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa da série n-3 das dietas, principalmente para camarões peneídeos que têm capacidade limitada na síntese destes ácidos graxos, devendo esses serem provenientes da dieta (KANAZAWA et al., 1979; GLENCROSS; SMITH, 2001; AMAYA et al., 2007; NRC 1993, 2011). Sendo assim, para que se mantenha o crescimento sustentável da atividade e para que ela não se torne inviável economicamente, devem-se desenvolver ingredientes alternativos à farinha e ao óleo de peixe, diversificando a matriz das rações de aquicultura, diminuindo a dependência de uso desses ingredientes na dieta (TACON; METIAN, 2008; TURCHINI et al., 2009; OLSEN; HASAN, 2012; SÁ et al., 2013).

Na literatura vários são os estudos que demonstram a possibilidade da substituição da farinha de peixe por fontes de origem vegetal e subprodutos de origem animal (AMAYA et al., 2007; SÁ et al., 2013; CHEN et al., 2015). Porém, alguns estudos demonstraram uma relação direta entre a diminuição do uso da farinha de peixe com o aumento do uso do óleo de peixe, para não causar efeitos negativos no crescimento dos camarões (AMAYA et al., 2007; SÁ et al., 2013). Já a substituição do óleo de peixe é mais complexa e menos estudada, entretanto, nos últimos anos, alguns trabalhos começaram a surgir e mostraram a possibilidade de sua substituição por óleos vegetais e farinha de microalgas (GONZÁLEX-FÉLIX et al., 2010; WANG et al., 2017; CORREA et al., 2018; KUMAR et al., 2018; PEREZ-VELAZQUEZ et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2019; TIBBETS et al., 2020).

O grande problema da substituição do óleo de peixe por fontes de origem vegetal é que o teor de ácidos graxos no músculo do animal produzido reflete diretamente o conteúdo em ácidos graxos de sua alimentação. Isso foi demonstrado por alguns estudos em que uma alimentação com alto teor de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa resultou em grande quantidade desses ácidos graxos na carne dos animais produzidos. Assim, é gerado um produto de alto valor nutritivo, com benefícios associados aos ácidos graxos da série n-3 à saúde humana (SUÁREZ et al., 2002; MARTIN et al., 2006; AMAYA et al., 2007; DOMINGO et al., 2007; TURCHINI et al., 2009; NRC, 2011; GUIMARÃES et al., 2019).

Os animais aquáticos possuem capacidade limitada para a síntese destes ácidos graxos, devendo os mesmos, virem na sua dieta. Ao se substituir demasiadamente os ingredientes das rações por fontes de origem vegetal (pobres em n-3), o animal produzido tenderá a ter menor teor desses ácidos graxos na carne. Assim, ao mesmo tempo em que se necessita de ingredientes alternativos à farinha e ao óleo de peixe, deve-se produzir alimentos com qualidade, ricos nutricionalmente com ácidos graxos da série n-3 em sua composição através de uma matéria-prima também rica em n-3. Nesse contexto, destacam-se as fontes derivadas de plantas aquáticas, algas e microalgas. As microalgas contêm elevadas quantidades desses ácidos graxos, já sendo muito usadas como suplemento nutricional humano e na medicina (RICHIMOND, 2004; DERNER et al., 2006; LOURENÇO, 2006; JACOB-LOPEZ et al., 2008; HARWOOD, GUSCHINA, 2009; ABDEL-RAOUF et al., 2012; FAO, 2020). Assim, ao se substituir com sucesso o óleo de peixe por fontes de origem vegetal, o produto final gerado possui menor qualidade de que a substituição por fontes que contenham n-3, como as microalgas, que preservam a qualidade do alimento gerado e mantêm a contribuição nutricional mais significativa dos pescados, que são a proteína de alta qualidade, os micronutrientes e os PUFAs (FAO, 2020).

#### MICROALGAS NA SAÚDE DOS CAMARÕES

Apesar da produção mundial de camarões ter aumentado nos últimos anos, a carcinicultura mundial teve seu desenvolvimento e aumento da produção limitado por surtos de doenças bacterianas e virais (FAO, 2016; 2020). Surtos de doenças ocorreram em todos os grandes produtores mundiais de camarões, como China, Índia, Vietnã, Tailândia, Equador e México. No Brasil a produção declinou de 75 mil toneladas em 2012 para 65 mil em 2014 devido à enfermidade da mancha branca (FAO, 2016). Sendo assim, diversos têm sido os esforços para se tentar desenvolver métodos ou produtos para tratar precocemente ou tentar impedir o surgimento das doenças.

Dentro dos métodos de controle de enfermidades, estão os cultivos biosseguros (como o cultivo em sistema de bioflocos), uso de linhagens livre de patógenos (FLEGEL, 2012); métodos alternativos e promissores para uma “imunização” dos animais como com o uso de “vacinas” de proteínas recombinantes e métodos com RNA de interferência (MUSTHAQ; KWANG, 2011; VERBRUGGEN et al., 2016). Há ainda os tratamentos com agentes químicos e antibióticos – que tem o uso cada vez menos incentivado, devido a seus efeitos nocivos aos animais e meio ambiente; e métodos alternativos, como boas práticas de manejo e a utilização de probióticos, prébióticos e aditivos alimentares, para melhorar a saúde dos

animais e sua resistência imunológica frente a um patógeno ou situação de estresse. O aumento da imunocompetência dos animais ocorre com o fortalecimento do seu sistema imune através do uso de substâncias na dieta, como derivados de plantas, fungos, macro e microalgas, os imunoestimulantes (KAUTSKY et al., 2000; PERAZZOLO et al., 2002; GUERTLER et al., 2010; HUYNH et al., 2011; IMMANUEL et al., 2012, GUERTLER et al., 2013; CHAKRABORTY et al., 2014; LEHMANN et al., 2016; TOMAZELLI JUNIOR et al., 2017).

Imunoestimulantes podem ser produzidos sinteticamente ou ser oriundos de fontes naturais, encontrando-se dentre esses compostos muitos derivados de microorganismos e algas, tanto macro como microalgas (SONG, & HUANG, 1999; SHAH et al., 2018). As macro e microalgas são nutricionalmente ricas em aminoácidos, ácidos graxos e diversos compostos bioativos e diversos estudos demonstram seus benefícios aos animais. Dentre estes se destaca sua ação imunomoduladora, antiviral, antibacteriana, antiinflamatória e sendo promotoras de crescimento, tendo grande apelo a serem usadas como medida profilática, por apresentarem facilidade de manuseio e risco reduzido no uso (CRUZ-SUÁREZ et al., 2008; MERCIER et al., 2009; SAMOCHA et al., 2010; FLEURENCE et al., 2012; BALBOA et al., 2013; ZHANG et al., 2013; PÁDUA et al., 2015; FERNANDO et al., 2016; MILLEDGE et al., 2016; SANJEEWA et al., 2016; SUSANTO et al., 2016). Um dos mais importantes imunoparâmetros usados para estimar o estado de imunocompetência em camarões após estimulação dos hemócitos e o efeito de substâncias imunoestimulantes em seu organismo é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Dentre elas a produção do ânion superóxido é muito importante, pois está diretamente ligada a atividade contra patógenos. Durante sua produção há um aumento no consumo de oxigênio nas células, o “burst” (explosão) respiratório, que culmina na inibição do crescimento ou destruição do microorganismo invasor (BELL, & SMITH, 1993; CHANG et al., 2000, 2003; CAMPACORDOVA et al., 2002; MALDONADO et al., 2003; GULLIAN et al., 2004; YEH et al., 2006; FU et al., 2007; BALASUBRAMANIAN et al., 2008; GUERTLER et al., 2010; CANTELLI, 2012).

As microalgas naturalmente já fazem parte da cadeia alimentar dos camarões com influência comprovada no crescimento e sistema imunológico do camarão-branco-do-pacífico. Elas são nutricionalmente ricas em aminoácidos e ácidos graxos, servindo como uma importante fonte de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa aos animais. Esses elementos são importantes componentes de membrana e servem também como fonte de energia (GLENCROSS, SMITH, 2001; OTOSHI et al., 2001; TAKEUCHI et al., 2002;

MADIGAN et al., 2004; RAVEN et al., 2004; LOURENÇO, 2006; MOSS et al., 2006; HARWOOD, GUSCHINA, 2009; MERCIER et al., 2009; TURCHINI et al., 2009; SAMOCHA et al., 2010; ZHANG et al., 2013; SPRAGUE et al., 2017). O perfil de ácidos graxos das microalgas varia dentre os grupos taxonômicos, dependendo da presença ou não de proteínas específicas e conforme a disponibilidade de nutrientes e fatores ambientais, como luz e temperatura. Mas elas possuem alongases e dessaturases, que as permitem produzir os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LOURENÇO, 2006; ZHU et al., 2007; ROMERO et al., 2008; HARWOOD, GUSCHINA, 2009; FRACALOSSO, CYRINO, 2013).

A espécie *Aurantiochytrium* sp. é uma microalga que em condições otimizadas de cultivo tem a capacidade de produzir altas taxas de concentrações lipídicas (mais de 70% da sua massa) e apresenta um perfil de ácidos graxos com alta quantidade do ácido graxo docosahexaenóico (DHA) (LEWIS et al., 1999). Estudos demonstram seu uso para extração de óleo e uso em alimentos para aquicultura (PATNAIK et al., 2006; GANUZA et al., 2008; ADARME-VEGA et al., 2012; TOCHER, 2015; WANG et al., 2017; CORREA et al., 2018; KUMAR et al., 2018; PACHECO-VEJA et al., 2018; TIBBETTS et al., 2020). Para o camarão-branco-do-pacífico foi demonstrado por Guimarães et al., (2019) que foi possível a substituição de 100% do óleo de peixe pela sua farinha, sem afetar negativamente os parâmetros imunológicos e zootécnicos dos animais, agregando ácidos graxos da série n-3 na carne, gerando um produto mais saudável à saúde humana.

As microalgas do gênero *Nannochloropsis* são muito utilizadas na aquicultura para o enriquecimento de alimentos vivos, caracterizam-se por serem ricas em lipídeos e conterem altos níveis de ácido graxo eicosapentaenóico (EPA), tendo carotenóides em algumas espécies como *Nannochloropsis salina* e *Nannochloropsis oculata* (VOLKMAN et al., 1993; HULATT et al., 2017; ASHOUR et al., 2019). Seu uso na alimentação dos camarões está vinculado a diversos benefícios, como melhora no crescimento, na sobrevivência e aumento da qualidade nutricional da carne dos animais produzidos com aumento no seu teor de ácidos graxos poliinsaturados (JU et al., 2009; SANCHEZ et al., 2012; GAMBOA-DELGADO & MÁRQUEZ-REYES, 2018). Além da sua qualidade nutricional elas possuem parede de  $\beta$  1-3 glicanas, demonstradas em vários estudos como benéficas ao camarão-branco-do-pacífico por causarem uma efetiva imunestimulação de seu sistema imune com resposta em alguns de seus parâmetros imunológicos (CHANG et al., 2000, 2003; CAMPA-CÓRDOVA et al., 2002; YEY et al., 2006; FU et al., 2007; CANTELLI et al., 2012; ROJO-CEBREROS et al., 2017).



## ÁCIDOS GRAXOS

Os lipídeos são um grupo de macronutrientes essenciais que estão presentes nos alimentos, servem como fonte de energia e são responsáveis pela manutenção da estrutura, permeabilidade e estabilidade das membranas, servem de transportadores de nutrientes e são precursores de hormônios e outras moléculas bioativas, sendo muito presentes em organismos planctônicos e em óleos e gorduras de peixes marinhos (KUBITZA, 1999; SUÁREZ et al., 2002; NRC, 2011; FRACALOSSI; CYRINO, 2013). Eles se dividem em diferentes classes, como os fosfolipídeos, esteróis, ésteres, hidrocarbonetos e pigmentos. Os fosfolipídeos são importantes componentes de membranas, e junto das proteínas são os principais constituintes orgânicos dos tecidos; e os esteróis são lipídeos estruturais, presentes nas membranas celulares sendo também precursores de várias moléculas com atividade biológica específica, como os sais biliares (KUBITZA, 1999; SUÁREZ et al., 2002; NRC, 2011; FRACALOSSI; CYRINO, 2013; UFRGS, 2015).

As gorduras são classificadas de acordo com a quantidade de ligações presentes em sua estrutura, seu grau de insaturação. Os ácidos graxos saturados são aqueles sem ligação dupla em sua estrutura; os monoinsaturados (MUFA - do inglês monounsaturated fatty acid) contêm uma ligação dupla em sua estrutura; e os poliinsaturados (PUFA - do inglês polyunsaturated fatty acid) contêm duas ou mais insaturações em sua estrutura (NRC, 2011; FRACALOSSI; CYRINO, 2013). Quanto a sua nomenclatura, o número colocado ao lado do ácido graxo representa a sua quantidade de carbonos, enquanto o número após o símbolo de dois pontos representa a quantidade de insaturações que o ácido graxo possui. Por exemplo, o ácido graxo Palmítico – 16:0, o 16 significam 16 carbonos e 0 ligações duplas. Para os ácidos graxos insaturados, o local da sua primeira ligação dupla, contando a partir do grupo metílico final da molécula, é indicado na nomenclatura, por exemplo, n-3 indica que a primeira insaturação está no carbono número 3, como o ácido graxo docosahexaenóico, DHA – 22:6 n-3, com 22 carbonos e 6 insaturações, sendo a primeira após o carbono 3. Os comumente chamados de “ômega” 3 e 6 são ácidos graxos da série n-3 e n-6 (SUÁREZ et al., 2002; MARTIN et al., 2006; NRC, 2011; FRACALOSSI; CYRINO, 2013).

Ácidos graxos podem ser alongados e dessaturados por certos sistemas enzimáticos e produzem outros ácidos graxos, essas enzimas especiais são encontradas apenas em plantas e alguns microorganismos. O número de ligações duplas e sua posição determinam as propriedades físicas, químicas e funções dos ácidos graxos, bem como sua importância e atuação nos processos fisiológicos (SUÁREZ et al., 2002; NRC, 2011). Os ácidos graxos sintetizados pelo próprio organismo são chamados de não essenciais, enquanto os não

sintetizados são chamados de essenciais e devem provir obrigatoriamente de sua alimentação (FRACALOSSI; CYRINO, 2013).

Alimentos de origem vegetal como leguminosas, cereais e óleos vegetais são ricos em ácidos graxos poliinsaturados n-6, que já estão muito presentes na alimentação humana vindo de diversas fontes. Já os ácidos graxos poliinsaturados n-3 estão presentes em peixes e camarões, servindo como “alimentos funcionais” na prevenção de certas doenças, sendo alvos cada vez maior de atenção e procura por humanos pela busca por uma alimentação saudável e uma maior qualidade de vida (VICENTAINER, 2000; SUÁREZ et al., 2002; ANJO, 2004; MARTIN et al., 2006; DOMINGO, 2007; SMITH; GUENTZEL, 2010). O consumo de pescados está associado aos diversos benefícios que os ácidos graxos do tipo n-3 trazem à saúde humana, como o ácido araquidônico e o docosahexaenóico, que apresentam importantes funções no desenvolvimento e funcionamento do cérebro e retina humanos. O linoléico e linolênico são necessários para que se mantenham as condições normais das membranas celulares, funções cerebrais e a transmissão dos impulsos nervosos (MARTIN et al., 2006).

A razão entre o consumo de ácidos graxos n-3 e n-6 é bastante estudada, onde as pesquisas demonstram que uma baixa relação n-3/n-6 pode levar a condições que contribuem para o desenvolvimento de doenças alérgicas, inflamatórias e cardiovasculares (MARTIN et al., 2006). E o consumo exclusivo de n-6 pode levar a uma produção excessiva de eicosanóides, que deve ser observado em baixíssimas quantidades em organismos saudáveis, estando em elevadas quantidades nos tecidos alterados e com algumas condições patológicas, como inflamações e lesões vasculares (SUÁREZ et al., 2002). Vários estudos demonstram os benefícios de se consumir ácidos graxos da série n-3 para a saúde humana e seu efeito protetor à saúde, com redução dos riscos de doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral e diabetes (VICENTAINER, 2000; SUÁREZ et al., 2002; ANJO, 2004; DOMINGO, 2007; SMITH; GUENTZEL, 2010). O EPA e DHA são benéficos e estão ligados à prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão, inflamações, asma, artrite e psoríase (VICENTAINER et al., 2000; SUÁREZ et al., 2002; ANJO, 2004).

## ÁCIDOS GRAXOS E OS CAMARÕES

A exigência nutricional de peixes e demais animais, bem como as bibliografias referentes aos lipídeos, são poucas, esse grupo nutricional é menos conhecido do que qualquer outro tipo de nutriente (FRACALOSSI, CYRINO, 2013). A exigência em lipídeos é dividida e apresentada como a exigência para os ácidos graxos (isolados ou em grupos), fosfolipídeos, carotenóides e esteróis. Para o *Litopenaeus vannamei* algumas exigências já são conhecidas,

para as que não são utilizadas o *Penaeus monodon* como referência (GONZALES-FÉLIX et al., 2002; NRC, 2011).

O fato de não atender a exigência nutricional em ácidos graxos dos animais pode causar atraso no crescimento, redução da eficiência alimentar, redução do desempenho reprodutivo e mortalidade; já seu excesso na dieta pode levar ao retardo no crescimento. Diversos trabalhos mostram que a equilibrada concentração entre os ácidos graxos na dieta promove o crescimento dos camarões cultivados (GLENCROSS, SMITH, 1999; GONG et al., 2000; NRC, 2011). Glencross e Smith (1999) demonstraram que a manutenção do equilíbrio entre ácidos graxos linoléico e linolênico aumentou o crescimento dos animais e em 2001 demonstraram que a combinação de EPA e DHA promoveu o mesmo resultado positivo. Outro estudo com a adição de DHA e ácido graxo linoléico e linolênico na dieta do camarão-branco-do-pacífico demonstrou o crescimento dos animais e observaram o incremento em seu ganho de peso (GONZALES-FÉLIX et al., 2002; GONZALES-FÉLIX et al., 2003).

## ÁCIDOS GRAXOS E O ESTRESSE TÉRMICO

As baixas temperaturas provocam várias mudanças fisiológicas e danos ao organismo dos animais, como desordens musculares, perda da fluidez das membranas, perda da integridade das proteínas, mau funcionamento da respiração celular, estresse oxidativo e várias outras alterações no seu metabolismo (PRUITT, 1990; HAYWARD et al., 2014). Nos animais de clima frio, que se tornaram resistentes às baixas temperaturas, como nos insetos, alguns mecanismos foram observados para essa resistência ser possível, como o aumento da expressão de algumas moléculas, enzimas e proteínas de choque térmico, para facilitar o movimento da água entre os compartimentos celulares, evitar o estresse oxidativo e inibir a desnaturação proteica. Eles também são capazes de incrementar a síntese e armazenamento de alguns aminoácidos, carboidratos e poliois, agindo como crioprotetores (TEETS, DENLINGER, 2013; CHOWANSKI et al., 2015). Além de normalmente modificarem seu metabolismo energético, reestruturarem o mecanismo de transporte de íons e o metabolismo dos lipídeos, que são muito prejudicados pela perda da fluidez da membrana (TEETS, DENLINGER, 2013).

A perda da fluidez da membrana é muito danosa ao organismo e ao funcionamento celular, pois leva a imobilização das proteínas transmembranas e danos na sinalização celular (HARPAZ et al., 1999; TEETS, DENLINGER, 2013; HAYWARD et al., 2014; CHOWANSKI et al., 2015). Dentre os mecanismos para se aumentar a fluidez da membrana, evitando seus malefícios, estão o incremento da proporção de ácidos graxos insaturados e

colesterol; a inserção de ácidos graxos insaturados nos glicerofosfolipídeos e a reestruturação de seus grupos polares; e a elevação da proporção entre ácidos graxos de cadeia curta e longa (TEETS, DENLINGER, 2013). A literatura descreve que é um mecanismo comum a diversos animais em situações de exposição ao frio, como insetos, alguns crustáceos, plantas e microorganismos, os ácidos graxos insaturados serem incorporados aos fosfolipídeos das membranas celulares, levando à fluidez da membrana e modificações funcionais (PRUITT, 1990; TEETS, DENLINGER, 2013; HAYWARD et al., 2014; CÓRCOLES-SÁEZ et al., 2016; SCHUMANN, 2016; TAKAHASHI et al., 2016).

Já animais intolerantes ao frio podem tornar-se tolerantes por meio de suplementação alimentar, como demonstrado há alguns anos por Harpaz et al. (1999), que alimentaram um peixe (*Pelvicachromis pulcher*) com diferentes níveis de L-carnitina e observaram o aumento em mais de 50% na sobrevivência dos animais após 24 h de choque térmico. Bem como mais recentemente por Richard et al. (2016) que alimentaram *Sparus aurata* com dieta suplementada com taurina, L-betaína, Vitamina C e fosfolipídeos insaturados e observaram resistência ao estresse por frio, associada ao aumento das defesas contra o estresse oxidativo e modulação do metabolismo energético, entre outros.

Essa suplementação alimentar é muito interessante para camarões, pois são animais ectotérmicos, ou seja, que não controlam sua temperatura interna, ficando muito susceptíveis aos efeitos danosos das baixas temperaturas e das mudanças de temperatura dos ambientes de cultivo. Nesses locais o estresse pelo frio causa variadas disfunções fisiológicas nesses organismos, como perda da integridade das proteínas e das membranas celulares, estresse oxidativo e mau funcionamento da respiração celular na mitocôndria (HAYWARD et al., 2014). No cultivo de camarões esses momentos de estresse podem causar perdas na produtividade, supressão da resposta imune e aumento da suscetibilidade dos animais a surtos de doenças (KAUTSKY et al., 2000). Essa estratégia de suplementação alimentar é interessante para locais que tem mudanças bruscas de temperatura em curtos períodos de tempo, como ocorre na região sul do Brasil. A carcinicultura sul brasileira enfrenta condições climáticas instáveis, especialmente no final do inverno e início de primavera até o final da primavera e início do verão, onde as mudanças bruscas na temperatura podem servir como um gatilho ao aparecimento das doenças (KAUTSKY et al., 2000; THANIGAIVEL et al., 2016).

O *Litopenaeus vannamei* é uma espécie de camarão tropical, tendo assim baixa tolerância ao frio (PONCE-PALAFOX et al., 1997; PENG et al., 2016), sendo a suplementação alimentar uma estratégia muito interessante contra possíveis momentos de estresse, e se for feita com produtos naturais, como plantas e algas, é ainda melhor para o

meio ambiente e para a sustentabilidade da atividade, visto que se constitui de um produto ambientalmente amigável, biodegradável, mantendo a qualidade da água e a segurança sanitária e ambiental dos cultivos (THANIGAIVEL et al., 2016). Schleder et al. (2017) observou a resistência dos camarões ao choque térmico com a inclusão da macroalga *Sargassum filipendula* na dieta, que levou a um aumento da fluidez de membrana e defesa antimicrobiana dos camarões, que mudaram seu metabolismo energético e o metabolismo de lipídios dos seus hemócitos, comprovada através da análise de MALDI-TOF MS. Essa resistência ao choque térmico também foi observada por Guimarães et al. (2021), onde a inclusão de *Nannochloropsis* spp. na dieta levou a maior resistência ao choque térmico e imunoestimulação do sistema imune dos animais, provavelmente pela presença em alta quantidade do ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa eicosapentaenóico.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso das microalgas *Nannochloropsis* spp. e *Aurantiocytium* sp. como ingredientes nas rações do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

### 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o coeficiente de digestibilidade aparente da farinha de *Nannochloropsis* spp. pelo camarão-branco-do-pacífico;
- b) Avaliar a utilização da farinha de microalgas como aditivo alimentar (0, 0,5, 1 e 2%) na dieta do camarão-branco-do-pacífico e seu efeito na microbiota do trato intestinal, na resistência ao choque térmico em baixa temperatura e parâmetros imunológicos;
- c) Avaliar o efeito de cinco níveis de substituição (0, 25, 50, 75 e 100%) do óleo de peixe pela farinha de microalgas *Nannochloropsis* spp. e *Aurantiocytium* sp. na ração para camarão-branco-do-pacífico, cultivados em sistema de água clara, nos parâmetros zootécnicos e perfil de ácidos graxos no músculo dos camarões.

## 1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

A tese possui dois artigos, o primeiro publicado no periódico *Animals* (doi.org/10.3390/ani11010150); e o segundo a ser submetido ao periódico *Aquaculture Reports*.

## 2. ARTIGOS

### 2.1 ARTIGO 1

#### ***Nannochloropsis* spp. como aditivo alimentar na dieta do camarão-branco-do-pacífico: efeitos na microbiologia do intestino, resistência ao estresse térmico e imunologia**

Ariane Martins Guimarães<sup>1</sup>, Cristhiane Guertler<sup>2</sup>, Gabriella do Vale Pereira<sup>3</sup>, Jaqueline da Rosa Coelho<sup>1</sup>, Priscila Costa Rezende<sup>1</sup>, Renata Oselame Nóbrega<sup>4</sup> and Felipe do Nascimento Vieira<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Camarões Marinhos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88061-600, Santa Catarina, Brazil; arianeufsc@gmail.com (A.M.G.); jaquesombrio@gmail.com (J.d.R.C.);

priscila.pesca.ufal@hotmail.com (P.C.R.)

<sup>2</sup> Campus São Bento do Sul, Instituto Federal Catarinense–São Bento do Sul, São Bento do Sul 89283-064, Santa Catarina, Brazil; cristhiane.guertler@ifc.edu.br

<sup>3</sup> Sparos I&D–Nutrition in Aquaculture, Marim, 8700-221 Olhão, Portugal; gabriellapereira@sparos.pt

<sup>4</sup> Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88066-260, Santa Catarina, Brazil; renata.oselamenobrega@gmail.com

\* Correspondence: felipe.vieira@ufsc.br; Tel.: +55-048-3721-4118

Simple Summary: We evaluated *Nannochloropsis* spp. as a feed additive for the Pacific white shrimp by testing for thermal shock resistance, immunology, and midgut microbiology. *Nannochloropsis* spp. is rich in Eicosapentaenoic acid, an n-3 fatty acid. This study demonstrated that the inclusion of these microalgae in the diet increased shrimp resistance to thermal shock and stimulated shrimp immune defense.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a farinha de *Nannochloropsis* spp. como aditivo alimentar para o camarão-branco-do-pacífico e seu efeito sobre sua microbiota intestinal, resistência ao choque térmico e parâmetros imunológicos. Inicialmente, foi determinado o coeficiente digestibilidade aparente do ingrediente (CDA). A digestibilidade da farinha da microalga foi total para alguns ácidos graxos importantes e para proteína; e alta para lipídeos em geral (78,88%) e ácido graxo eicosapentaenóico (73,86%). Posteriormente, a *Nannochloropsis* spp. foi incluída na dieta dos camarões em quatro níveis de adição (0, 0,5, 1 e 2%). Foi realizado o cultivo em sistema de água clara, contendo 20 camarões por tanque de 500 L, com peso inicial de  $6,05 \pm 0,06$  g, alimentados quatro vezes ao dia de acordo com conversão alimentar programada. Os tratamentos foram realizados em quadruplicata, e cada tanque continha sistema de aeração constante, aquecimento e a água dos tanques foi renovada 80% ao dia. Após 15 dias, foram avaliados os parâmetros microbiológicos, realizado o choque térmico em baixa temperatura e os parâmetros imunológicos. Os camarões alimentados com a dieta suplementada com *Nannochloropsis* spp. (0,5 e 2%) apresentaram maior resistência ao teste de estresse térmico, em relação ao grupo controle (sem adição). Foi observada diferença estatística significativa nas espécies reativas de oxigênio, onde se pode observar que nos níveis 1 e 2% de inclusão os animais estavam mais imunoestimulados que os demais tratamentos, sendo capazes de produzir mais moléculas altamente reativas (EROs). Não houve diferença estatística entre os tratamentos nos parâmetros imunológicos com relação à contagem total de hemócitos, atividade da fenoloxidase, título aglutinante e concentração proteica, assim como para microbiologia do trato intestinal. Desta forma, fica evidenciado que a adição de *Nannochloropsis* spp. na dieta de camarões (0,5% e 2%) aumenta sua resistência ao choque térmico e sua capacidade em produzir EROs.

Palavras-chaves: *Litopenaeus vannamei*, EPA, choque térmico em baixa temperatura, parâmetros imunológicos, espécies reativas de oxigênio.

## ABSTRACT

This work aimed to evaluate *Nannochloropsis* spp. as feed additive in the diet of Pacific white shrimp for their effect on midgut microbiology, thermal shock resistance and immunological parameters. Initially, the digestibility of the microalgae meal was assessed, and the apparent digestibility coefficient (ADC) was determined. The ADC was, in general, high in lipids (78.88%) and eicosapentaenoic fatty acid (73.86%). Then, *Nannochloropsis* spp. was included in diets at four levels (0, 0.5, 1 and 2% inclusion). The shrimp were reared in 500 L clear water tanks containing 20 shrimp per tank with an initial weight of  $6.05 \pm 0.06$  g and fed four times a day. Shrimp fed with supplemented diets containing *Nannochloropsis* spp. (0.5 and 2%) presented higher resistance to thermal shock when compared to the non-supplemented group (control). Shrimp fed with 1 and 2% of algae inclusion had a higher production of reactive oxygen species (ROS) when compared to other treatments. No statistical difference was observed in the immunological parameters and microbiology of the intestinal tract. Thus, the inclusion of *Nannochloropsis* spp. in shrimp diets at 0.5 and 2% levels increases resistance to thermal shock and ROS production in shrimp.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*; EPA; low temperature thermal shock; immunological parameters; reactive oxygen species

### 2.1.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a carcinicultura mundial teve seu desenvolvimento e aumento da produção limitados, entre outros fatores, por surtos de doenças bacterianas e virais (FAO, 2020). Vários métodos são estudados para tratar ou tentar impedir o surgimento das doenças, como os agentes químicos e antibióticos, que já foram muito usados no tratamento de enfermidades. Contudo, seu potencial nocivo aos animais e ao meio ambiente os fez serem mal vistos, e métodos alternativos são estudados, como, por exemplo, as boas práticas de manejo e o aumento da resistência imunológica dos camarões. O equilíbrio entre o ambiente, o hospedeiro e o patógeno, faz com que os animais, mesmo em contato com o agente infeccioso, não manifestem a doença; o cuidado com variações de salinidade e flutuações na temperatura são práticas de manejo essenciais, visto que são fatores estressantes, servindo de gatilho para o aparecimento de surtos de enfermidades. O aumento da sua imunocompetência fortalece o seu sistema imune através do uso de substâncias naturais na dieta, como com alguns derivados de plantas, macro e microalgas, os chamados imunoestimulantes (Guertler, Schleder, Barracco, & Perazzolo, 2010; Guertler et al., 2013; Kautsky, Rönnbäck, Tedengren, & Troell, 2000; Lehmann, Schleder, Guertler, Perazzolo, & Vinatea, 2016; Perazzolo, Gargioni, Ogliari, & Barracco, 2002).

Os imunoestimulantes são obtidos a partir de variadas fontes naturais ou produzidos sinteticamente, encontrando-se dentre esses compostos muitos derivados de microrganismos, como fungos e bactérias; e algas, tanto macro como microalgas (Shah et al., 2018; Song, & Huang, 1999) As microalgas já fazem parte da cadeia alimentar dos camarões no ambiente marinho, sendo fonte de ácidos graxos insaturados de cadeia longa, importante principalmente para os camarões peneídeos, que tem uma capacidade limitada de sintetizá-los (Glencross, Smith, 2001; Kanazawa, Teshima, & Ono, 1979; Moss, Forster, Tacon, 2006; Otsu, Montgomery, Look, Moss, 2001; Takeuchi, Lu, Yoshizaki, & Satoh, 2002; Turchini, Torstensen, & Ng, 2009). Ácidos graxos fazem parte do grupo dos lipídios, que são importantes componentes de membranas e servem como fonte de energia, havendo estudos que demonstram também sua influência no crescimento e sistema imunológico do camarão-branco-do-pacífico (Mercier et al., 2009; Samocha, Patnaik, Davis, Bullis, Browdy, 2010; Zhang et al., 2013).

As microalgas do gênero *Nannochloropsis* são alimentos bem conhecidos na aquicultura para o enriquecimento de alimentos vivos, são ricas em lipídios e contém altos níveis do ácido graxo eicosapentaenóico (EPA), sendo que algumas espécies também são ricas em



carotenóides, como a *Nannochloropsis salina* e *Nannochloropsis oculata* (Ashour, Elshobary, El-Shenody, Kamil, & Abomohra, 2019; Hulatt, Wijffels, Bolla, & Kiron, 2017; Volkman, Brown, Dunstan, & Jeffrey, 1993). Seus benefícios para os camarões já são comprovados, como a melhora nos parâmetros de crescimento, sobrevivência e aumento do teor de ácidos graxos em sua carne (Gamboa-Delgado & Márquez-Reyes, 2018; Ju, Forster, & Dominy, 2009; Sanchez, Fox, Gatlin III & Lawrence, 2012). Elas possuem parede de celulose de  $\beta$  1-3 glicanas, cujos estudos demonstram uma efetiva imunestimulação do sistema imune dos camarões por esses elementos, com resposta em alguns parâmetros imunológicos importantes do camarão-branco-do-pacífico (Campa-Córdova, Hernández-Saavedra, De Philippis, & Ascencio, 2002; Cantelli et al., 2012; Chang, Chen, Su, & Liao, 2000, 2003; Fu, Hou, Yeh, Li, & Chen, 2007; Rojo-Cebreros et al., 2017; Yeh et al., 2006).

Os parâmetros imunológicos comumente usados para verificar a sanidade de crustáceos são os hemogramas, o tempo de coagulação da hemolinfa, a atividade da enzima fenoloxidase (PO), o título aglutinante do plasma, a concentração de proteínas totais e a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs). Esse último é um dos principais imunoparâmetros usado para estimar o estado de imunocompetência de camarões e muito usado para avaliar o efeito de substâncias imunostimulantes no organismo do animal (Balasubramanian, Sarathi, Venkatesan, Thomas, & Hameed, 2008; Campa-cordova et al., 2002; Cantelli, 2012; Chang et al., 2000, 2003; Fu et al., 2007; Gullian, Thompson, & Rodriguez, 2004; Maldonado, Rodríguez, de Blas, & Echevarria, 2003; Yeh et al., 2006). Dentre as EROs que podem ser avaliadas, a produção do ânion superóxido apresenta um papel muito importante na atividade contra patógenos, pois durante a produção destas moléculas ocorre o aumento do consumo de oxigênio, conhecido como “explosão” respiratória (burst), culminando na inibição do crescimento ou destruição do microorganismo invasor (Bell, & Smith, 1993; Guertler et al., 2010).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a inclusão da farinha da microalga *Nannochloropsis* spp. como aditivo alimentar na ração do camarão-branco-do-pacífico e seus efeitos na imunidade, modificação de sua microbiota intestinal e a resistência dos animais ao choque térmico.

## 2.1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), pertencente à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizado na Barra da Lagoa, Florianópolis (SC). A pesquisa foi desenvolvida com camarões marinhos da espécie

*Litopenaeus vannamei* provenientes da linhagem *high health* SPEEDLINE Aqua, adquirida da empresa Aquatec Aquacultura Ltda (Canguaretama, RN, Brasil), os quais foram cultivados no LCM em sistema intensivo de bioflocos até atingirem o peso ideal para início dos experimentos.

## DIETAS EXPERIMENTAIS

A farinha de microalgas da espécie *Nannochloropsis* spp. foi adquirida da empresa Necton – PhytoBloom (Portugal) (Tabela 1). Foram formuladas duas dietas, uma para o ensaio de digestibilidade e outra para o experimento como aditivo alimentar para verificação dos seus efeitos no organismo dos camarões. As duas foram formuladas com o auxílio do programa Optimal Fórmula 2000, com base nas exigências nutricionais da espécie (*Litopenaeus vannamei*), e para as exigências não encontradas utilizou-se a espécie *Penaeus monodon* como referência (NRC, 2011). O cadastro dos ingredientes no programa foi feito com base no laudo de análises e com base em relatórios das empresas fornecedoras dos insumos, unidos a pesquisa bibliográfica.

Tabela 1: Composição centesimal e informações nutricionais da farinha de *Nannochloropsis* spp. detalhando os ácidos graxos mais representativos.

<b>Nutriente</b>	<b>Composição (g 100 g<sup>-1</sup> matéria seca)<sup>a</sup></b>
Matéria seca	97,16
Proteína	42,85
Lipídeos	18,95
14:00	0,59
16:00	2,85
18:1 n-9	0,88
20:4 n-6	0,84
20:5 n-3	2,97
SFA <sup>b</sup>	4,60
MUFA	4,08
PUFA	4,55
PUFA n-6	1,38
PUFA n-3	3,07

<sup>a</sup> Análise feita no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas, descrito no item 2.3.

<sup>b</sup> Grupos de ácidos graxos: SFA = saturados, MUFA = monosaturados, PUFA = poliinsaturados.

Para o ensaio de digestibilidade foi formulada uma dieta referência apenas com ingredientes semi – purificados (Tabela 2), onde se adicionou 1,00 mg/g da dieta seca de óxido de ítrio como marcador inerte. A dieta teste continha 900 mg/g de peso seco da dieta referência e 100 mg/g de peso seco da farinha de *Nannochloropsis* spp. As dietas foram formuladas para conter 40,00 % de proteína bruta, 3.762,07 Kcal/K de energia e 7,48 % de extrato etéreo (Tabela 2). Os ingredientes da ração foram previamente triturados e peneirados em malha de 600 µm, depois foram misturados a seco, todos os macro ingredientes e depois os micro ingredientes. Após cada mistura estar pronta, foram acrescentados os óleos e a lecitina de soja. Por último, a umidade foi ajustada para 15 %. A dieta foi peletizada em matriz de 1,5 mm. Sendo seca em estufa a 40°C por aproximadamente 12 h. Em seguida, as rações foram mantidas congeladas até o momento de cada alimentação, para evitar a oxidação e perda dos ácidos graxos das dietas.

Tabela 2: Formulação das dietas do ensaio de digestibilidade e composição centesimal.

Ingredientes (g kg <sup>-1</sup> dieta seca)	Dieta	Dieta teste:
	Referência	<i>Nannochloropsis</i> spp
Caseína <sup>a</sup>	256,30	230,67
Amido de milho <sup>a</sup>	223,90	201,51
Gelatina <sup>a</sup>	170,30	153,27
Farinha de <i>Nannochloropsis</i> spp <sup>c</sup>	0,00	100,00
Caulim <sup>a</sup>	114,00	102,60
Celulose <sup>a</sup>	53,04	47,74
Lecitina	50,12	45,11
Sulfato de magnésio	25,20	22,68
Óleo de fígado de bacalhau	20,00	18,00
Cloreto de potássio	16,40	14,76
Premix mineral <sup>d</sup>	16,20	14,58
Óleo de soja	16,00	14,40
Cloreto de sódio	14,40	12,96
Fosfato mono cálcio	13,30	11,97
Carboximetilcelulose <sup>a</sup>	4,24	3,82
Premix vitamínico <sup>d</sup>	3,80	3,42
Cloridrato de colina	1,00	0,90
Óxido de ítrio	1,00	0,90
Vitamina C <sup>e</sup>	0,80	0,72
<b>Composição (g 100 g<sup>-1</sup> matéria seca)<sup>f</sup></b>		
Matéria seca	93,65	94,22
Proteína	41,07	41,17
Lipídeos	7,48	8,96
SFA <sup>g</sup>	1,48	2,33
MUFA	1,83	2,33
PUFA	3,71	3,69
PUFA n-6	2,29	2,50
PUFA n-3	0,88	1,19
n-3/n-6	0,39	0,48

<sup>a</sup> Distribuídos por Rhoster (Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brasil).<sup>b</sup> All – G – Rich, produzido por Alltech Inc. (Nicholasville, Kentucky, USA), importado por Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda (Araucária, Paraná, Brasil).

<sup>c</sup> Produzido por Necton – PhytoBloom (Belamandil, Olhão, Portugal).

<sup>d</sup>– In Vivo Nutrição e Saúde Animal Ltda. (São Paulo, SP, Brasil): vit. A - 900 mg kg<sup>-1</sup>; vit. D<sub>3</sub> - 25 mg kg<sup>-1</sup>; vit. E – 46.900 mg kg<sup>-1</sup>; vit. K<sub>3</sub> – 1.400 mg kg<sup>-1</sup>; cobalamina (B12) – 50 mg kg<sup>-1</sup>; piridoxina (B6) – 33.000 mg kg<sup>-1</sup>; riboflavina – 20.000 mg kg<sup>-1</sup>; ácido nicotínico – 70.000 mg kg<sup>-1</sup>; ácido pantotênico – 40.000 mg kg<sup>-1</sup>; biotina – 750 mg kg<sup>-1</sup>; ácido fólico – 3.000 mg kg<sup>-1</sup>; cobre – 2.330 mg kg<sup>-1</sup>; zinco – 10.000 mg kg<sup>-1</sup>; manganês – 6.500 mg kg<sup>-1</sup>; selênio - 125 mg kg<sup>-1</sup>; iodo – 1.000 mg kg<sup>-1</sup>; cobalto – 50 mg kg<sup>-1</sup>; magnésio – 20 g kg<sup>-1</sup>; potássio – 6,1 g kg<sup>-1</sup>.

<sup>e</sup>– L-ácido ascórbico-2-monofosfato 35%. DSM Produtos Nutricionais Brasil (São Paulo, SP, Brasil).

<sup>f</sup> Análise feita no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas, descrito no item 2.3.

<sup>g</sup> Grupos de ácidos graxos: SFA = saturados, MUFA = monosaturados, PUFA = poliinsaturados.

Para o experimento do uso da farinha de microalga como aditivo, as dietas foram formuladas para conter 35,86 % de proteína bruta, 3.762,07 Kcal/K de energia e 10 % de extrato etéreo (Tabela 3). Os ingredientes da ração foram previamente triturados e peneirados em malha de 600 µm, depois foram misturados a seco, todos os macro ingredientes e depois os micro ingredientes. A mistura foi separada em 4 partes, onde a farinha de microalgas foi acrescentada na forma de 0 %, 0,5 %, 1 % e 2 % do peso total das partes. Após cada mistura estar pronta foram peletizadas, secas e congeladas conforme descrito acima para a dieta de digestibilidade.

Tabela 3: Formulação e composição centesimal das dietas experimentais contendo adição da farinha de microalgas (*Nannochloropsis* spp.) para o camarão *Litopenaeus vannamei*.

Ingredientes (g kg <sup>-1</sup> matéria seca)	Inclusão da farinha de microalga (%)			
	0	0,5	1	2
Farelo de soja	324,60	323,00	321,40	318,00
Farinha de trigo	150,00	149,00	148,20	147,00
Farinha de vísceras de aves	125,70	125,10	124,40	123,20
Farinha de peixe (61% PB)	150,00	149,30	148,50	147,00
Lecitina de soja	25,00	24,90	24,80	24,50
Óleo de soja	10,00	10,00	9,90	9,80
Óleo de peixe	20,00	19,90	19,80	19,60
Farinha de <i>Nannochloropsis</i> spp.	0,00	5,00	10,00	20,00
Premix vitamínico <sup>a</sup>	5,00	5,00	5,00	4,90
Premix mineral <sup>a</sup>	17,00	16,90	16,80	16,70
Fosfato monocálcio	25,00	24,90	24,80	24,50
Carboximetilcelulose	5,00	5,00	5,00	4,90
Cloreto de potássio	10,00	10,00	9,90	9,80
Metionina	5,00	5,00	5,00	4,90
Vitamina C <sup>b</sup>	0,70	0,70	0,70	0,70
Sulfato de magnésio	15,00	14,90	14,90	14,70
Cloreto de sódio	12,00	11,90	11,90	11,80
Caulim	100,00	99,50	99,00	98,00
<b>Composição (g 100 g<sup>-1</sup> matéria seca)</b>				
Matéria seca	97,80	97,30	96,80	95,80
Proteína	35,86	35,68	35,50	35,14
Lipídeos	10,00	9,95	9,90	9,80
Cinzas	18,28	18,190	18,10	17,91
Energia bruta (kcal kg <sup>-1</sup> )	3762,00	3743,30	3724,40	3686,80

<sup>a</sup> – In Vivo Nutrição e Saúde Animal Ltda. (São Paulo, SP, Brasil): vit. A - 900 mg kg<sup>-1</sup>; vit. D<sub>3</sub> - 25 mg kg<sup>-1</sup>; vit. E - 46.900 mg kg<sup>-1</sup>; vit. K<sub>3</sub> - 1.400 mg kg<sup>-1</sup>; cobalamina (B12) - 50 mg kg<sup>-1</sup>; piridoxina (B6) - 33.000 mg kg<sup>-1</sup>; riboflavina - 20.000 mg kg<sup>-1</sup>; ácido nicotínico - 70.000 mg kg<sup>-1</sup>; ácido pantotênico - 40.000 mg kg<sup>-1</sup>; biotina - 750 mg kg<sup>-1</sup>; ácido fólico - 3.000 mg kg<sup>-1</sup>; cobre - 2.330 mg kg<sup>-1</sup>; zinco - 10.000 mg kg<sup>-1</sup>; manganês - 6.500 mg kg<sup>-1</sup>; selênio - 125 mg kg<sup>-1</sup>; iodo - 1.000 mg kg<sup>-1</sup>; cobalto - 50 mg kg<sup>-1</sup>; magnésio - 20 g kg<sup>-1</sup>; potássio - 6,1 g kg<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> – L-ácido ascórbico-2-monofosfato 35%. DSM Produtos Nutricionais Brasil (São Paulo, SP, Brasil).

## DELINEAMENTO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

### Ensaio de digestibilidade

Para o ensaio de digestibilidade foram separados 400 camarões de  $8,00 \pm 0,30$  g para o teste, estocados em 2 tanques de 5000 L em sistema de água clara. Eles foram alimentados 4 vezes ao dia (8h, 12h, 14h, 18h) e aclimatados durante 10 dias com as dietas. Passado esse período, as coletas começaram, onde 10 animais de cada tratamento foram transferidos para aquários de 60 L. As coletas foram feitas em quadruplicata para cada tratamento, num total de 8 unidades experimentais, numa sala dotada de sistema de aeração ( $5,58 \pm 0,44$  mg L<sup>-1</sup>) e aquecimento ( $28,17 \pm 0,51$  °C).

Os animais eram alimentados às 8h da manhã e às 14h da tarde e após cada alimentação se aguardava 40min para o consumo do alimento. Passado esse tempo os aquários eram sifonados, para retirada de fezes e restos de ração e se iniciava a coleta das fezes durante as 4h seguintes, se verificando os aquários a todo o momento, para retirada das fezes frescas, evitando a degradação do material. As fezes eram coletadas por sifonamento com pipeta Pausteur de plástico e colocadas em placas de Petri, onde eram suave e rapidamente lavadas com água destilada e transferidas para tubos falcon, que ficavam resfriados com gelo para evitar a degradação dos ácidos graxos. Ao final do dia, os aquários eram renovados a uma taxa de 90 %; e os falcons eram centrifugados duas vezes a 1.800 g a 4 ° C por 10 min (modelo 5804R Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), para retirada do excesso de água, e congelados em freezer vertical a -18 °C. As repetições da análise se deram pela coleta no tempo, com peso final do tubo falcon de aproximadamente 80 g de peso úmido de fezes.

Ao final das coletas todos os falcons com as fezes foram liofilizados, homogeneizados e as amostras separadas para análise de ítrio, proteína bruta, matéria seca e lipídeos. O coeficiente de digestibilidade aparente da proteína, matéria seca e lipídeos foram calculados conforme abaixo:

$$\% ADCn = 100 - \left[ 100 \times \left( \frac{\% C \text{ dieta}}{\% C \text{ fezes}} \right) \times \left( \frac{\% N \text{ fezes}}{\% N \text{ dieta}} \right) \right]$$

sendo C é o valor do óxido de ítrio na dieta ou nas fezes e N é a concentração do nutriente considerado (matéria seca, proteína, lipídeos, ácidos graxos) na dieta ou nas fezes (em % da matéria seca).

E o coeficiente de digestibilidade aparente do ingrediente para matéria seca, proteína e lipídeos foi feito pela seguinte equação:

$$\%ADC_{mm} = ADC_{dieta\ teste} + \left[ (ADC_{dieta\ teste} - ADC_{dieta\ refer\ência}) \times \frac{0,85 \times N_{ref}}{0,15 \times N_{ing}} \right]$$

sendo ADC dieta teste e ADC dieta referência os coeficientes de digestibilidade aparente da dieta teste e dieta referência, respectivamente, calculadas com a primeira fórmula, e N (ref e ing) são as concentrações do que se está calculando (matéria seca, proteína, lipídeos, ácidos graxos), presentes na dieta referência ou no ingrediente.

#### Ensaio como aditivo alimentar

O experimento da farinha como aditivo alimentar consistiu na alimentação de camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* em sistema de água clara, onde o delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro réplicas, num total de 16 unidades experimentais. Foram testados quatro níveis de inclusão da farinha de *Nannochloropsis* spp. nas dietas (0, 0,5, 1 e 2 %). O cultivo foi realizado durante duas semanas (15 dias) dentro de uma sala dotada de sistema de distribuição de água salgada, aeração ( $6,07 \pm 0,38 \text{ mg L}^{-1}$ ), termostatos e aquecedores ( $28,75 \pm 0,71 \text{ }^\circ\text{C}$ ). As unidades experimentais foram tanques circulares de polietileno, com fundo plano, com capacidade para 500 litros e área útil de 400 litros.

Todos os tanques foram preenchidos com água marinha oriunda da praia da Barra da Lagoa (Florianópolis, SC, Brasil), com salinidade de  $31,74 \text{ g. L}^{-1}$ , alcalinidade  $132,8 \text{ mg. L}^{-1}$ , pH 8,00, amônia  $0,3 \text{ mg. L}^{-1}$  e nitrito  $0 \text{ mg. L}^{-1}$ . Cada unidade experimental foi povoada com 20 camarões de peso médio de  $6,05 \pm 0,06 \text{ g}$ .

As alimentações foram fornecidas por biomassa programada quatro vezes ao dia (08 h 30 min; 12 h, 14 h 30 min, 17 h) a lanço diretamente no tanque. A renovação de água foi feita uma vez ao dia, no período da tarde, a uma taxa de 80 % do volume total do tanque, com remoção total dos restos de matéria orgânica (fezes, restos de ração e mudas).

Durante o experimento, o pH ( $8,06 \pm 0,06$ ), alcalinidade ( $124,70 \pm 3,20$ ), a salinidade ( $33,40 \pm 0,10$ ), a amônia ( $< 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), e nitrito ( $< 0,14 \text{ mg L}^{-1}$ ) permaneceram dentro dos limites estipulados adequados para camarões marinhos (Boyd, 2003). A análise da



alcalinidade seguiu método de Apha (1995); a amônia e nitrito o método de Strickland e Parsons (1972). Os parâmetros: oxigênio dissolvido, temperatura, pH e salinidade foram medidos com multiparâmetro YSI – Professional *Plus*.

#### ANÁLISE DAS DIETAS

A análise das dietas foi feita pelo Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LabNutri), seguindo metodologia descrita pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*, 1999). As dietas foram submetidas à análise de matéria seca com secagem a 105°C, cinzas com queima a 550°C, proteína por Kjeldahl (N x 6,25), e extrato etéreo por Soxhlet após hidrólise ácida. As análises de ácidos graxos foram medidas por cromatografia gasosa pelo método modificado de Folch, Less, & Stanley, (1957) conforme descrito por Corrêa, Nobrega, Mattioni, Fracalossi (2018).

#### ANÁLISE DA MICROBIOTA DO TRATO INTESTINAL

Após o término do experimento foi coletado o trato digestório de 5 camarões por tanque (20 animais por tratamento). Os tratos digestórios foram assepticamente extraídos, homogeneizados em um gral, diluídos serialmente (1/10) em solução salina estéril 3 % e semeados em meio de cultura Agar Marine e Agar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose – TCBS, para contagem de bactérias heterotróficas totais e vibrionáceas, respectivamente. Após 24 horas de incubação a 30 °C foram efetuadas as contagens totais das unidades formadoras de colônias (UFC).

#### RESISTÊNCIA AO CHOQUE TÉRMICO

Após o período experimental (2 semanas) os animais foram submetidos ao choque térmico, onde 10 camarões por tanque foram transportados em bombonas de 20 L e transferidos para aquários de 60 L contendo água salgada a  $12,0 \pm 0,3$  °C e aeração constante, onde foram mantidos por uma hora. A temperatura da água dos aquários foi monitorada constantemente para sua manutenção. Após o tempo do choque os animais foram retirados e novamente transportados para seu tanque de origem. A mortalidade cumulativa foi monitorada durante 48 h após o choque térmico.

#### ANÁLISE IMUNOLÓGICA

Ao final do experimento foram coletados três animais de cada réplica (doze animais por tratamento) para análise imunológica. A hemolinfa foi coletada na parte ventral dos animais com seringas estéreis de 1 mL de agulha 21 G resfriadas a 4 °C. Uma amostra de 40

$\mu\text{L}$  foi fixada em solução de 4 % de formaldeído/MAS (citrato de sódio 27 mM, EDTA 9 mM, glicose 115 mM, NaCl 336 mM, pH 7,0) para a contagem total de hemócitos (CTH). O restante da hemolinfa foi deixado coagular a 4 °C, posteriormente congelada a 20 °C e centrifugada repetidamente a 6.000 g por 10 min, para a obtenção do soro, o qual foi armazenado a -20 °C para uso nas demais análises imunológicas. O número de hemócitos por mililitro de hemolinfa foi estimado por contagem direta em câmara de Neubauer (Beçak e Paulete, 1976).

A atividade da fenoloxidase (PO), foi determinada no soro através de espectrofotometria, pela formação do pigmento DOPA-cromo após a oxidação do substrato L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina), por metodologia de Soderhall e Hall (1984), feita em triplicata. A formação do DOPA-cromo foi monitorada 0, 5, 15 e 20 min após a adição d L-DOPA. A concentração proteica foi estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

Para o título aglutinante do soro (lectinas), foi utilizado suspensão de eritrócitos de cachorro a 2 %. Amostras de 50  $\mu\text{L}$  de soro foram diluídas em TBS-2 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.4) em placas de 96 poços de fundo côncavo. A cada amostra de soro foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de eritrócitos e incubadas durante 2 h a 25 °C em câmara úmida. O controle foi feito substituindo o soro por TBS-2, toda análise foi feita em triplicata. O valor aglutinante foi definido como o recíproco da última diluição que possua a capacidade de aglutinar os eritrócitos.

Para a análise das espécies reativas de oxigênio (EROs) utilizou-se 3 animais de cada tanque para a coleta da hemolinfa no período pré-choque (hora 0), 1 hora após o choque e 24 horas após o choque. A produção de ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) pelos hemócitos foi medida através do método de redução do NBT (nitro-blue-tetrazolium) de acordo com Guertler et al. (2010). Como ativador celular foi utilizado Laminarina ( $\beta$ -1.3 glicana) (Sigma-Aldrich). As análises foram realizadas em triplicata.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa Statistica 10 (StatSoft®), utilizando o nível de significância de 5 %, onde os dados de contagem de bactérias do intestino foram transformados para  $\log_{10}(x + 1)$ , e os do título aglutinante foram transformados em  $\log_2(x + 1)$  antes de serem submetidos à análise. A homoscedasticidade e normalidade dos dados foram avaliadas através dos testes Levene e Shapiro–Wilk, respectivamente. Os dados de contagem de bactérias do intestino, título aglutinante e EROs

foram submetidos à análise de variância unifatorial (ANOVA one way), seguido pelo teste de Tukey quando houver diferença estatística. Os dados de sobrevivência ao choque térmico foram analisados por Kaplan-Meier.

### 2.1.3 RESULTADOS

Os animais terminaram o experimento com  $9,17 \pm 0,37$  g, com crescimento semanal em torno de 1,56 gramas e a sobrevivência não foi afetada pelos diferentes tratamentos.

#### DIGESTIBILIDADE DA FARINHA DE *Nannochloropsis* spp.

De um modo geral o coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) da farinha de *Nannochloropsis* spp foi alto (Tabela 4). O CDA dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa foi 100%, e do grupo dos n-3 ficou em torno de 95%. Pode se observar completa digestibilidade de alguns ácidos graxos, como o docosapentahenóico, araquidônico, linolênico, linoléico e oleico, bem como da proteína. E alta digestibilidade dos lipídeos totais (78,88%) e do ácido graxo eicosapentahenóico (73,86%).

Tabela 4: Composição da dieta e coeficiente de digestibilidade aparente de nutrientes da farinha de *Nannochloropsis* spp utilizados pelo camarão-branco-do-pacífico.

Nutriente <sup>a</sup>	Dieta de <i>Nannochloropsis</i> spp	Coefficiente de
	Composição g 100 g <sup>-1</sup> matéria seca	digestibilidade aparente %
Matéria seca	97,16	95,43 ± 5,25
Proteína	18,95	100,00 ± 2,59
Lípidos	42,85	78,77 ± 3,11
14:0 Mirístico	0,15	85,43 ± 3,96
16:0 Palmítico	1,23	94,18 ± 5,09
18:0 Esteárico	0,24	100,00 ± 6,32
18:1 n-9 Oleico	1,32	100,00 ± 6,18
18:2 n-6 Linoléico	2,40	100,00 ± 6,50
18:3 n-3 Linolênico	0,16	100,00 ± 6,07
20:4 n-6	0,09	100,00 ± 2,05
Araquidônico		
20:5 n-3 EPA	0,41	73,86 ± 2,48
22:6 n-3 DHA	0,19	100,00 ± 6,51
SFA <sup>b</sup>	2,33	90,42 ± 4,60
MUFA	2,33	97,51 ± 5,51
PUFA	3,69	100,00 ± 5,98
PUFA n-6	2,50	100,00 ± 6,33
PUFA n-3	1,19	95,44 ± 5,25

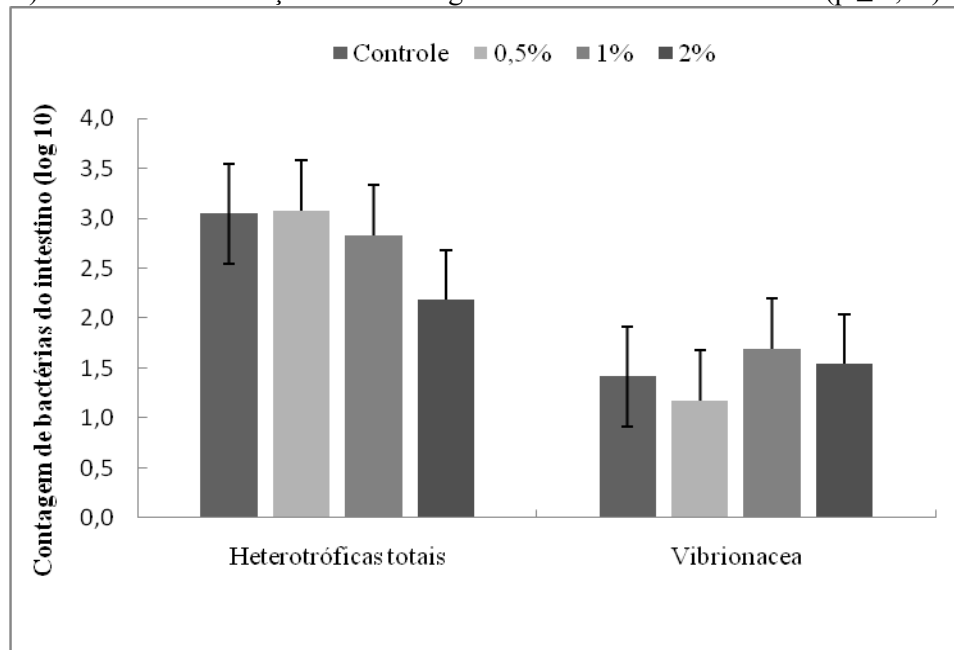
<sup>a</sup> Valores expressos pela média de três repetições, seguida pelo desvio padrão.

<sup>b</sup> Grupos de ácidos graxos: SFA = saturados, MUFA = monosaturados, PUFA = poliinsaturados.

## ANÁLISE DA MICROBIOTA DO TRATO INTESTINAL

Não houve diferença estatística significativa ( $p \geq 0,05$ ) na contagem de bactérias heterotróficas totais e vibriónicas no intestino dos camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* alimentados por 15 dias com dietas contendo 0, 0,5, 1 e 2% de *Nannochloropsis* spp. (Figura 1).

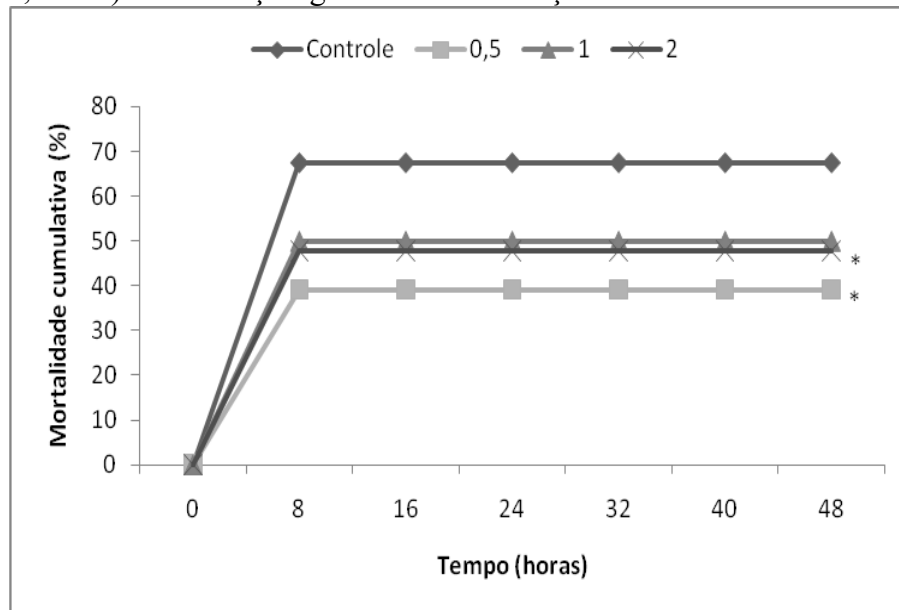
Figura 1: Contagem de bactérias do intestino de *Litopenaeus vannamei* alimentado durante 15 dias com dietas contendo 0, 0,5, 1 e 2 % de *Nannochloropsis* spp. As barras de erro indicam o desvio padrão da média (n = 4). Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos ( $p \geq 0,05$ ).



## RESISTÊNCIA AO CHOQUE TÉRMICO

Na resistência ao choque térmico se observou diferença estatística significativa entre todos os tratamentos com o grupo controle (Figura 2), exceto no tratamento com 1% de inclusão da microalga, todavia o valor de  $p$  foi muito próximo ao valor considerado ( $p \geq 0,05$ ). A inclusão da *Nannochloropsis* spp. na dieta do camarão-branco-do-pacífico por 15 dias de alimentação, lhes conferiu resistência ao choque térmico de temperatura, onde se observou menor mortalidade em todos os tratamentos com inclusão da microalga do que o grupo controle (sem inclusão).

Figura 2: Mortalidade cumulativa de *Litopenaeus vannamei* alimentado durante 15 dias com dietas contendo 0,5, 1 e 2 % de adição de *Nannochloropsis* spp. e a dieta controle (0 % de inclusão), monitorados durante 48 h após choque térmico. Houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos ( $p = 0,03633$ ); com diferença significativa entre o tratamento controle (0%) e 0,5 % ( $p = 0,00446$ ), e entre o controle (0%) e 2 % ( $p = 0,03898$ ). Sem diferença estatística ( $p \geq 0,05$ ) entre o controle (0%) e 1 % ( $p = 0,06412$ ). \* diferença significativa em relação ao controle.



## ANÁLISE IMUNOLÓGICA

Não houve diferença estatística significativa na contagem total de hemócitos, concentração proteica, atividade da fenoloxidase e título de aglutinação, entre os tratamentos ( $p \geq 0,05$ ) para a espécie *Litopenaeus vannamei* alimentados por 15 dias com dietas contendo 0, 0,5, 1 e 2 % de *Nannochloropsis* spp. (Tabela 5).

Tabela 5: Análises imunológicas (contagem total de hemócitos, concentração protéica, atividade da fenoloxidase e título de aglutinação) de *Litopenaeus vannamei* alimentado durante 15 dias com dietas contendo 0, 0,5, 1 e 2 % de *Nannochloropsis* spp.

Tratamento	Contagem total de hemócitos (10 <sup>6</sup> cels mL <sup>-1</sup> )	Concentração proteica (mg mL <sup>-1</sup> )	Atividade da PO (unit min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína)	Título de Aglutinação (log <sub>2</sub> x+1)
Controle (0%)	28,39 ± 1,90	517,54 ± 1,22	28,90 ± 1,00	8,35 ± 0,47
0,5%	30,19 ± 2,83	516,48 ± 0,31	36,10 ± 0,56	8,25 ± 1,50
1%	32,75 ± 4,27	516,44 ± 0,71	35,00 ± 1,44	8,50 ± 1,29
2%	27,84 ± 1,25	516,28 ± 1,03	26,30 ± 0,60	8,00 ± 0,82
p	0,1879	0,2212	0,4424	0,9292

Dados são médias ± desvio padrão de quatro réplicas independentes. Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos ( $p \geq 0,05$ ).

Quanto às espécies reativas de oxigênio, houve diferença estatística significativa na produção basal ( $p < 0,05$ ) entre os grupos com um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio nos animais alimentados com 2% de *Nannochloropsis* spp. com relação aos demais tratamentos, antes do choque térmico, 1 hora e 24 horas após o choque (Tabela 6). Pode-se observar que na coleta 24 horas após o choque os valores das espécies reativas de oxigênio estavam novamente próximos ao valor da coleta anterior ao choque.

Tabela 6: Análise de espécies reativas de oxigênio – basal, de *Litopenaeus vannamei* alimentado durante 15 dias com dietas contendo 0, 0,5, 1 e 2 % de *Nannochloropsis* spp.

Tratamento	Produção de espécies reativas de oxigênio - basal		
	0 hora*	1 hora	24 horas
Controle (0%)	0,13 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>a</sup>
0,5%	0,12 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,06 <sup>a</sup>
1%	0,16 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,04 <sup>a</sup>
2%	0,37 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,89 ± 0,20 <sup>b</sup>	0,47 ± 0,09 <sup>b</sup>

\* Coleta antes do choque térmico (0 hora), 1 e 24 horas após o choque térmico.

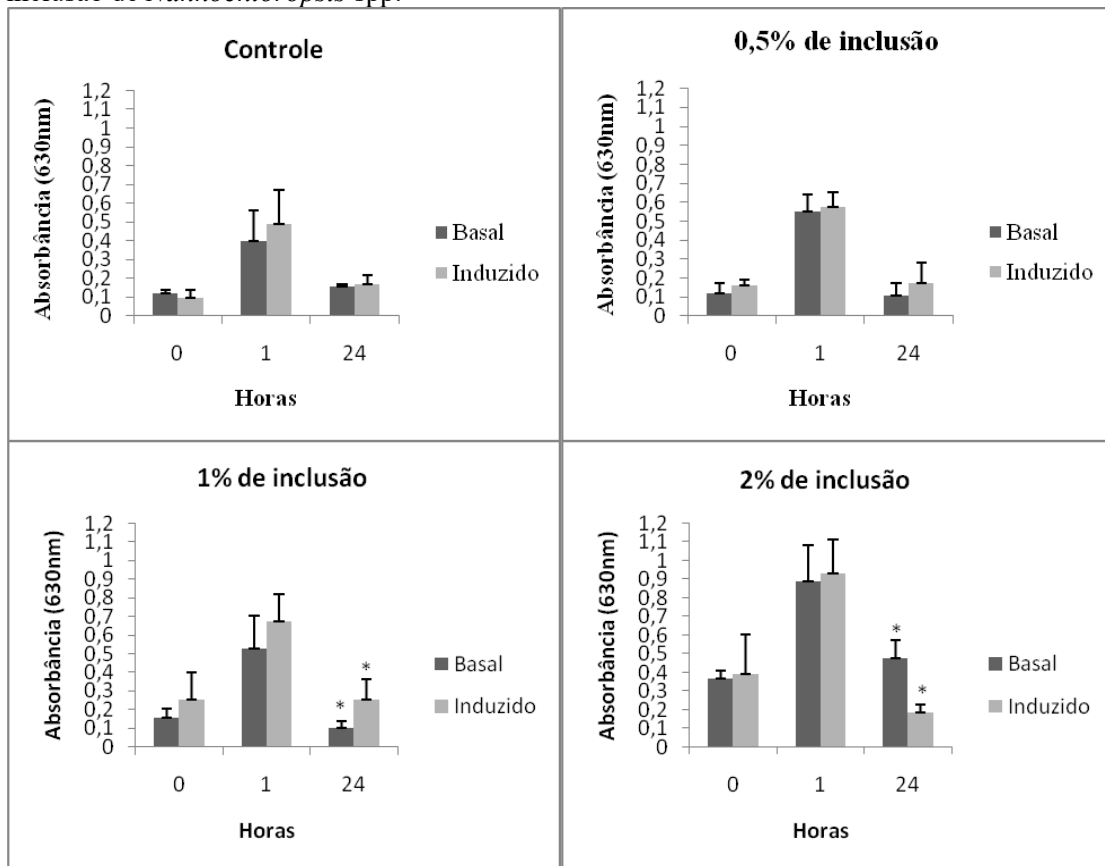
Dados são médias ± desvio padrão de três réplicas independentes.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas de acordo com o teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

Quanto à capacidade de indução dos hemócitos após estimulação com laminarina (Figura 3), observa-se uma diferença na produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> nos grupos alimentados com 1 e 2 % da microalga *Nannochloropsis* spp. Enquanto os animais alimentados com dieta contendo 1 % apresentaram uma capacidade de produção de espécies reativas em torno de 2,5 x maior que a

produção basal, nos animais alimentados com 2 % houve o comportamento oposto, onde a produção basal de ânion superóxido foi 2,6 x maior que aquela na induzida.

Figura 3: Análise de espécies reativas de oxigênio no nível basal e induzido (Laminarina) no período pré choque térmico (0 hora) e pós choque térmico (após 1 e 24 horas), de *Litopenaeus vannamei* alimentado durante 15 dias com dietas contendo 0, 0,5, 1 e 2 % de inclusão de *Nannochloropsis* spp.



As barras de erro indicam o desvio padrão da média (n = 4).

Horas com \* indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o nível basal e o induzido, sem o \* significa que não houve diferença estatística entre os níveis ( $p \geq 0,05$ ).

\*Diferença estatística encontrada na produção do ânion superóxido, entre o nível basal e induzido, no tratamento com 1% de inclusão da microalga, na coleta 24 horas após o choque térmico ( $p = 0,03639$ ); e na coleta 24 horas após o choque térmico no tratamento com 2 % de inclusão ( $p = 0,00138$ ).

## 2.1.4 DISCUSSÃO

A microalga *Nannochloropsis* spp. é um microrganismo que possui capacidade de produzir vários compostos benéficos aos animais, como sua alta produção do ácido graxo eicosapentaenóico (da série n-3) e imunostimulantes, como os b-glucanos, que têm capacidade de interação e imunostimulação tanto em vertebrados como invertebrados (Espinoza-Gallardo, Contreras-Porcia, & Ehrenfeld, 2017; Rojo-Cebreros et al., 2017). Seus benefícios para os camarões são demonstrados em alguns trabalhos, como a melhora nos parâmetros de crescimento, sobrevivência e imunostimulação do sistema imune. Assim,



neste trabalho se avaliou seu efeito como aditivo alimentar na dieta do camarão-branco-do-pacífico.

A digestibilidade da farinha num modo geral foi alta, com aproveitamento total da proteína e de alguns ácidos graxos muito importantes e benéficos ao organismo dos animais, como araquidônico, linoléico, linolênico e eicosapentahenóico. A digestibilidade dos lipídeos e do ácido graxo eicosapentahenóico (EPA) também se mostrou alta, o que é muito importante, pois demonstra um bom aproveitamento dos nutrientes presentes na farinha pelos camarões, onde a farinha se mostra como um ingrediente altamente assimilável e aproveitável pelos animais. Talvez por ser um alimento que já faz parte da cadeia alimentar dos animais em seu ambiente natural, seu organismo já esteja acostumado a assimilar o mesmo.

Em geral, sua adição na dieta não influenciou com diferença estatística significativa as bactérias da microbiota do trato intestinal, nem alguns dos parâmetros imunológicos do camarão, como a contagem total de hemócitos, a concentração proteica, a atividade da enzima fenoloxidase e seu título de aglutinação. Entretanto, houve diferenças estatísticas significativas no teste de resistência dos animais ao choque térmico e na produção de espécies reativas de oxigênio.

Quanto à resistência ao choque térmico, a inclusão da microalga *Nannochloropsis* spp. na dieta do camarão-branco-do-pacífico lhe conferiu mais resistência ao estresse térmico, que pode ser observado pela menor mortalidade dos tratamentos 0,5 e 2% de inclusão com relação ao grupo controle. Mesmo o tratamento 1%, que não foi significativamente diferente, teve mortalidade numericamente menor e com nível de probabilidade de 0,064, ou seja, próximo a significância. Fato já observado com a inclusão da macroalga *Sargassum filipendula* (Schleder et al., 2017a, 2017b) na dieta dos camarões, onde observou a resistência ao choque térmico dos animais e nesse trabalho, com a imunoestimulação e fortalecimento do sistema imune pela microalga *Nannochloropsis* spp. Camarões marinhos são organismos ectotérmicos – que não controlam sua temperatura interna, sendo muito suscetíveis aos efeitos danosos de mudanças de temperatura nos ambientes de cultivo, onde temperaturas baixas provocam variadas mudanças fisiológicas em seu organismo, como perda da fluidez da membrana, perda da integridade de proteínas, mau funcionamento da respiração celular, estresse oxidativo e várias outras alterações no seu metabolismo (Hayward, Manso, Cossins, 2014; Pruitt, 1990). Há trabalhos que demonstram alguns mecanismos para resistir a essas condições de baixa temperatura, como regular o metabolismo dos lipídios em resposta ao estresse térmico e modificar seu mecanismo de transporte de íons, que são prejudicados pela redução da fluidez da membrana, que é muito danosa ao funcionamento celular, pois causa

imobilização das proteínas transmembranas e danos no processo de sinalização celular (Chowanski et al., 2015; Harpaz, Becker, Blum, 1999; Hayward et al., 2014; Teets, Denlinger, 2013). Existem diversos mecanismos bioquímicos para aumentar a fluidez da membrana, evitando todos os malefícios decorrentes disso, dentre eles são observados o incremento da proporção de ácidos graxos insaturados e colesterol, inserção de ácidos graxos insaturados nos glicerofosfolipídios e reestruturação de seus grupos polares, e elevação da proporção de ácidos graxos de cadeia curta e longa (Teets, Denlinger, 2013). Está descrito na literatura que ácidos graxos insaturados são incorporados aos fosfolipídios das membranas celulares em situações de exposição ao frio, levando a uma fluidez na membrana e modificações funcionais, sendo um mecanismo comum a diversos animais resistentes a variações térmicas, como alguns insetos, crustáceos, plantas e microrganismos (Córcoles-Sáez, Hernández, Martínez-Rivas, Prieto, Randez-Gil, 2016; Hayward et al., 2014; Pruitt, 1990; Schumann, 2016; Takahashi, Imai, Kawamura, Uemura, 2016; Teets, Denlinger, 2013). Desta forma, os dados do presente trabalho demonstraram que a presença dos ácidos graxos insaturados da série n-3 na microalga *Nannochloropsis* spp. adicionada a dieta, pode ter sido incorporada e ajudado na fluidez de membrana das células dos camarões, que desempenhou papel importante na resistência dos mesmos ao estresse térmico, como demonstrado aqui por sua alta digestibilidade e por Schleder et al., 2017 através de análise de MALDI-TOF MS, onde a inclusão de *Sargassum filipendula* na dieta levou a um aumento da fluidez de membrana e na defesa antimicrobiana dos camarões, mudando seu metabolismo energético e metabolismo de lipídios dos seus hemócitos.

Com relação ao sistema imune, pôde ser observada alterações na produção de espécies reativas de oxigênio pelos hemócitos dos animais. Antes do choque térmico, houve um aumento de mais de 2 x ( $p \leq 0,05$ ) na produção basal de ânion superóxido no tratamento com 2 % de inclusão da microalga em relação aos demais grupos, indicando uma imunoestimulação destes animais. Sabe-se, que o ânion superóxido é a primeira substância formada em uma cascata de EROs durante um “burst” respiratório, sendo que esta ativação é comumente observada durante os processos fagocíticos. Muitos estudos sugerem que as  $\beta$ -glicanas sejam imunoestimulantes que auxiliam na prevenção de doenças em crustáceos (Campa-Córdova et al., 2002; Smith, Söderhäll, 1983), seja por imunoestimulação *in vivo* (por imersão e na alimentação) ou *in vitro*, gerando respostas imune celulares através, por exemplo, da produção de ânions superóxido (Chang et al., 2003; Campa-Córdova et al., 2002). Entre os tratamentos com 0, 0,5 e 1 % de inclusão os animais estavam com um nível crescente de estímulo imunológico (mesmo sem diferença estatística entre eles), e no 2 % de inclusão

eles demonstraram estar muito mais imunoestimulados, onde o nível das EROs foi mais alto, fato que corrobora com alguns trabalhos que demonstraram o aumento na produção de EROs em camarões imunoestimulados (Campa-Córdova et al., 2002), infectados com o vírus da Síndrome de Taura (Song, Yu, Lien, Huang, & Lin, 2003), da Síndrome da Mancha Branca e da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (Cantelli, 2012; Sarathi et al., 2007).

Observou-se uma tendência de um aumento na produção de EROs 1 h após o choque térmico em todos os grupos experimentais. Este aumento pode ter sido causado pela condição de hipóxia e re-oxigenação que ocorre pela redução drástica do metabolismo dos camarões durante o choque térmico e volta às altas temperaturas. Estudos demonstram que essa situação geralmente provoca a produção das EROs no organismo (García-triana, Peregrino-Uriarte, & Yepiz-Plascencia, 2016; Hermes-Lima et al., 2015; Li et al., 2016), bem como quando se há mais saturação de oxigênio, há maior produção de EROs (Lehmann et al., 2016). E pode-se observar que na coleta 24 horas após o choque que os valores das espécies reativas de oxigênio estavam novamente muito próximos ao valor da coleta anterior ao choque, demonstrando que os animais conseguiram retornar ao seu nível basal. Isso é muito importante, pois a presença de moléculas tóxicas altamente potentes, como as EROs, na ausência de um processo infeccioso, é com certeza uma sobrecarga energética muito cara ao organismo, além de provocar graves danos a seus próprios tecidos (Warner, HR, 1994).

Analisando a capacidade de produção de EROs pelos hemócitos após estimulação com indutor celular (laminarina) dentro de cada tratamento, percebe-se um aumento de 2,5 x no grupo com 1 % de inclusão da microalga 24 h após o choque térmico em relação ao basal. Estes resultados indicam que esta concentração foi capaz de aumentar a capacidade dos hemócitos em produzir EROs após estimulação. Enquanto isso, no mesmo período (24 h), o tratamento 2 % apresentou uma alta produção basal, em torno de 2,6 x superior aos hemócitos que foram estimulados com laminarina. Estes resultados sugerem que os hemócitos destes animais já se encontravam em sua capacidade máxima de resposta por *burst* respiratório, antes mesmo do contato *in vitro* com o indutor. Ou contrariamente, que estas células estavam inaptas a gerar EROs, podendo indicar uma baixa na competência imunológica nestes animais durante este período. Desta forma, 24 h após o choque, apesar do grupo 2 % apresentar valores basais superiores de  $O_2^-$ , não houve um aumento na capacidade dos hemócitos em produzir espécies reativas de oxigênio após estimulação com indutor, o que aconteceu com o grupo 1 %.

Mesmo sem diferença estatística entre alguns dos parâmetros imunológicos, pode-se observar uma tendência de aumento conforme o aumento da inclusão da alga e posterior

queda no 2 % de inclusão. Fato que sugere a imunoestimulação dos animais, que pode ser observado pela queda no título de aglutinação, cuja alteração em situações de infecção e estresse é amplamente conhecida na literatura. Dado que corrobora com Maggioni, Andreatta, Hermes, & Barracco (2004), que demonstrou a mesma queda no título aglutinante após processo de ablação unilateral em fêmeas adultas de *Litopenaeus vannamei*. Pode ser constatado também pela queda da capacidade coagulante da hemolinfa e na contagem total de hemócitos, que é comum acontecer quando se há um processo infeccioso, em condições estressantes ou em animais imunoestimulados (Campa-Córdova et al., 2002; Perazzolo et al., 2002; Sarathi et al., 2007), onde os hemócitos migram, se infiltrando nos tecidos infectados ou feridos (Jiravanichpaisal, Lee, & Söderhäll, 2006), ocorrendo também em crustáceos infectados pelo vírus da Síndrome da Mancha Branca e vírus da Mionecrose Infecciosa (Costa, Buglione, Bezerra, Martins, & Barracco, 2009; Guertler et al., 2013; Sarathi et al., 2007; Yeh, Lee, Chen, 2009). A atividade da fenoloxidase aumentou e voltou a diminuir no nível de 2% de inclusão da microalga, esse aumento é importante, pois esse sistema age em várias situações de defesa no organismo e imunoestimulação, como fagocitose, formação de nódulos e encapsulamento, que termina no processo de melanização (Fu et al., 2007; Sarathi et al., 2007). Sua diminuição e da concentração proteica vão de acordo com alguns estudos que mostram esse comportamento em camarões em situação de estresse. E o aumento inicial da PO com posterior queda, sugere a supressão parcial da proPO, provavelmente causada por estresse (Costa et al., 2009; Chang et al., 2003; Perazzolo et al., 2002).

Os tratamentos com níveis de 0,5 e 1 % de inclusão pareceram estar melhor protegidos contra uma futura infecção, sem tanto custo fisiológico aos animais, do que o tratamento com 2 % de inclusão, apesar de esse estar mais imunoestimulado. Autores concordam que o aumento do CTH proporciona uma melhor proteção dos camarões contra infecções, considerando que os hemócitos são os principais responsáveis pelas diferentes reações imunocelulares e são os locais de expressão de diferentes moléculas de defesa do organismo. Bem como o aumento na capacidade de aglutinação da hemolinfa, baixos níveis de EROs e a capacidade dos hemócitos em produzir espécies reativas de oxigênio após estimulação com laminarina (Abele e Puntarulo, 2004; Bogdan, Röllinghoff, & Diefenbach, 2000; Roch, 1999).

Acredita-se não ser um fator positivo aos animais ter um sistema imune constantemente ativado, sendo que o ideal seria causar um fortalecimento do sistema imune buscando uma maior imunocompetência dos animais para uma maior capacidade e rapidez de resposta ante uma infecção (Warner, 1994). Vemos como positivo o fato de incluir a

microalga na alimentação dos animais durante 15 dias e já deixá-los imunoestimulados em seu nível basal. Onde isso poderia ser utilizado como trunfo, com um tempo relativamente curto de alimentação, melhorariamos sua imunocompetência, e eles poderiam estar melhor preparados para momentos previsíveis de estresse, como mudanças de temperatura, por exemplo, estando com o sistema imune mais fortalecido, evitando o surgimento de doenças.

Seria interessante futuros trabalhos para testar a influência da inclusão da microalga nos parâmetros zootécnicos dos camarões e que se fizesse um desafio contra bactérias do gênero *Vibrio* e contra o vírus da mancha branca, para ver se os mais imunoestimulados responderiam melhor frente a uma infecção.

### 2.1.5 CONCLUSÃO

A digestibilidade da farinha de *Nannochloropsis* spp pelo *Litopenaeus vannamei* se mostrou alta para todos os seus nutrientes.

A inclusão de 0,5 e 2 % de *Nannochloropsis* spp. na dieta aumenta a resistência dos camarões ao estresse térmico, sem influenciar a microbiota do trato intestinal.

Os hemócitos dos animais alimentados com 1 % de *Nannochloropsis* spp. na dieta foram efetivamente capazes de aumentar a produção da espécie reativa de oxigênio, ânion superóxido, após estimulação *in vitro* pela laminarina e com melhor recuperação aos níveis basais. No nível de 2 % de inclusão os animais estavam mais imunoestimulados em seu nível basal, sendo capazes de produzir mais moléculas altamente reativas (EROs), que poderiam ser usadas no caso de uma infecção.

### 2.1.6 AGRADECIMENTOS

Este trabalho possui financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – código de Financiamento 001 e do projeto Aquavita (Horizon 2020, número 818173). Felipe do Nascimento Vieira (305357/2017-4) é bolsista de produtividade do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Agradecemos ainda a Sofia Engrola por gentilmente ter auxiliado na aquisição da farinha de microalgas.

### 2.1.7 REFERÊNCIAS

Abele, D., & Puntarulo, S. (2004). Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative*

*Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 138(4), 405-415. doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.05.013

AOAC, I. (1999). Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of AOAC International.

Apha, American Public Health Association. (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA Inc, Baltimore.

Ashour, M., Elshobary, M. E., El-Shenody, R., Kamil, A. W., & Abomohra, A. E. F. (2019). Evaluation of a native oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* for dual use in biodiesel production and aquaculture feed. *Biomass and bioenergy*, 120, 439-447. doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.12.009

Balasubramanian, G., Sarathi, M., Venkatesan, C., Thomas, J., & Hameed, A. S. (2008). Studies on the immunomodulatory effect of extract of *Cyanodon dactylon* in shrimp, *Penaeus monodon*, and its efficacy to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). *Fish & Shellfish Immunology*, 25(6), 820-828. doi.org/10.1016/j.fsi.2008.09.002

Beçak, W.; Paulete, J. (1976). Técnicas de citologia e histologia. Rio de Janeiro: Liv. Técnicos e Científicos, 327p.

Bell, K. L., & Smith, V. J. (1993). In vitro superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Developmental & Comparative Immunology*, 17(3), 211-219. doi.org/10.1016/0145-305X(93)90040-W

Bogdan, C., Röllinghoff, M., & Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current opinion in immunology*, 12(1), 64-76. doi.org/10.1016/S0952-7915(99)00052-7

Boyd, C. E. (2003). Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. *Aquaculture*, 226(1-4), 101-112.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00471-X

Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., De Philippis, R., & Ascencio, F. (2002). Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & shellfish immunology*, 12(4), 353-366. doi.org/10.1006/fsim.2001.0377

Cantelli, L. (2012). Avaliação do efeito de polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gracilaria birdiae* sobre as condições de imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).

Chang, C. F., Chen, H. Y., Su, M. S., & Liao, I. C. (2000). Immunomodulation by dietary  $\beta$ -1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(6), 505-514. doi.org/10.1006/fsim.2000.0266

Chang, C. F., Su, M. S., Chen, H. Y., & Liao, I. C. (2003). Dietary  $\beta$ -1, 3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish & shellfish immunology*, 15(4), 297-310. doi.org/10.1016/S1050-4648(02)00167-5

Chowanski, S., Lubawy, J., Spochacz, M., Paluch, E., Smykalla, G., Rosinski, G., Slocinska, M., 2015. Cold induced changes in lipid, protein and carbohydrate levels in the tropical insect *Gromphadorhina coquereliana*. *Comp. Biochem. Physiol. part A*. 183, 57-63. doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.01.007

Córcoles-Sáez, I., Hernández, M.L., Martínez-Rivas, J.M., Prieto, J.A., Rande-Gil, F., 2016. Characterization of the *S. cerevisiae* inp51 mutant links phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels with lipid content, membrane fluidity and cold growth. *Biochim. Biophys. Acta*. 1861, 213-226. doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.12.014

Corrêa, C.F., Nobrega, R.O., Mattioni, B., Fracalossi, D.M., 2018. Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. *Aquaculture* 497, 82-90. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.034

Costa, A. M., Buglione, C. C., Bezerra, F. L., Martins, P. C., & Barracco, M. A. (2009). Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. *Aquaculture*, 291(3-4), 141-146. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.013

Espinoza-Gallardo, D., Contreras-Porcía, L., & Ehrenfeld, N. (2017).  $\beta$ -glucanos, su producción y propiedades en microalgas con énfasis en el género *Nannochloropsis* (*Ochrophyta*, *Eustigmatales*). *Revista de biología marina y oceanografía*, 52(1), 33-49. dx.doi.org/10.4067/S0718-19572017000100003

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations) (2020). The state of world fisheries and aquaculture. Roma, SOFIA.

Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 (1), 497-509.

Fu, Y. W., Hou, W. Y., Yeh, S. T., Li, C. H., & Chen, J. C. (2007). The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, 22(6), 673-685. doi.org/10.1016/j.fsi.2006.08.014

García-Triana, A., Peregrino-Uriarte, A. B., & Yepiz-Plascencia, G. (2016). Selenoprotein M gene expression, peroxidases activity and hydrogen peroxide concentration are differentially regulated in gill and hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* during hypoxia and reoxygenation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 199, 14-20. doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.04.019

Gamboa-Delgado, J., & Márquez-Reyes, J. M. (2018). Potential of microbial-derived nutrients for aquaculture development. *Reviews in Aquaculture*, 10(1), 224-246. doi.org/10.1111/raq.12157

Glencross, B. D.; Smith, D. M. (2001). Optimizing the essential fatty acids, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid, in the diet of the prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition*, 7, 101-112. doi.org/10.1046/j.1365-2095.2001.00158.x

Guertler, C., Schleder, D. D., Barracco, M. A., & Perazzolo, L. M. (2010). Comparative study of the intracellular superoxide anion production in different penaeid species through the NBT-reduction assay. *Aquaculture research*, 41(7), 1082-1088. doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02393.x

Guertler, C., Rieg, T., Mejía-Ruíz, C. H., Lehmann, M., Barracco, M. A., & Perazzolo, L. M. (2013). Hemograma e sobrevivência de camarões marinhos após silenciamento do WSSV por RNA de interferência. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(8), 983-990.

Gullian, M., Thompson, F., & Rodriguez, J. (2004). Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233(1-4), 1-14. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.013

Harpaz, S., Becker, K., Blum, R., 1999. The effect of dietary L-carnitine supplementation on cold tolerance and growth of the ornamental cichlid fish *Pelvicachromis pulcher* - preliminary results. *J. Therm. Biol.* 24, 57-62. doi.org/10.1016/S0306-4565(98)00038-2

Hayward, S.A.L., Manso, B., Cossins, A.R., 2014. Molecular basis of chill resistance adaptations in poikilothermic animals. *J. Exp. Biol.* 217, 6-15. doi: 10.1242/jeb.096537

Hermes-Lima, M., Moreira, D. C., Rivera-Ingraham, G. A., Giraud-Billoud, M., Genaro-Mattos, T. C., & Campos, É. G. (2015). Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: revisiting the proposal two decades later. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 1122-1143. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.156

Hulatt, C. J., Wijffels, R. H., Bolla, S., & Kiron, V. (2017). Production of fatty acids and protein by *Nannochloropsis* in flat-plate photobioreactors. *PloS one*, 12(1). doi.org/10.1371/journal.pone.0170440

Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211(4), 213-236. doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.015

Ju, Z. Y., Forster, I. P., & Dominy, W. G. (2009). Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 292(3-4), 237-243. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.040

Kanazawa, A., Teshima, S., & Ono, K. (1979). Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 63(3), 295-298. DOI: 10.1016/0305-0491(79)90251-7

Kautsky, N., Rönnbäck, P., Tedengren, M., & Troell, M. (2000). Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*, 191(1-3), 145-161. doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00424-5



Lehmann, M., Schleder, D. D., Guertler, C., Perazzolo, L. M., & Vinatea, L. (2016). Hypoxia increases susceptibility of Pacific white shrimp to whitespot syndrome virus (WSSV). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *68*(2), 397-403. doi.org/10.1590/1678-4162-7942

Li, Y., Wei, L., Cao, J., Qiu, L., Jiang, X., Li, P., ... & Diao, X. (2016). Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere*, *144*, 234-240. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.051

Maggioni, D. S., Andreatta, E. R., Hermes, E. M., & Barracco, M. A. (2004). Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. *Aquaculture*, *241*(1-4), 501-515. doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00530-1

Maldonado, M., Rodríguez, J., de Blas, I., & Echecharria, F. (2003). Comportamiento hemocitario en familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas al WSSV. In *II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura 2003. CIVA 2003* (pp. 891-9).

Mercier, L., Racotta, I. S., Yepiz-Plascencia, G., Muhlia-Almazán, A., Civera, R., Quiñones-Arreola, M. F., ... & Palacios, E. (2009). Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on physiological and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to handling stress. *Aquaculture Research*, *40*(16), 1849-1863. doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02291.x

Moss, S.M., Forster, I.P., Tacon, A.G.J., (2006). Sparing effects of pond water on vitamins in shrimp diets. *Aquaculture*, *258* (1-4), 388–395. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.008

National Research Council. (2011). Nutrient requirements of fish and shrimp. National academies press.

Otoshi, C.A., Montgomery, A.D., Look, A.M., Moss, S.M., (2001). Effects of diet and water source on the nursery production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, *32*(2), 243–249. doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb01102.x

Perazzolo, L. M., Gargioni, R., Ogliari, P., & Barracco, M. A. (2002). Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*, *214*(1-4), 19-33. doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00137-0

Pruitt, N.L., 1990. Adaptations to temperature in the cellular membranes of crustacea: membrane structure and metabolism. *J. Therm. Biol.* *15*, 1-8.

Roch, P. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrate. *Aquaculture*, *172*(1-2), 125-145. doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00439-6

Rojo-Cebreros, A. H., Ibarra-Castro, L., Martínez-Brown, J. M., Velasco-Blanco, G., Martínez-Téllez, M. A., Medina-Jasso, M. A., ... & Quintana-Zavala, D. (2017). Potential of

*Nannochloropsis* in beta glucan production. In *Nannochloropsis: Biology, biotechnological potential and challenges* (pp. 181-225). Nova Science Publishers, Inc.

Samocha, T.M., Patnaik, S., Davis, D.A., Bullis, R.A., Browdy, C.L., (2010). Use of commercial fermentation products as a highly unsaturated fatty acid source in practical diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 41(7), 961–967. doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02378.x

Sanchez, D.R., J.M. Fox, R. Gatlin III and A.L. Lawrence. (2012). Dietary effect of fish oil and soybean lecithin on growth and survival of juvenile *Litopenaeus vannamei* in the presence or absence of phytoplankton in an indoor system. *Aquaculture Research*, 45(8), 1367-1379. doi.org/10.1111/are.12083

Sarathi, M.; Ahmed, V.P.I.; Venkatesan, C.; Balasubramanian, G.; Prabavathy, J.; Hameed, A.S.S. (2007). Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 271(1-4), 8-20. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.002

Shah, M. R., Lutz, G. A., Alam, A., Sarker, P., Chowdhury, M. K., Parsaeimehr, A., ... & Daroch, M. (2018). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 197-213. doi. 10.1007/s10811-017-1234-z

Smith, V. J., & Soderhall, K. (1983).  $\beta$ -1, 3 Glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. *The Biological Bulletin*, 164(2), 299-314. doi/abs/10.2307/1541146

Schleder, D. D., Da Rosa, J. R., Guimarães, A. M., Ramlov, F., Maraschin, M., Seiffert, W. Q., ... & Andreatta, E. R. (2017a). Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on thermal stress resistance, midgut microbiology, and immunology. *Journal of Applied Phycology*, 29(5), 2471-2477. doi. 10.1007/s10811-017-1129-z

Schleder, D. D., Blank, M., Peruch, L. G. B., do Nascimento Vieira, F., Andreatta, E. R., & Hayashi, L. (2017b). Thermal resistance of Pacific white shrimp fed *Sargassum filipendula*: A MALDI-TOF mass spectrometry approach. *Aquaculture*, 481, 103-111. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.028

Schumann, J., 2016. It is all about fluidity: Fatty acids and macrophage phagocytosis. *Eur. J. Pharmacol.* 785, 1 8–23. doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.04.057

Song, Y. L., & Huang, C. C. (1999). Application of immunostimulants to prevent shrimp diseases. *Immunobiology and pathology, Recent advances in marine biotechnology*, 5, 173-188.

Song, Y. L., Yu, C. I., Lien, T. W., Huang, C. C., & Lin, M. N. (2003). Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*, 14(4), 317-331. doi.org/10.1006/fsim.2002.0440

Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis.

Takahashi, D., Imai, H., Kawamura, Y., Uemura, M., (2016). Lipid profiles of detergent resistant fractions of the plasma membrane in oat and rye in association with cold acclimation and freezing tolerance. *Cryobiology*. 72, 123-134. doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.02.003

Takeuchi, T., Lu, J. U. N., Yoshizaki, G., & Satoh, S. (2002). Effect on the growth and body composition of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*, 68(1), 34-40. doi.org/10.1046/j.1444-2906.2002.00386.x

Teets, N.M., Denlinger, D.L., 2013. Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. *Physiol. Entomol.* 38, 105-116. doi.org/10.1111/phen.12019

Turchini, G. M., Torstensen, B. E., & Ng, W. K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 10-57. doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x

Volkman, J. K., Brown, M. R., Dunstan, G. A., & Jeffrey, S. W. (1993). The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae 1. *Journal of Phycology*, 29(1), 69-78. doi.org/10.1111/j.1529-8817.1993.tb00281.x

Warner, H. R. (1994). Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free radical biology and medicine*, 17(3), 249-258. doi.org/10.1016/0891-5849(94)90080-9

Yeh, S. T., Lee, C. S., & Chen, J. C. (2006). Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(3), 332-345. doi.org/10.1016/j.fsi.2005.05.008

Yeh, R. Y., Shiu, Y. L., Shei, S. C., Cheng, S. C., Huang, S. Y., Lin, J. C., & Liu, C. H. (2009). Evaluation of the antibacterial activity of leaf and twig extracts of stout camphor tree, *Cinnamomum kanehirae*, and the effects on immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 27(1), 26-32. doi.org/10.1016/j.fsi.2008.11.008

Zhang, S. P., Li, J. F., Wu, X. C., Zhong, W. J., Xian, J. A., Liao, S. A., ... & Wang, A. L. (2013). Effects of different dietary lipid level on the growth, survival and immune-relating genes expression in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 34(5), 1131-1138. doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.016

## 2.2 ARTIGO 2

### **Farinha de microalgas (*Aurantiochytrium* sp. e *Nannochloropsis* spp.) em substituição ao óleo de peixe em dietas práticas para o camarão-branco-do-pacífico**

#### **RESUMO**

No presente estudo foi avaliado o uso das farinhas de microalgas *Aurantiochytrium* sp. e *Nannochloropsis* spp. em cinco níveis de substituição (0, 25, 50, 75, 100%) ao óleo de peixe na dieta de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*). O cultivo foi realizado em sistema de água clara, contendo 40 camarões por tanque de 500L, com peso inicial de  $3,37 \pm 0,29$ g, alimentados quatro vezes ao dia de acordo com conversão alimentar programada. Os tratamentos foram avaliados em triplicata e cada tanque continha sistema de aeração constante e aquecimento da água. Renovações de água foram realizadas uma vez ao dia a uma taxa de 80% do volume final do tanque. Após 49 dias de cultivo foram avaliados os parâmetros zootécnicos e analisada a composição de ácidos graxos no músculo dos animais. A formulação se mostrou adequada e foi refletida no crescimento dos animais, que foi em média 1,89 gramas por semana. Não houve diferença estatística significativa nos parâmetros zootécnicos entre os tratamentos nem na composição de ácidos graxos no músculo dos animais, onde, mesmo no tratamento com 100% de substituição do óleo de peixe, os níveis de ácidos graxos foram mantidos equilibrados, inclusive a quantidade de ácidos graxos n-3. A sobrevivência ficou elevada e a substituição total do óleo de peixe não prejudicou esses parâmetros, uma vez que o crescimento foi semelhante entre os camarões do controle e do tratamento com 100 % de substituição. A dieta com 100 % de substituição do óleo de peixe pela farinha de microalgas teve excelentes resultados zootécnicos, mostrando que é possível a formulação de uma dieta de alto desempenho sem nenhum ingrediente de origem marinha (óleo ou farinha de peixe) contribuindo para a sustentabilidade da aquicultura.

**Palavras-chaves:** *Litopenaeus vannamei*, DHA, EPA.

## ABSTRACT

In the present study, the use of microalgae flours *Aurantiochytrium* sp. and *Nannochloropsis* spp. at five replacement levels (0, 25, 50, 75, 100%) to fish oil in the diet of marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Cultivation was carried out in a clear water system, containing 40 shrimp per 500L tank, with an initial weight of  $3.37 \pm 0.29$ g, fed four times a day according to programmed feed conversion. The treatments were evaluated in triplicate and each tank had a constant aeration system and water heating. Water changes were performed once a day at a rate of 80% of the final tank volume. After 49 days of cultivation, the zootechnical parameters were evaluated and the fatty acid composition of the animals' muscle was analyzed. The formulation proved to be adequate and was reflected in the growth of the animals, which averaged 1.89 grams per week. There was no statistically significant difference in the zootechnical parameters between treatments nor in the fatty acid composition in the animal's muscle, where, even in the treatment with 100% replacement of fish oil, the fatty acid levels were kept balanced, including the amount of n-3 fatty acids. Survival was high and total replacement of fish oil did not affect these parameters, as growth was similar between control and 100% replacement treatment shrimp. The diet with 100% replacement of fish oil by microalgae flour had excellent zootechnical results, showing that it is possible to formulate a high performance diet without any marine ingredients (oil or fish meal) contributing to the sustainability of aquaculture.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*; DHA; EPA.

### 2.2.1 INTRODUÇÃO

Dentre os principais ingredientes da ração de camarões estão a farinha e o óleo de peixe. Comparada a outras atividades zootécnicas, a aquicultura é a que tem a maior demanda por farinha e óleo de peixe (Tacon et al., 2002; Nunes et al., 2011), sendo que a carcinicultura é o segundo maior grupo de espécies aquáticas a utilizar esses insumos (Tacon et al., 2002; Tacon & Metian, 2008). Estes ingredientes possuem alto valor nutritivo e alta digestibilidade, contudo, muitas vezes são provenientes da pesca extrativista, onde uma parte significativa dos peixes ainda é processada para virar farinha e óleo de peixe (Amaya et al., 2007; Tacon & Metian, 2008; Olsen; Hasan, 2012; FAO, 2020). Em 2018, 12% da produção total de pescados foi utilizada para fins não alimentares, o que equivaleu a 21,48 milhões de toneladas. Nos últimos anos, por questões éticas, ambientais e pelo aumento dos preços do insumo - visto que o óleo de peixe também está sendo usado como suplemento nutricional para a saúde humana, houve uma tendência de queda em seu uso. Tendências apontam uma diminuição ainda maior nas próximas décadas, onde se acredita que esses ingredientes serão utilizados apenas estrategicamente, em pequenas quantidades e fases específicas de cultivo (FAO, 2014; 2020).

Sendo assim, para que se mantenha a sustentabilidade e crescimento da atividade deve-se haver o desenvolvimento de ingredientes alternativos à farinha e ao óleo de peixe para uso nas rações em aquicultura. Vários são os estudos que demonstram a possibilidade da substituição da farinha de peixe por ingredientes de origem vegetal ou subprodutos de origem animal (Amaya et al., 2007; Sá et al., 2013; Chen et al., 2015). Contudo, alguns trabalhos demonstram a direta relação com a diminuição do uso da farinha e aumento do uso do óleo para não haver efeitos deletéreos no crescimento de camarões (Amaya et al., 2007; Sá et al., 2013). A substituição do óleo de peixe é mais complexa e menos estudada, entretanto, nos últimos anos, algumas pesquisas começaram a surgir e demonstraram a possibilidade de substituição desse ingrediente da dieta por óleos vegetais e de microalgas (González-Félix et al., 2010; Wang et al., 2017; Correa et al., 2018; Kumar et al., 2018; Perez-Velazquez et al., 2018; Allen et al., 2019; Guimarães et al., 2019; Tibbets et al., 2020).

Os animais aquáticos têm capacidade limitada para síntese de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (PUFAs), devendo os mesmos, virem na sua dieta. Ao se substituir demasiadamente os ingredientes das rações por fontes de origem vegetal (pobres em n-3 e ricos em n-6), o animal produzido terá um menor teor desses ácidos graxos na carne, porque o teor de ácidos graxos no músculo do animal ao final do cultivo (o produto entregue ao consumidor) reflete o conteúdo em ácidos graxos de sua alimentação (Suárez et al., 2002; Martin et al., 2006; Amaya et al., 2007; Domingo et al., 2007; Turchini et al., 2009;

González-Félix et al. 2010; NRC, 2011; Allen et al., 2019; Guimarães et al., 2019). Alimentos de origem vegetal como leguminosas, cereais e óleos vegetais são ricos em ácidos graxos poliinsaturados n-6 e já estão presentes na alimentação humana, oriundos de diversas fontes. Já os ácidos graxos poliinsaturados n-3 estão presentes em peixes e camarões, servindo como “alimentos funcionais” na prevenção de certas doenças, sendo alvos cada vez maior de atenção e procura por humanos pela busca por uma alimentação saudável e uma maior qualidade de vida (Vicentiner, 2000; Suárez et al., 2002; Anjo, 2004; Martin et al., 2006; Domingo, 2007; González-Félix et al. 2010; Smith & Guentzel, 2010).

Ao mesmo tempo em que se necessita de ingredientes alternativos à farinha e ao óleo de peixe, deve-se produzir alimentos com qualidade, ricos nutricionalmente com ácidos graxos da série n-3 em sua composição, através de uma matéria-prima também rica em n-3. Nesse contexto, as microalgas são indicadas como potenciais substitutos ao óleo de peixe, visto que são ricos em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (Richimond, 2004; Derner et al., 2006; Lourenço, 2006; Harwood & Guschina, 2009). Com seu uso irá se preservar a qualidade do alimento, gerando um produto saudável e de alto valor nutritivo, trazendo os diversos benefícios associados aos ácidos graxos da série n-3 à saúde humana (Suárez et al., 2002; Martin et al., 2006; Amaya et al., 2007; Domingo et al., 2007; Turchini et al., 2009; NRC, 2011; Guimarães et al., 2019). Além de se manter a contribuição nutricional mais significativa dos pescados, que são a proteína de alta qualidade, os micronutrientes e os PUFAs (FAO, 2020).

A espécie *Aurantiochytrium* sp. é uma microalga com capacidade de produzir altas taxas de concentrações lipídicas (mais de 70% da sua massa) e apresenta um perfil de ácidos graxos com alta quantidade do ácido graxo docosahexaenóico (DHA) (Lewis et al., 1999). E as microalgas do gênero *Nannochloropsis* são ricas em lipídeos e contêm altos níveis de ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) (Volkman et al., 1993; Hulatt et al., 2017; Ashour et al., 2019). Seus usos na alimentação dos camarões estão vinculados a diversos benefícios, como melhora no crescimento, na sobrevivência e aumento da qualidade nutricional da carne dos animais produzidos com aumento no seu teor de ácidos graxos poliinsaturados (Ju et al., 2009; Sanchez et al., 2012; Gamboa-Delgado & Márquez-Reyes, 2018; Guimarães et al., 2019).

Para camarões cultivados, diversos trabalhos demonstram que uma equilibrada concentração entre os ácidos graxos na dieta promove seu crescimento (Glencross & Smith, 1999; Gong et al., 2000; NRC, 2011). Glencross e Smith (1999) demonstraram que a manutenção do equilíbrio entre ácidos graxos linoléico e linolênico aumentou o crescimento

dos animais e em 2001 demonstraram que a combinação de EPA e DHA promoveu o mesmo resultado positivo. Outro estudo com a adição de DHA e ácido graxo linoléico e linolênico na dieta do camarão-branco-do-pacífico demonstrou o crescimento dos animais e observaram o incremento em seu ganho de peso (Gonzales-Félix et al., 2002; Gonzales-Félix et al., 2003). E Guimarães et al. (2019) demonstrou que a substituição total do óleo de peixe por farinha de *Aurantiochytrium* sp., rica em DHA, foi possível sem efeitos negativos nos parâmetros zootécnicos dos animais e aumentou a quantidade de ácidos graxos da série n-3 na carne dos camarões. Entretanto, aumentaram todos os ácidos graxos contidos na farinha, como os saturados, refletindo na carne o que havia na composição da dieta.

No intuito de encontrar uma composição de farinha equilibrada quanto ao uso dos ácidos graxos DHA e EPA para ser o substituto do óleo de peixe, este trabalho avaliou o uso das farinhas de *Aurantiochytrium* sp. (rica em ácido graxo docosahexaenóico) e *Nannochloropsis* spp. (rica em ácido graxo eicosapentahenóico) em cinco níveis de substituição (0, 25, 50, 75 e 100%) ao óleo de peixe. A dieta foi formulada sem farinha de peixe, e o experimento feito com o camarão-branco-do-pacífico (*Litopenaeus vannamei*), avaliando os efeitos sobre seus parâmetros zootécnicos e perfil de ácidos graxos no músculo dos camarões.

## 2.2.2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi feita no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), pertencente à Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. Utilizou-se camarões marinhos da espécie *Litopenaeus vannamei* da linhagem Speedline Aqua, provenientes da empresa Aquatec Aquicultura Ltda (Rio Grande do Norte, Brasil). As pós-larvas foram mantidas em sistema de bioflocos até atingirem o tamanho adequado para o experimento - peso médio de  $3,37 \pm 0,29$ g.

### DIETAS EXPERIMENTAIS

A farinha de *Aurantiochytrium* sp. foi adquirida da empresa Alltech - All-G-Rich (EUA), e a farinha de *Nannochloropsis* spp. da empresa Necton – PhytoBloom (Portugal). A análise de composição centesimal das farinhas (Tabela 1) foi feita antes da formulação das dietas pelo Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI), pertencente ao Departamento de Aquicultura da UFSC, seguindo procedimento padrão (AOAC, 1999).

Para o experimento foram formuladas cinco dietas experimentais (Tabela 2), com aproximadamente 37,20 % de proteína bruta, 3.757,86 kcal/kg de energia e 8,63 % de extrato



etéreo, com níveis de substituição do óleo de peixe (Tabela 2) pela farinha de *Aurantiochytrium* sp. e *Nannochloropsis* spp. em 0 % (controle), 25 %, 50 %, 75 % e 100 %. A formulação foi feita para que se mantivesse a proporção DHA/EPA entre os tratamentos, conforme se substituiu o óleo de peixe proporcionalmente pelas farinhas de *Aurantiochytrium* sp. como fonte de DHA e de *Nannochloropsis* spp. como fonte de EPA. Além disso, a porcentagem de inclusão dos ingredientes foi balanceada para que se mantivesse a igualdade (ou mínima variação) entre a proteína, energia e extrato etéreo entre as dietas, podendo ser consideradas isoproteicas e isoenergéticas.

Tabela 1: Resumo das informações nutricionais e composição centesimal do óleo de peixe, da farinha de *Aurantiochytrium* sp. e da farinha de *Nannochloropsis* spp., detalhando seus ácidos graxos mais representativos.

<b>Óleo de peixe<sup>1</sup></b>			
Energia bruta *	8.445,00 kcal/kg	Vitamina A *	300,00 mg/kg
Extrato etéreo *	99,00%	Vitamina D*	2.500,00 mg/kg
Colesterol*	0,57%	Vitamina E*	220,00 mg/kg
Ácidos graxos ** (% lipídeos):			
14:0	6,53	22:1 n-9	0,52
16:0	12,99	18:2 n-6	0,86
18:0	2,41	18:4 n-3	1,77
16:1 n-7	7,13	20:4 n-6	1,44
18:1 n-7	2,52	18:3 n-3	0,69
18:1 n-9	4,44	20:5 n-3	12,84
20:1 n-9	0,48	22:6 n-3	5,42
<b>Farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp. (g 100 g<sup>-1</sup> matéria seca)</b>			
Umidade**	1,29	Ácidos graxos** (% lipídeos):	
Gordura bruta**	60,43	14:0	2,03
Fibra bruta *	0,90	16:0	23,08
Carboidratos *	24,88	18:0	0,68
Proteínas **	11,26	20:5 n-3	0,13
Mineral*	3,67	22:6 n-3	10,85
<b>Farinha de <i>Nannochloropsis</i> spp. (g 100 g<sup>-1</sup> matéria seca)</b>			
Umidade**	2,84	Ácidos graxos** (% lipídeos):	
Gordura bruta**	18,95	14:0	0,57
Fibra bruta *	0,90	16:0	2,80
Carboidratos *	24,88	18:1 n-9	0,86
Proteínas**	42,85	20:5 n-3	2,97
Mineral*	3,67	22:6 n-3	0,10

\* Dados informados pelo fabricante.

\*\* Análise feita pelo Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI), pertencente ao Departamento de Aqüicultura da UFSC, seguindo procedimento padrão (AOAC, 1999).

<sup>1</sup> Óleo de peixe distribuído por BFP Bio Food Products (Itajaí, Santa Catarina, Brasil).

Tabela 2: Formulação das dietas experimentais e composição centesimal para o camarão *Litopenaeus vannamei* contendo diferentes níveis de substituição de óleo de peixe pela farinha de microalgas (*Aurantiochytrium* sp. e *Nannochloropsis* spp.).

Ingredientes (g 100g <sup>-1</sup> dieta seca)	Substituição (%)				
	0	25	50	75	100
Farelo de soja	33,00	33,00	33,00	33,00	33,00
Concentrado proteico de soja	16,05	13,20	10,40	7,50	5,00
Farinha de trigo	13,50	14,00	14,50	15,00	15,00
Farinha de vísceras de aves	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
Caulim	9,60	8,52	7,37	6,34	5,59
Lecitina de soja	2,20	2,20	2,20	2,20	2,20
Fosfato monocálcio	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Sulfato de magnésio	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Cloreto de sódio	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Premix mineral <sup>a</sup>	1,64	1,64	1,64	1,64	1,64
Cloreto de cálcio	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Carboximetilcelulose	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Premix vitamínico <sup>a</sup>	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
Cloridrato de colina	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Vitamina C <sup>b</sup>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Colesterol purificado	0,02	0,02	0,03	0,03	0,04
Metionina	0,00	0,03	0,07	0,10	0,14
Óleo de peixe	4,00	3,00	2,00	1,00	0,00
Farinha de <i>Aurantiochytrium</i> sp.	0,00	0,40	0,80	1,20	1,70
Farinha de <i>Nannochloropsis</i> spp.	0,00	4,00	8,00	12,00	15,70
<b>Composição centesimal*</b>					
Proteína total	38,13	37,33	38,37	37,93	37,64
Energia bruta (kcal/kg)	3910,41	3995,80	4037,94	4109,59	4138,46
Umidade	7,88	5,36	5,64	5,61	5,08
Cinzas	18,88	18,37	17,54	16,90	16,40
Extrato Etéreo	7,52	8,42	8,16	8,42	8,56
Proporção DHA/EPA	0,33	0,33	0,37	0,31	0,38

<sup>a</sup> – In Vivo Nutrição e Saúde Animal Ltda. (São Paulo, SP, Brasil): vit. A - 900 mg kg<sup>-1</sup>; vit. D<sub>3</sub> - 25 mg kg<sup>-1</sup>; vit. E - 46.900 mg kg<sup>-1</sup>; vit. K<sub>3</sub> - 1.400 mg kg<sup>-1</sup>; cobalamina (B12) - 50 mg kg<sup>-1</sup>; piridoxina (B6) - 33.000 mg kg<sup>-1</sup>; riboflavina - 20.000 mg kg<sup>-1</sup>; ácido nicotínico - 70.000 mg kg<sup>-1</sup>; ácido pantotênico - 40.000 mg kg<sup>-1</sup>; biotina - 750 mg kg<sup>-1</sup>; ácido fólico - 3.000 mg kg<sup>-1</sup>; cobre - 2.330 mg kg<sup>-1</sup>; zinco - 10.000 mg kg<sup>-1</sup>; manganês - 6.500 mg kg<sup>-1</sup>; selênio - 125 mg kg<sup>-1</sup>; iodo - 1.000 mg kg<sup>-1</sup>; cobalto - 50 mg kg<sup>-1</sup>; magnésio - 20 g kg<sup>-1</sup>; potássio - 6,1 g kg<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> – L-ácido ascórbico-2-monofosfato 35%. DSM Produtos Nutricionais Brasil (São Paulo, SP, Brasil).

\*Análise feita pelo Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI), pertencente ao Departamento de Aquicultura da UFSC, seguindo procedimento padrão (AOAC, 1999): Matéria seca pelo método 950.01; Matéria Mineral pelo método 942.05; Proteína por Kjeldahl, fator de conversão 6,25; Extrato etéreo por Soxhlet pelo método 920.39C. A energia bruta foi determinada em bomba calorimétrica; e análise de ácidos graxos por Blich-Dyer (1959).

As dietas foram formuladas com o auxílio do software Optimal Fórmula 2000, com base nas recomendações e exigências nutricionais para o ótimo desempenho da espécie (*L. vannamei*), sendo que para as exigências não identificadas, utilizou-se a espécie *P. monodon* como referência (NRC, 2011). O cadastro dos ingredientes foi feito com base em laudos de análises e com base em relatórios da empresa fornecedora do ingrediente, unidos à pesquisa bibliográfica (Turchini et al., 2009; Akiyama, 1988; Rostagno et al., 2005; Lima et al., 2006; 2011).

Para a fabricação da ração, os ingredientes foram previamente triturados e peneirados em malha de 600 µm. Cada dieta teve seus ingredientes pesados e separados, sendo misturados no momento da fabricação. Primeiro se misturaram a seco todos os macro ingredientes e os micro ingredientes entre si, depois ambos foram misturados manualmente. Depois se acrescentou os óleos e a lecitina de soja, por último a umidade foi ajustada para 19% para ser peletizada em matriz de 1,5mm e tamanho final do pélete de 2mm (Inbramaq, MX-40). Após peletização as rações foram secas separadamente em estufa a 40°C até que atingissem a umidade de 8% (aproximadamente 1 h, com umidade checada a cada 10 min). Em seguida as rações foram embaladas e congeladas até o momento de cada alimentação, para evitar a perda de ácidos graxos.

## ANÁLISES DE COMPOSIÇÃO

A análise das dietas foi feita pelo Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LabNutri), seguindo metodologia descrita pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*, 1999). As dietas foram submetidas à análise de matéria seca com secagem a 105°C, cinzas com queima a 550°C, proteína por Kjeldahl (N x 6,25), e extrato etéreo por Soxhlet após hidrólise ácida. As análises de ácidos graxos foram medidas por cromatografia gasosa pelo método de Bligh-Dyer (1959), conforme descrito por Corrêa, Nobrega, Mattioni, Fracalossi (2018). Para comparação dos tempos de retenção dos ácidos graxos se utilizou os óleos de Menhaden e mix 37.

## DELINEAMENTO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

O experimento consistiu na alimentação dos camarões em fase de engorda testando-se cinco dietas experimentais com níveis de substituição de 0, 25, 50, 75 e 100% de substituição do óleo de peixe por farinha de *Aurantiochytrium* sp. e *Nannochloropsis* spp. O delineamento foi inteiramente casualizado, com três réplicas por tratamento, consistindo num

total de 15 unidades experimentais formadas por tanques circulares de polietileno com fundo plano e capacidade de 500 litros (volume útil de 400 litros).

O cultivo foi feito em sistema de água clara, numa sala com sistema de distribuição de água salgada, aeração, termostatos e aquecedores, para a manutenção da temperatura da água. A água utilizada foi oriunda da praia da Barra da Lagoa (Florianópolis, SC, Brasil), com as seguintes características: salinidade de 31,74 g. L<sup>-1</sup>; alcalinidade 132,8 mg. L<sup>-1</sup>; pH 8,00; amônia 0,3 mg. L<sup>-1</sup>; e nitrito 0 mg. L<sup>-1</sup>. A renovação da água foi feita todos os dias, no período da tarde, a uma taxa aproximada de 80% do volume, para retirada do excesso de matéria orgânica (fezes, mudas e restos de alimentação).

As unidades experimentais foram povoadas com 40 camarões de peso médio de 3,37± 0,29 g, resultando na densidade inicial de cultivo de 60 camarões m<sup>-3</sup>. Na primeira semana a alimentação foi fornecida de acordo com a tabela de Van Wyk e Scarpa (1999), onde os animais foram alimentados com o equivalente a 7 % da biomassa. A partir da segunda semana a alimentação foi ajustada semanalmente, por conversão programada estimada de 1:1,5, de acordo com as biometrias realizadas (Davis et al., 2004). Nas biometrias semanais todos os animais eram retirados do tanque, contados e pesados, ajustando-se a alimentação da semana seguinte conforme crescimento e conversão.

As alimentações foram fornecidas quatro vezes ao dia (8h; 12h; 13h30min; 17h30min) totalmente nas bandejas de alimentação, com área de 0,03 m<sup>2</sup> para posterior verificação do consumo (1,5 h após a oferta do alimento).

Durante o experimento o oxigênio dissolvido (6,87 ± 0,02 mg L<sup>-1</sup>), a temperatura (28,43 ± 0,04 °C), o pH (8,07 ± 0,00), a alcalinidade (127,94 ± 2,70 mg. L<sup>-1</sup>) e a salinidade (32,92 ± 0,13 g. L<sup>-1</sup>) permaneceram estáveis; e a amônia (<0,5 mg L<sup>-1</sup>), e nitrito (<0,14 mg L<sup>-1</sup>) em níveis baixos, dentro dos limites estipulados adequados para camarões marinhos (Boyd & Gautier, 2000). O oxigênio dissolvido e temperatura foram medidos duas vezes ao dia, uma vez no período da manhã e outra pelo período da tarde, com multiparâmetro YSI – Professional Plus; todos os demais parâmetros foram medidos uma vez na semana. O pH e salinidade foram medidos com o multiparâmetro; a alcalinidade seguiu o método de APHA (2005); e a amônia e nitrito o método de Strickland e Parsons (1972).

#### PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS

Durante as biometrias semanais, todos os animais foram contados e pesados, e ao final dos 49 dias de cultivo a biometria final foi feita para obtenção dos parâmetros zootécnicos abaixo:

Crescimento Semanal (g/semana) = {[peso médio final (g) – peso médio inicial (g)] / dias de cultivo} \* 7

Conversão Alimentar (CA) = ração consumida (kg) /biomassa de camarão produzida (kg)

Sobrevivência (%) = (número final de camarões / número inicial de camarões) \* 100

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa Statistica 10 (StatSoft®) com regressão linear e quadrática e nível de significância de 5%.

### 2.2.3 RESULTADOS

#### PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS

Quanto aos resultados dos parâmetros zootécnicos (Tabela 3), o crescimento dos animais ficou em torno de 1,89 g/semana. A conversão alimentar foi em média de 1,47 com sobrevivência acima de 97% entre os tratamentos. O peso final obtido foi em média de 16,59 gramas. Não houve diferença estatística significativa para nenhum dos parâmetros entre os diferentes tratamentos.

Tabela 3: Parâmetros zootécnicos de camarões (*Litopenaeus vannamei*) alimentados com dietas com substituição do óleo de peixe por farinha de *Aurantiochytrium* sp. e *Nannochloropsis* spp, cultivados em sistema de água clara por 49 dias.

Tratamentos	Peso final (g)	Crescimento semanal (g/semana)	Conversão alimentar	Sobr. (%)
0	16,25 ± 0,47	1,84 ± 0,32	1,50 ± 0,25	97,50%
25	16,57 ± 0,55	1,88 ± 0,36	1,48 ± 0,33	97,50%
50	16,69 ± 0,23	1,90 ± 0,31	1,46 ± 0,29	97,50%
75	16,74 ± 0,09	1,91 ± 0,22	1,44 ± 0,26	98,33%
100	16,70 ± 0,59	1,90 ± 0,31	1,46 ± 0,27	98,33%
Efeito quadrático	NS	NS	NS	NS

NS = não significativo, Sobr. = sobrevivência.

#### ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO MÚSCULO

Não houve diferença estatística significativa para a análise do perfil de ácidos graxos no músculo dos animais entre os tratamentos. A quantidade de ácidos graxos se manteve

constante, independente das substituições do óleo de peixe pela farinha de microalgas, bem como sua quantidade dentro dos grupos, como n-6 e n-3.

Tabela 4: Perfil de ácidos graxos do músculo dos camarões (*Litopenaeus vannamei*) alimentados com dietas com substituição do óleo de peixe por farinha de *Aurantiochytrium* sp. e *Nannochloropsis* spp, cultivados em sistema de água clara por 49 dias.

Perfil de ácidos graxos do músculo dos camarões	Tratamentos					
	Controle	25%	50%	75%	100%	Regressão*
Ácidos graxos (% matéria seca)						
Ácido Palmítico (16:0)	0,31	0,35	0,37	0,41	0,36	NS
Estearico (18:0)	0,15	0,11	0,18	0,18	0,17	NS
Oléico (18:1n9)	0,20	0,21	0,21	0,23	0,19	NS
Linoléico (18:2n-6)	0,14	0,15	0,22	0,24	0,14	NS
Eicosatrienóico (20:3n-3)	0,05	0,06	0,07	0,09	0,08	NS
Tricosanóico (23:0)	0,09	0,10	0,09	0,10	0,09	NS
Eicosapentaenóico (20:5n-3)	0,24	0,24	0,23	0,23	0,18	NS
Docosahexanóico (22:6n-3)	0,12	0,15	0,14	0,16	0,15	NS
OUTROS	0,13	0,14	0,11	0,13	0,08	NS
SFA <sup>a</sup>	0,57	0,59	0,67	0,72	0,65	NS
MUFA	0,27	0,34	0,30	0,31	0,26	NS
PUFA	0,64	0,71	0,70	0,75	0,61	NS
PUFA n-3	0,42	0,46	0,45	0,48	0,38	NS
PUFA n-6	0,17	0,18	0,22	0,26	0,18	NS
n-3/n-6	2,47	2,55	2,10	1,85	2,11	NS

\* Foi realizado o teste de regressão linear e quadrática.

NS = Não significativo

<sup>a</sup> Grupos de ácidos graxos: SFA = saturados, MUFA = monosaturados, PUFA = poliinsaturados.

## 2.2.4 DISCUSSÃO

As dietas formuladas apresentaram o mesmo nível de proteína, energia, extrato etéreo e adequada relação de DHA/EPA, atendendo às exigências nutricionais da espécie utilizada no experimento (*Litopenaeus vannamei*) (NRC, 2011). A formulação se mostrou adequada e foi refletida no crescimento dos animais, sendo superior a 1,84 gramas por semana. Este crescimento é superior ao relatado por outros trabalhos com a mesma espécie em fase de engorda (Suárez et al., 2009; Bauer et al., 2012).

A sobrevivência se manteve elevada, sem diferença significativa entre os tratamentos, assim como os demais parâmetros zootécnicos, conforme observado em outros estudos com substituição do óleo de peixe atendendo as exigências nutricionais da espécie (González-Félix et al., 2010; Allen et al., 2019). Mesmo no tratamento com nível de 100% de substituição, onde não havia nem farinha nem óleo de peixe, caracterizada como uma dieta basicamente vegetal (exceto pela farinha de vísceras de aves), os resultados foram semelhantes aos demais tratamentos. A substituição total do óleo de peixe não prejudicou esses parâmetros, uma vez que o crescimento foi semelhante entre os camarões do controle e do tratamento com 100 % de substituição. Fato citado por Chen et al. (2015) que demonstrou que uma adequada proporção de ácidos graxos nas dietas com substituição, podem promover igual crescimento e sobrevivência àquela obtida pelas dietas com óleo de peixe.

Estudos demonstram que a composição do músculo dos camarões – composição final da carne, reflete diretamente a composição da dieta. González-Félix et al. (2010) substituiu o óleo de peixe por óleo de soja e de linhaça; e Guimarães et al. (2019) substituiu óleo de peixe por farinha de *Aurantiochytrium* sp.; e observaram a diminuição dos ácidos graxos da série n-3 (González-Félix et al. 2010) e o aumento de alguns ácidos graxos na carne dos animais, conforme era incluída farinha na dieta, como por exemplo, o ácido graxo palmítico (Guimarães et al., 2019). Neste trabalho, diferentemente dos citados, pode-se observar uma equilibrada concentração dos ácidos graxos no músculo dos animais, se mantendo a quantidade e proporções, conforme as substituições foram feitas. Esse resultado se apresenta como um bom indicativo para que se consiga chegar a uma composição ideal de um óleo de microalgas que substitua com qualidade o óleo de peixe das dietas, gerando um produto final com a qualidade nutricional desejada pelo consumidor.

Ressalta-se que a dieta com 100 % de substituição do óleo de peixe pela farinha de microalgas teve resultados zootécnicos adequados para a espécie, mostrando que é possível a formulação de uma dieta de alto desempenho para camarões sem nenhum ingrediente de origem marinha (óleo ou farinha de peixe), com farinha de resíduos de aves como único ingrediente de origem animal. Se demonstrando que é viável a substituição do óleo de peixe por farinha de microalgas, contrariando trabalhos em que se afirmava não ser possível retirar o óleo e a farinha de peixe das dietas de aquicultura (Amaya et al., 2007; Sá et al., 2013). Ainda que, atualmente, seja mais caro a produção e aquisição da farinha de microalgas do que do óleo de peixe, essa é uma fonte escassa, fadada ao não uso num futuro próximo (FAO 2014, 2020; Sprague et al., 2017). Assim, acreditamos que a indústria viabilizará essa



produção, apoiada no desenvolvimento de novas tecnologias de cultivo e produção de microalgas.

Deste modo, se demonstrou que é possível a substituição do óleo de peixe por um produto independente da pesca extrativista, mantendo a qualidade nutricional e teor de n-3 e n-6 na carne do animal produzido. Produto esse que terá consigo uma contribuição nutricional significativa e de alta qualidade, com proteína, micronutrientes e PUFA's (FAO, 2020), tão importantes para a saúde humana (Visentainer et al., 2000; Domingo et al., 2007; Smith & Guentzel, 2010) e caracterizado por ser ambientalmente amigável, contribuindo para a sustentabilidade da aquicultura.

### 2.2.5 CONCLUSÃO

A substituição parcial ou total do óleo de peixe pela farinha de *Aurantiochytrium* sp. e *Nannochloropsis* spp. não afeta os parâmetros zootécnicos dos camarões.

A substituição parcial ou total do óleo de peixe pela farinha de *Aurantiochytrium* sp. e *Nannochloropsis* spp. manteve a composição de ácidos graxos no músculo dos camarões produzidos.

### 2.2.6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – código de Financiamento 001 e do projeto Aquavitae (Horizon 2020, número 818173). Felipe do Nascimento Vieira (305357/2017-4) é bolsista de produtividade do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Agradecemos ainda a bolsa de doutorado da Ariane Martins Guimarães; a Sofia Engrola por gentilmente ter auxiliado na aquisição da farinha de microalgas; a empresa Alltech, BFP e BRF pela doação dos ingredientes para a fabricação das dietas experimentais.

### 2.2.7 REFERÊNCIAS

Akiyama DM (1988). Soybean meal utilization by marine shrimp. AOCS world congress on vegetable protein utilization in human food and animal feed stuffs, Singapore.

Allen, K. M., Habte-Tsion, H. M., Thompson, K. R., Filer, K., Tidwell, J. H., & Kumar, V. (2019). Freshwater microalgae (*Schizochytrium* sp.) as a substitute to fish oil for shrimp feed. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.

Amaya, E., Davis, D. A., & Rouse, D. B. (2007). Alternative diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 262(2-4), 419-425.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.001>

Anjo, D. F. C. (2020). Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal vascular brasileiro*, 3(2), 145-154. Disponível em:

<http://www.jvb.periodikos.com.br/journal/jvb/article/5e1f5f740e88256a3dd8495a>

AOAC, I. (1999). Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of AOAC International.

Apha, American Public Health Association. (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA Inc, Baltimore.

Bauer, W., Prentice-Hernandez, C., Tesser, M. B., Wasielesky Jr, W., & Poersch, L. H. (2012). Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 342, 112-116.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.023>

Boyd CE, Gautier D. Effluent composition and water quality standards. *Global Aquaculture Advocate*. 2000; 3: 61-66.

Chen, K., Li, E., Xu, C., Wang, X., Lin, H., Qin, J. G., & Chen, L. (2015). Evaluation of different lipid sources in diet of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquaculture Reports*, 2, 163-168. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2015.10.003>

Corrêa, C.F., Nobrega, R.O., Mattioni, B., Fracalossi, D.M., (2018). Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. *Aquaculture* 497, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.034>

Davis, D. A., Samocha, T. M., Bullis, R. A., Patnaik, S., Browdy, C. L., Stokes, A. D., & Atwood, H. L. (2004). Practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931): working towards organic and/or all plant production diets. *Avances en Nutrición Acuicola*. Acesso em: <http://eprints.uanl.mx/8363/>

Derner, R. B., Ohse, S., Villela, M., Carvalho, S. M. D., & Fett, R. (2006). Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, 36(6), 1959-1967.

Domingo, J. L., Bocio, A., Falcó, G., & Llobet, J. M. (2007). Benefits and risks of fish consumption: Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology*, 230(2-3), 219-226. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.11.054>

FAO, F. (2014). Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). *World Review of fisheries and aquaculture*. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/sofia/en>

FAO, F. (2020). Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). *World Review of fisheries and aquaculture*. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/ca9231en>

- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.
- Glencross, B. D., & Smith, D. M. (1999). The dietary linoleic and linolenic fatty acids requirements of the prawn *Penaeus monodon*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1999.00086.x>
- Gong, H., Lawrence, A. L., Jiang, D. H., & Gatlin III, D. M. (2000). Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei*: II. Active components of soybean lecithin. *Aquaculture*, 190(3-4), 325-342. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00415-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00415-4)
- González-Félix, M. L., Gatlin III, D. M., Lawrence, A. L., & Perez-Velazquez, M. (2002). Effect of dietary phospholipid on essential fatty acid requirements and tissue lipid composition of *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, 207(1-2), 151-167. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00797-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00797-9)
- González-Félix, M. L., Lawrence, A. L., Gatlin III, D. M., & Perez-Velazquez, M. (2003). Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: I. Effect of dietary linoleic and linolenic acids at different concentrations and ratios on juvenile shrimp growth, survival and fatty acid composition. *Aquaculture Nutrition*, 9(2), 105-113. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00231.x>
- González-Félix, M. L., da Silva, F. S. D., Davis, D. A., Samocha, T. M., Morris, T. C., Wilkenfeld, J. S., & Perez-Velazquez, M. (2010). Replacement of fish oil in plant based diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 309(1-4), 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.028>
- Guimarães, A. M., Dias Schleder, D., Nagata, M., Nóbrega, R. O., Fracalossi, D. M., Quadros Seiffert, W., & do Nascimento Vieira, F. (2019). *Aurantiochytrium* sp. meal can replace fish oil in practical diets for the juvenile Pacific white shrimp. *Aquaculture Nutrition*, 25(4), 798-807. <https://doi.org/10.1111/anu.12897>
- Harwood, J. L., & Guschina, I. A. (2009). The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, 91(6), 679-684. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.11.004>
- Kumar, V., Habte-Tsion, H. M., Allen, K. M., Bowman, B. A., Thompson, K. R., El-Haroun, E., ... & Tidwell, J. H. (2018). Replacement of fish oil with *Schizochytrium* meal and its impacts on the growth and lipid metabolism of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture nutrition*, 24(6), 1769-1781. <https://doi.org/10.1111/anu.12816>
- Lima DM, Padovani RM, Rodriguez-Amaya DB, Farfán JA, Nonato CT, Lima MT, et al (2006). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA); EM ALIMENTAÇÃO. Universidade Estadual de Campinas [NEPA/Unicamp]. *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos [TACO]: versão, 1*. Disponível em: [http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco\\_versao2.pdf](http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_versao2.pdf)
- Lima DM, Padovani RM, Rodriguez-Amaya DB, Farfán JA, Nonato CT, Lima MT, et al (2011). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). Núcleo de Estudos e

Pesquisas em Alimentação (NEPA); EM ALIMENTAÇÃO. Universidade Estadual de Campinas [NEPA/Unicamp]. *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos [TACO]: versão, 1*. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela>

Lourenço, S. O. (2006). *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações* (Vol. 606). São Carlos: RiMa.

Martin, C. A., Almeida, V. V. D., Ruiz, M. R., Visentainer, J. E. L., Matshushita, M., Souza, N. E. D., & Visentainer, J. V. (2006). Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição, 19*(6), 761-770. [HTTP://doi.org/10.1590/S1415-52732006000600011](http://doi.org/10.1590/S1415-52732006000600011)

Nunes, A. J. P., Sá, M. D. C., & NETO, H. (2011). As próximas gerações de ração para camarão marinho. *Panorama da Aqüicultura, 21*(123), 24-35.

Nutrient requirements of fish and shrimp, Council, N. R. (2011). Nutrient requirements of fish and shrimp. *National Academies Press 2011*.

Olsen, R. L., & Hasan, M. R. (2012). A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology, 27*(2), 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.003>

Perez-Velazquez, M., Gatlin III, D. M., González-Félix, M. L., & García-Ortega, A. (2018). Partial replacement of fishmeal and fish oil by algal meals in diets of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture, 487*, 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.001>

Richmond, A. (Ed.). (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phyecology* (Vol. 577). Oxford: Blackwell Science.

Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Donzele, J. L., Gomes, P. C., De Oliveira, R. F., Lopes, D. C., ... & Euclides, R. F. (2005). Tabelas brasileiras para suínos e aves: composição de alimentos e exigências nutricionais. Disponível em: [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Tabelas+brasileiras+-+Rostagno\\_000gy1tqvm602wx7ha0b6gs0xfzo6pk5.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Tabelas+brasileiras+-+Rostagno_000gy1tqvm602wx7ha0b6gs0xfzo6pk5.pdf)

Sá, M. V. C., Sabry-Neto, H., Cordeiro-Júnior, E., & Nunes, A. J. P. (2013). Dietary concentration of marine oil affects replacement of fish meal by soy protein concentrate in practical diets for the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition, 19*(2), 199-210. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2012.00954.x>

Smith, K. L., & Guentzel, J. L. (2010). Mercury concentrations and omega-3 fatty acids in fish and shrimp: preferential consumption for maximum health benefits. *Marine pollution bulletin, 60*(9), 1615-1618. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.06.045>

Sprague, M., Betancor, M. B., & Tocher, D. R. (2017). Microbial and genetically engineered oils as replacements for fish oil in aquaculture feeds. *Biotechnology letters, 39*(11), 1599-1609.

Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis.

- Suárez, J. A., Gaxiola, G., Mendoza, R., Cadavid, S., Garcia, G., Alanis, G., ... & Cuzon, G. (2009). Substitution of fish meal with plant protein sources and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*, 289(1-2), 118-123. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.01.001>.
- Tacon, A. G. J., Cody, J. J., Conquest, L. D., Divakaran, S., Forster, I. P., & Decamp, O. E. (2002). Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture nutrition*, 8(2), 121-137. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2002.00199.x>
- Tacon, A. G., & Metian, M. (2008). Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285(1-4), 146-158. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.08.015>
- Tibbetts, S. M., Scaife, M. A., & Armenta, R. E. (2020). Apparent digestibility of proximate nutrients, energy and fatty acids in nutritionally-balanced diets with partial or complete replacement of dietary fish oil with microbial oil from a novel *Schizochytrium* sp.(T18) by juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 520, 735003. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735003>
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E., & Ng, W. K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 10-57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>
- Van Wyk, P., Davis-Hodgkins, M., Laramore, R., Main, K. L., Mountain, J., & Scarpa, J. (1999). *Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems* (pp. 128-138). Ft. Pierce, FL: Harbor Branch Oceanographic Institution.
- Visentainer, J. V., Carvalho, P. D. O., Ikegaki, M., & Park, Y. K. (2000). Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. *Food Science and Technology*, 20(1), 90-93.
- Wang, Y., Li, M., Filer, K., Xue, Y., Ai, Q., & Mai, K. (2017). Replacement of fish oil with a DHA-rich *Schizochytrium* meal on growth performance, activities of digestive enzyme and fatty acid profile of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture Nutrition*, 23(5), 1113-1120. <https://doi.org/10.1111/anu.12479>

### 3 CONCLUSÃO GERAL

No primeiro experimento foi demonstrado que a digestibilidade da farinha de *Nannochloropsis* spp pelo *Litopenaeus vannamei* se mostrou alta para todos os seus nutrientes. A inclusão de 0,5 e 2 % de *Nannochloropsis* spp. na dieta aumentou a resistência dos camarões ao estresse térmico, sem influenciar a microbiota do trato intestinal. Os hemócitos dos animais alimentados com 1 % de *Nannochloropsis* spp. na dieta foram efetivamente capazes de aumentar a produção da espécie reativa de oxigênio, ânion superóxido, após estimulação *in vitro* pela laminarina e com melhor recuperação aos níveis basais. No nível de 2 % de inclusão os animais estavam mais imunoestimulados em seu nível basal, sendo capazes de produzir mais moléculas altamente reativas (EROs), que poderiam ser usadas no caso de uma infecção.

No segundo experimento se observou que a substituição parcial ou total do óleo de peixe pela farinha de *Aurantiochytrium* sp. e *Nannochloropsis* spp. não afetou os parâmetros zootécnicos dos camarões nem a composição em ácidos graxos no músculo dos animais produzidos. Sendo o tratamento com 100% de substituição uma dieta sem farinha nem óleo de peixe, demonstrou-se possível a substituição do óleo sem nenhum prejuízo à saúde, composição ou crescimento dos animais, abrindo um novo horizonte para que outros estudos continuem a formular um óleo mais completo, quanto ao seu perfil de ácidos graxos, e substituto ideal ao óleo de peixe, ajudando na sustentabilidade da aquicultura.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABDEL-RAOUF, N. et al. Microalgae and wastewater treatment. *Journal of Biological Sciences*, n. 19, p. 57–275, 2012.

ADARME-VEGA, T.C. et al. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microb. Cell Factories* 11, 2012.

AMAYA, E.; DAVIS, D. A.; ROUSE, D. B. Alternative diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, v. 262, n. 2, p. 419-425, 2007.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.

ARMENTA, R.E., Valentine, M.C. Single-cell oils as a source of omega-3 fatty acids: an overview of recent advances. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 90, 167–182, 2013.

ASHOUR, M. et al. Evaluation of a native oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* for dual use in biodiesel production and aquaculture feed. *Biomass and bioenergy*, 120, 439-447, 2019.

BALASUBRAMANIAN, G. et al. Studies on the immunomodulatory effect of extract of *Cyanodon dactylon* in shrimp, *Penaeus monodon*, and its efficacy to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). *Fish & Shellfish Immunology*, 25(6), 820-828, 2008.

BALBOA, E. M. et al. *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry*, v. 138, p. 1764-1785, 2013.

BARCLAY, W.R. et al. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *J. Appl. Phycol.* 6, 123–129, 1994.

BELL, K. L., & SMITH, V. J. In vitro superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Developmental & Comparative Immunology*, 17(3), 211-219, 1993.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37 (8), 911-917, 1959.

BURJA, A.M., et al. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 1161–1169, 2006.

CAMPA-CÓRDOVA, A. I. et al. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & shellfish immunology*, 12(4), 353-366, 2002.

CANTELLI, L. Avaliação do efeito de polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gracilaria birdiae* sobre as condições de imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), 2012.

CHAKRABORTY, S. et al. Screening, isolation and optimization of anti-white spot syndrome virus drug derived from marine plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 4, p. S107-S117, 2014.

CHANG, C. F. et al. Immunomodulation by dietary  $\beta$ -1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(6), 505-514, 2000.

CHANG, C. F. et al. Dietary  $\beta$ -1, 3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish & shellfish immunology*, 15(4), 297-310, 2003.

CHEN, Ke et al. Evaluation of different lipid sources in diet of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquaculture Reports*, v. 2, p. 163-168, 2015.

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

CHOWANSKI, S. et al. Cold induced changes in lipid, protein and carbohydrate levels in the tropical insect *Gromphadorhina coquereliana*. *Comp. Biochem. Physiol. part A*. 183, 57-63, 2015.

CÓRCOLES-SÁEZ, I. et al. Characterization of the *S. cerevisiae* inp51 mutant links phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels with lipid content, membrane fluidity and cold growth. *Biochim. Biophys. Acta*. 1861, 213-226, 2016.

CORRÊA, C.F. et al. Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. *Aquaculture* 497, 82-90, 2018.

CRUZ-SUÁREZ, L. E. et al. A review of the effects of macroalgae in shrimp feeds and in co-culture. In: CRUZ-SUÁREZ, L. E. et al. Avances en Nutrición Acuícola IX, IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Monterrey, UANL, p. 304-330, 2008.

DERNER, R. B. et al. Microalgae, products and applications. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.6, p.1959-1967, 2006.

DOMINGO, J.L.; et al. Benefits and risks of fish consumption: Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology*, v. 230, n. 2, p. 219-226, 2007.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). The state of world fisheries and aquaculture. Roma, SOFIA, 2014.



FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). The state of world fisheries and aquaculture. Roma, SOFIA, 2016.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations). The state of world fisheries and aquaculture. Roma, SOFIA, 2020.

FERNANDO, I. P. S.; NAH, J. W.; JEON, Y. J. Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 48, p. 22–30, 2016.

FLEGEL, T. W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 110, p. 166-173, 2012.

FLEURENCE, J. et al. What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?. *Trends in Food Science & Technology*, v. 27, p. 57-61, 2012.

FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. 1 ed. *Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática*. Florianópolis, 2013.

FU, Y. W. et al. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & shellfish immunology*, 22(6), 673-685, 2007.

GAMBOA-DELGADO, J.; MÁRQUEZ-REYES, J. M. Potential of microbial-derived nutrients for aquaculture development. *Reviews in Aquaculture*, 10(1), 224-246, 2018.

GANUZA, E. et al. Cryptocodium cohnii and Schizochytrium sp. as potential substitutes to fisheries-derived oils from seabream (*Sparus aurata*) microdiets. *Aquaculture*, v. 277, n. 1-2, p. 109-116, 2008.

GLENCROSS, B. D.; SMITH, D. M. The dietary linoleic and linolenic fatty acids requirements of the prawn *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition*, v. 5, n. 1, p. 53-64, 1999.

GLENCROSS, B. D.; SMITH, D. M. Optimizing the essential fatty acids, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid, in the diet of the prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition*, v. 7, n. 2, p. 101-112, 2001.

GONG, H. et al. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei*. II. Active components of soybean lecithin. *Aquaculture*, v. 190 (3/4), p. 325-342, 2000.

GONZÁLEZ-FÉLIX, M.L.; et al. Effect of dietary phospholipid on essential fatty acid requirements and tissue lipid composition of *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*, v. 207, n. 1, p. 151-167, 2002.

- GONZÁLEZ-FÉLIX, M. L.; et al. Nutritional evaluation of fatty acids for the open thelycum shrimp, *Litopenaeus vannamei*: I. Effect of dietary linoleic and linolenic acids at different concentrations and ratios on juvenile shrimp growth, survival and fatty acid composition. *Aquaculture Nutrition*, v. 9, n. 2, p. 105-113, 2003.
- GONZÁLEZ-FÉLIX, M. L. et al. Replacement of fish oil in plant based diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, v. 309, n. 1-4, p. 152-158, 2010.
- GUERTLER, C. et al. Comparative study of the intracellular superoxide anion production in different penaeid species through the NBT-reduction assay. *Aquaculture research*, 41(7), 1082-1088, 2010.
- GUERTLER, C. et al. Hemograma e sobrevivência de camarões marinhos após silenciamento do WSSV por RNA de interferência. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48(8), 983-990, 2013.
- GUIMARÃES, A. M. et al. Aurantiochytrium sp. meal can replace fish oil in practical diets for the juvenile Pacific white shrimp. *Aquaculture Nutrition*, v. 25, n. 4, p. 798-807, 2019.
- GUIMARÃES, A. M. et al. Nannochloropsis spp. as Feed Additive for the Pacific White Shrimp: Effect on Midgut Microbiology, Thermal Shock Resistance and Immunology. *Animals*, v. 11, n. 1, p. 150, 2021.
- GULLIAN, M. et al. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233(1-4), 1-14, 2004.
- HARPAZ, S. et al. The effect of dietary L-carnitine supplementation on cold tolerance and growth of the ornamental cichlid fish *Pelvicachromis pulcher* - preliminary results. *J. Therm. Biol.* 24, 57-62, 1999.
- HARWOOD, J. L.; GUSCHINA, I. A. The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie*, v. 91, n. 6, p. 679-684, 2009.
- HAYWARD, S.A.L. et al. Molecular basis of chill resistance adaptations in poikilothermic animals. *J. Exp. Biol.* 217, 6-15, 2014.
- HULATT, C. J. et al. Production of fatty acids and protein by *Nannochloropsis* in flat-plate photobioreactors. *PloS one*, 12(1), 2017.
- HUYNH, T. et al. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 31, p. 286-293, 2011.
- IMMANUEL, G. et al. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). *Fish and Shellfish Immunology*, v. 32, p.551-564, 2012.

JACOB-LOPES, E. et al. Rates of CO<sub>2</sub> removal by *Aphanothece microscopica* Nägeli in tubular photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, n. 8, p. 1365- 1373, 2008.

JU, Z. Y. et al. Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 292(3-4), 237-243, 2009.

KANAZAWA, A. et al. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 63, n. 3, p. 295-298, 1979.

KAUTSKY, N. et al. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture*, 191(1-3), 145-161, 2000.

KUBITZA, F. Nutrição e alimentação de tilápias—parte I. *Panorama da Aquicultura*, v. 2, n. 52, p. 42-50, 1999.

KUMAR, Vikas et al. Replacement of fish oil with Schizochytrium meal and its impacts on the growth and lipid metabolism of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition*, v. 24, n. 6, p. 1769-1781, 2018.

LEHMANN, M. et al. Hypoxia increases susceptibility of Pacific white shrimp to whitespot syndrome virus (WSSV). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68(2), 397-403, 2016.

LEWIS, T.E. et al. The biological potential of thraustochytrids. *Mar. Biotechnol.* 1, 580–587, 1999.

LEYLAND, B. et al. Are Thraustochytrids algae? *Fungal Biol.* 121, 835–840, 2017.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas- princípios e aplicações. Rima: São Carlos, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brok*. 10 ed. São Paulo; Prattice Hall Inc., 608p, 2004.

MALDONADO, M. et al. Comportamiento hemocitario en familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas al WSSV. In *II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura 2003. CIVA 2003* (pp. 891-9), 2003.

MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr*, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MERCIER, L. et al. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on physiological and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to handling stress. *Aquaculture Research*, 40(16), 1849-1863, 2009.

- MILLEDGE, J.J. et al. High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*. *Rev Environ. Sci. Biotechnol.* 15, 67–88, 2016.
- MOSS, S. M. et al. Sparing effects of pond water on vitamins in shrimp diets. *Aquaculture*, 258 (1-4), 388–395, 2006.
- MUSTHAQ, S.; KWANG, J. Oral Vaccination of Baculovirus-Expressed VP28 Displays Enhanced Protection against White Spot Syndrome Virus in *Penaeus monodon*. *PloSOne*, v. 6, n. 11, p. 1-9, 2011.
- NRC (National Research Council), Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, Nutrient requirements of fish and shrimp. Washington: *National Academic press*, 1993.
- NRC (National Research Council), Committee on Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, Nutrient requirements of fish and shrimp, Washington: *National Academic Press*, p. 376, 2011.
- NUNES, A. J. P.; SÁ, M. V. C.; NETO, H. S. As próximas gerações de ração para camarão marinho. *Rev. Panorama da Aquicultura*, v. 21, n. 123, p. 24-35, jan–fev, 2011.
- OLSEN, R. L; HASAN, M. R. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, v.27, p. 120 -128, 2012.
- OTOSHI, C.A. et al. Effects of diet and water source on the nursery production of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32(2), 243–249, 2001.
- PACHECO-VEGA, J.M. et al. Nutritional contribution of fish meal and microalgal biomass produced from two endemic microalgae to the growth of shrimp *Penaeus vannamei*. *Latin american journal of aquatic research*, v. 46, n. 1, p. 53-62, 2018.
- PÁDUA, D. et al. Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoïdan as promising therapeutic agents against breast cancer. *Phytochemistry Letters*, v. 14, p. 91-98, 2015.
- PATNAIK, S. et al. The use of HUFA-rich algal meals in diets for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, v. 12, n. 5, p. 395-401, 2006.
- PENG, J. et al. Identification of cold responsive genes in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridization. *Gene*, v. 575, p. 667-674, 2016.
- PERAZZOLO, L. M. et al. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*, 214(1-4), 19-33, 2002.

PEREZ-VELAZQUEZ, M. et al. Partial replacement of fishmeal and fish oil by algal meals in diets of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, v. 487, p. 41-50, 2018.

PONCE-PALAFOX, J. et al. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*, v. 157, p. 107-115, 1997.

Pruitt, N.L., 1990. Adaptations to temperature in the cellular membranes of crustacea: membrane structure and metabolism. *J. Therm. Biol.* 15, 1-8.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*. 7a. Ed. Coord., 2004.

RICHARD, N. et al. Nutritional mitigation of winter thermal stress in gilthead seabream: Associated metabolic pathways and potential indicators of nutritional state. *Journal of Proteomics*, v. 142, p. 1-14, 2016.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 566 p., 2004.

ROJO-CEBREROS, A. H. et al. Potential of *Nannochloropsis* in beta glucan production. In *Nannochloropsis: Biology, biotechnological potential and challenges* (pp. 181-225). Nova Science Publishers, Inc, 2017.

ROMERO, J.; et al. Effect of conditions culture on growth and lipids accumulation by *Schizochytrium limacinum* in continuous culture. *Journal of Biotechnology*, v. 136, p. S321-S322, 2008.

SÁ, M. V. C.; et al. Dietary concentration of marine oil affects replacement of fish meal by soy protein concentrate in practical diets for the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, v. 19, n. 2, p. 199-210, 2013.

SAMOCHA, T.M. et al. Use of commercial fermentation products as a highly unsaturated fatty acid source in practical diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Research*, 41(7), 961-967, 2010.

SANCHEZ, D.R. et al. Dietary effect of fish oil and soybean lecithin on growth and survival of juvenile *Litopenaeus vannamei* in the presence or absence of phytoplankton in an indoor system. *Aquaculture Research*, 45(8), 1367-1379, 2012.

SANJEEWA, K.K.A. et al. Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: A review. *J. Photoch. Photobio. B.* 162, 100-105, 2016.

SCHLEDER, D. D. et al. Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on thermal stress resistance, midgut microbiology, and immunology. *Journal of Applied Phycology*, 29(5), 2471-2477, 2017.

- SCHLEDER, D. D. et al. Thermal resistance of Pacific white shrimp fed *Sargassum filipendula*: A MALDI-TOF mass spectrometry approach. *Aquaculture*, 481, 103-111, 2017.
- SCHUMANN, J. It is all about fluidity: Fatty acids and macrophage phagocytosis. *Eur. J. Pharmacol.* 785, 18-23, 2016.
- SHAH, M. R. et al. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 197-213, 2018.
- SHEEHAN, et al.. A look back at the U.S. department of Energy's aquatic species program-biodiesel from algae, *National Renewable Energy Laboratory*, Golden, p.1-294, 1998.
- SMITH, K. L.; GUENTZEL, J. L. Mercury concentrations and omega-3 fatty acids in fish and shrimp: Preferential consumption for maximum health benefits. *Marine pollution bulletin*, v. 60, n. 9, p. 1615-1618, 2010.
- SONG, Y. L.; HUANG, C. C. Application of immunostimulants to prevent shrimp diseases. *Immunobiology and pathology, Recent advances in marine biotechnology*, 5, 173-188, 1999.
- SPRAGUE, M., BETANCOR, M. B., & TOCHER, D. R. Microbial and genetically engineered oils as replacements for fish oil in aquaculture feeds. *Biotechnology letters*, 39(11), 1599-1609, 2017.
- SUÁREZ, H. M., et al. Importância de ácidos graxos poli-insaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 101-110, 2002.
- SUSANTO, E. et al. Lipids, fatty acids, and fucoxanthin content from temperate and tropical brown seaweeds. *Aquatic Procedia*, v. 7, p. 66-75, 2016.
- TACON, A.G.J.; et al. Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition*, v. 8, p. 121-137, 2002.
- TACON, A.G.J.; METIAN, M. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture*, v. 285, p. 146-158, 2008.
- TAKAHASHI, D. et al. Lipid profiles of detergent resistant fractions of the plasma membrane in oat and rye in association with cold acclimation and freezing tolerance. *Cryobiology*. 72, 123-134, 2016.
- TAKEUCHI, T. et al. Effect on the growth and body composition of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*, 68(1), 34-40, 2002.

TEETS, N.M., DENLINGER, D.L. Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. *Physiol. Entomol.* 38, 105-116, 2013.

THANIGAIVEL, S. et al. Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture*, v, 464, p. 529-536, 2016.

TIBBETTS, S. M. et al. Apparent digestibility of proximate nutrients, energy and fatty acids in nutritionally-balanced diets with partial or complete replacement of dietary fish oil with microbial oil from a novel *Schizochytrium* sp.(T18) by juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, v. 520, p. 735003, 2020.

TOCHER, D.R.. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture* 449, 94–107, 2015.

TOMAZELLI JUNIOR, O. et al. Effect of *Cynodon dactylon* extract on white spot virus-infected *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, v. 25, p. 1107-1122, 2017.

TURCHINI, G. M.; TORSTENSEN, B. E.; NG, W. K. Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, v. 1, n. 1, p. 10-57, 2009.

UFRGS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Instituto de química. Rio Grande do Sul, 2015. Disponível em: <http://www.iq.ufrgs.br/ead/quimicapop/material/acidograxo.pdf>. Acessado em 02/12/2015.

VERBRUGGEN, B. et al. Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments. *Viruses*, v. 8, p. 1-29, 2016.

VISENTAINER, J. V., et al. Concentração de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, n. 1, p. 90-93, 2000.

VOLKMAN, J. K. et al. The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae 1. *Journal of Phycology*, 29(1), 69-78, 1993.

WANG, Y. et al. Replacement of fish oil with a DHA-rich *Schizochytrium* meal on growth performance, activities of digestive enzyme and fatty acid profile of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture Nutrition*, v. 23, n. 5, p. 1113-1120, 2017.

YEH, S. T. et al. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(3), 332-345, 2006.

ZHANG, S. P. et al. Effects of different dietary lipid level on the growth, survival and immune-relating genes expression in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology*, 34(5), 1131-1138, 2013.

ZHU, L.; et al. Changes of lipid content and fatty acid composition of *Schizochytrium limacinum* in response to different temperatures and salinities. *Process Biochemistry*, v. 42, n. 2, p. 210-214, 2007.