



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

Jaqueline da Rosa Coelho

**Efeitos de um composto fenólico, alga verde e probiótico como aditivo alimentar para o  
camarão-branco-do-pacífico**

Florianópolis  
2022

Jaqueline da Rosa Coelho

**Efeitos de um composto fenólico, alga verde e probiótico como aditivo alimentar para o camarão-branco-do-pacífico**

Tese submetida ao Programa de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Aquicultura

Orientador: Prof. Dr. Felipe do Nascimento Vieira  
Coorientadora: Dra. Norha Constanza Bolívar-Ramírez

Florianópolis

2022

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

Coelho, Jaqueline da Rosa

Efeitos de um composto fenólico, alga verde e probiótico  
como aditivo alimentar para o camarão-branco-do-pacífico /  
Jaqueline da Rosa Coelho ; orientador, Felipe do  
Nascimento Vieira, coorientador, Norha Constanza Bolívar  
Ramírez, 2022.

82 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Litopenaeus vannamei. 3. Carvacrol.  
4. Ulva ohnoi. 5. Lactobacillus plantarum. I. Vieira,  
Felipe do Nascimento . II. Bolívar-Ramírez, Norha Constanza  
. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Jaqueline da Rosa Coelho

**Efeitos de um composto fenólico, alga verde e probiótico como aditivo alimentar 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

Prof. Maurício Laterça Martins, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Carmen Simioni, Dra  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Delano Dias Schleder, Dr  
Instituto Federal Catarinense

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.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Dr. Felipe do Nascimento Vieira  
Orientador

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado à minha família e aos meus amigos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, pela vida e por ter me proporcionado saúde, força, fé e uma mente sã durante estes anos.

Aos meus pais, Clotilde e Edoilde e aos meus irmãos, Uendel e Josué, pela paciência, carinho, amor incondicional e apoio durante toda minha vida.

Ao meu namorado Daniel, pelo incentivo nessa caminhada, pelo carinho, companheirismo, amor, apoio e preocupações em todos os momentos.

Aos demais familiares, muito obrigada por me incentivarem a ser alguém melhor a cada dia, sem vocês eu não conseguiria chegar até aqui. Amo todos vocês!

E como nesse processo não se faz ciência sozinha, gostaria de deixar aqui os meus agradecimentos sinceros a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este estudo pudesse ser desenvolvido. Em especial, gostaria de agradecer:

Ao meu orientador Felipe do Nascimento Vieira, pela oportunidade de integrar a equipe do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM/UFSC), pela confiança depositada, disponibilidade de tempo para a realização deste trabalho, pela paciência, preocupação, ensinamentos, risadas, por fazer pesquisa de forma séria, honesta e principalmente humana, pelas confraternizações e por todas as tentativas em me fazer apreciar comer camarão, o que não teve muito sucesso, rsrs.

A minha coorientadora, Norha C. Bolívar Ramírez, por todo o apoio, confiança, amizade, as horas de conversas e pelos inúmeros ensinamentos.

Aos amigos do LCM, Camila, Daniele, Esmeralda, Gabriela, Isabela, Ivanilson, Jamilly, Juliana, Karolina, Mariana, Ramon, a minha dupla de produção de ração Ariane e Priscila, por toda ajuda durante os experimentos, pelos momentos de confraternização, e principalmente por encherem de alegria meus dias. O apoio mútuo e a amizade de vocês dentro e fora da academia foi um presente durante este processo. Todos vocês são muito especiais e estão guardados em meu coração!

A Claudinha, não só pelas análises de qualidade de água, mas por todo o apoio durante os experimentos, além da amizade, risadas, conversas e incentivo ao meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Carlos que sempre esteve disposto a me ajudar nos experimentos com muita paciência e eficiência. Aos meninos do cultivo, Davi, Diego, Dimas, Ilson e João por toda a força durante os experimentos, risadas e ensinamentos. Aos demais servidores, Andréia,

Motor e toda a equipe que trabalha no LCM que deixam tudo organizado e limpo para nosso trabalho. Obrigada, foi um prazer conhecer pessoas como vocês!

A todos os funcionários da universidade que possibilitam a manutenção e o exercício dessa instituição. Em especial ao Carlito, pelas conversas e as diversas informações sobre o programa e a instituição.

Ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da UFSC pelo carvacrol.

Ao LABNUTRI, pelo auxílio na formulação e fabricação das dietas experimentais.

Ao NEPAQ, pelo espaço durante a infecção experimental.

Ao LAPMAR, pelo auxílio na coleta da alga.

A TODOS os meus amigos e amigas que conquistei ao longo destes anos na universidade, obrigada pelos vários momentos de descontração, alegrias e angústias que passamos juntos. Em especial as amigas Graziela, Mariana, Tamires e a minha colega de moradia e experimento em plena pandemia, Uclédia Roberta.

Aos membros da banca: Mauricio Laterça Martins, Carmen Simioni, e Delano Dias Schleder pela disponibilidade de participar da avaliação deste trabalho e de contribuir com minha formação profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e a todos os seus docentes, pelo aprendizado.

À FAPESC, pela concessão da bolsa de Doutorado.

E por fim, à UFSC, que assim como todas as universidades públicas e gratuitas promovem o desenvolvimento científico em nosso país.

A todos que direta ou indiretamente estiveram e ainda estão presentes em minha vida e que contribuem para que ela seja repleta de realizações e alegrias, a minha sincera e carinhosa gratidão. De coração, muito obrigada!!

Nunca desista de um sonho só por causa do tempo que você vai levar para realizá-lo.  
O tempo vai passar de qualquer forma. (Renato Maia).

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes aditivos alimentares na dieta do camarão-branco-do-pacífico. Para isso foram realizados dois experimentos, sendo que no primeiro foram avaliados o efeito *in vitro* do carvacrol contra diferentes bactérias patogênicas de importância na carcinicultura e o seu efeito *in vivo* no desempenho zootécnico, imunológico, microbiológico e na resistência de *Litopenaeus vannamei* desafiados com *Vibrio parahaemolyticus*. A atividade antimicrobiana do carvacrol foi realizada *in vitro* pela análise da concentração inibitória mínima (CIM) e por difusão em ágar, com bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Para o experimento *in vivo* foram adicionadas diferentes concentrações do carvacrol (1, 3, 4 e 6 mg mL<sup>-1</sup>) na alimentação dos camarões e uma dieta controle, sem aditivo, por quatro semanas. No segundo experimento foi avaliado o efeito *in vivo* da macroalga *Ulva ohnoi* isoladamente e em conjunto com o probiótico *Lactobacillus plantarum* no desempenho zootécnico, imunológico, microbiológico, na sobrevivência de *L. vannamei* desafiados com *V. parahaemolyticus* e ao choque de resistência térmica a temperatura de 11,5 ± 0,1°C. Durante seis semanas os animais foram alimentados com uma dieta controle, sem aditivos, e as demais dietas contendo os mesmos ingredientes, foram suplementadas com 2% da biomassa seca da alga e/ou probiótico na concentração de 1,7 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> por grama de ração. No primeiro experimento, as diferenças estatísticas foram encontrados apenas nos testes *in vitro* no qual a CIM do carvacrol para *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio harveyi* foi de 0,078 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto nas demais bactérias foi de 0,156 mg mL<sup>-1</sup>. Já os maiores halos de inibição foram observados em *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* e demonstraram diferença significativa em relação aos demais microrganismos, exceto *Escherichia coli*. No segundo experimento, após o desafio com *V. parahaemolyticus*, houve diferença significativa entre os grupos controle e alga e controle e probiótico, sendo que os animais suplementados apenas com alga apresentaram maior taxa de mortalidade (92,5%), seguidos dos suplementados com probiótico (90%), alga + probiótico (87,5%) e controle (65%). Os tratamentos controle e alga também demonstraram diferença significativa na resistência ao choque térmico, sendo que os animais tratados com a dieta controle apresentaram maior taxa de mortalidade (37,5%), seguido dos tratamentos com alga + probiótico (32,5%), probiótico (27,5%) e alga (22,5%). De forma geral, o carvacrol e a alga, utilizados como aditivo alimentar, não afetaram os demais parâmetros avaliados. Em conclusão, a atividade antimicrobiana do carvacrol foi confirmada com bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e sugere-se que seu potencial antimicrobiano seja mais eficaz contra *Vibrio* spp. Já a inclusão de *U. ohnoi* na dieta de *L. vannamei* demonstrou efeito positivo na resistência ao choque térmico, mas não demonstrou proteção contra a infecção causada pelo *V. parahaemolyticus*. Contudo, o seu uso combinado com *L. plantarum* não exerceu nenhum efeito sinérgico ou antagônico nos demais parâmetros avaliados.

**Palavras-chave:** Aquicultura. *Litopenaeus vannamei*. Carvacrol. *Ulva ohnoi*. *Lactobacillus plantarum*.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of different food additives on the Pacific white shrimp diet. For this, two experiments were carried out, the first one evaluating the *in vitro* effect of carvacrol against different microorganisms of importance in shrimp farming and its *in vivo* effect on zootechnical, immunological, microbiological and resistance performance of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. The antimicrobial activity of carvacrol was performed *in vitro* by minimum inhibitory concentration (MIC) and agar diffusion analysis with Gram-negative and Gram-positive bacteria. For the *in vivo* experiment, different concentrations of carvacrol (1, 3, 4, and 6 mg mL<sup>-1</sup>) were added to the shrimp feed and a control diet, without additive, for four weeks. The second experiment evaluated the *in vivo* effect of the macroalgae *Ulva ohnoi* alone and together with the probiotic *Lactobacillus plantarum* on the performance of zootechnical, immunological, microbiological, survival of *L. vannamei* challenged with *V. parahaemolyticus* and to the thermal resistance shock at a temperature of  $11.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . For six weeks the animals were fed a control diet, without additives, and the other diets containing the same ingredients were supplemented with 2% of dry seaweed biomass and/or probiotic at a concentration of  $1.7 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>. In the first experiment, statistical differences were found only in the *in vitro* tests in which the MIC of carvacrol for *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio harveyi* was 0.078 mg mL<sup>-1</sup>, while in the other bacteria it was 0.156 mg mL<sup>-1</sup> of carvacrol. The largest inhibition halos were observed in *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* and showed significant differences from other microorganisms, except for *Escherichia coli*. In the second experiment, after the challenge with *V. parahaemolyticus*, there was a significant difference between the control and seaweed and control and probiotic groups, and the animals supplemented with seaweed alone had a higher mortality rate (92.5%), followed by those supplemented with probiotic (90%), seaweed + probiotic (87.5%) and control (65%). The control and seaweed treatments also showed a significant difference in resistance to heat shock, and the animals treated with the control diet had a higher mortality rate (37.5%), followed by treatments with seaweed + probiotic (32.5%), probiotic (27.5%) and seaweed (22.5%). In general, carvacrol and seaweed, used as food additives, did not affect the other parameters evaluated. In conclusion, the antimicrobial activity of carvacrol was confirmed with Gram-negative and Gram-positive bacteria and it is suggested that its antimicrobial potential is more effective against *Vibrio* spp. The inclusion of *U. ohnoi* in the diet of *L. vannamei* did not show protection against infection caused by *V. parahaemolyticus*, but showed better resistance to heat shock. However, its combined use with *L. plantarum* did not exert any synergistic or antagonistic effect on the evaluated parameters.

**Keywords:** Aquaculture. *Litopenaeus vannamei*. Carvacrol. *Ulva ohnoi*. *Lactobacillus plantarum*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura química do carvacrol. .... 10
- Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação do carvacrol. .... 20
- Figura 3. Mecanismos de ação dos probióticos em *Litopenaeus vannamei*. .... 23
- Figura 4. Estrutura vegetativa de *Ulva ohnoi*. .... 26
- Figura 5. Contagem de bactérias do trato intestinal de *Litopenaeus vannamei* alimentados com carvacrol nas concentrações de 1, 3, 4 e 6 mg mL<sup>-1</sup> e uma dieta controle, sem a adição de carvacrol..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6. Mortalidade cumulativa de *Litopenaeus vannamei* alimentados com carvacrol nas concentrações de 1, 3, 4 e 6 mg mL<sup>-1</sup> e uma dieta controle, sem a adição de carvacrol..... 41
- Figura 7. Contagem de bactérias do trato intestinal de *Litopenaeus vannamei* alimentados por seis semanas com uma dieta controle (sem aditivos), dieta contendo alga *Ulva ohnoi* (2%), dieta com probiótico *Lactobacillus plantarum* (1,7 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> por grama de ração) e uma dieta com a combinação de alga + probiótico. .... 59
- Figura 8. Mortalidade cumulativa de *Litopenaeus vannamei* alimentados por seis semanas com uma dieta controle (sem aditivos), dieta contendo alga *Ulva ohnoi* (2%), dieta com probiótico *Lactobacillus plantarum* (1,7 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> por grama de ração) e uma dieta com a combinação de alga + probiótico após o desafio com *V. parahaemolyticus*. .... 60
- Figura 9. Mortalidade cumulativa de *Litopenaeus vannamei* alimentados por seis semanas com uma dieta controle (sem aditivos), dieta contendo alga *Ulva ohnoi* (2%), dieta com probiótico *Lactobacillus plantarum* (1,7 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> por grama de ração) e uma dieta com a combinação de alga + probiótico após o choque térmico. .... 61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulação e composição centesimal da ração utilizada. ....	35
Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) do carvacrol contra diferentes microrganismos.....	39
Tabela 3. Halos de inibição (em mm) pelo método de difusão em ágar com carvacrol contra diferentes microrganismos. ....	39
Tabela 4. Parâmetros imunológicos de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados com carvacrol nas concentrações de 1, 3, 4 e 6 mg mL <sup>-1</sup> e uma dieta controle, sem a adição de carvacrol.....	40
Tabela 5. Parâmetros zootécnicos de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados com carvacrol nas concentrações de 1, 3, 4 e 6 mg mL <sup>-1</sup> e uma dieta controle, sem a adição de carvacrol.....	42
Tabela 6. Formulação e composição centesimal da ração utilizada. ....	54
Tabela 7. Parâmetros zootécnicos de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados por seis semanas com uma dieta controle (sem aditivos), dieta contendo alga <i>Ulva ohnoi</i> (2%), dieta com probiótico <i>Lactobacillus plantarum</i> (1,7 x 10 <sup>8</sup> UFC mL <sup>-1</sup> por grama de ração) e uma dieta com a combinação de alga + probiótico. ....	58
Tabela 8. Parâmetros imunológicos de <i>Litopenaeus vannamei</i> alimentados por seis semanas com uma dieta controle (sem aditivos), dieta contendo alga <i>Ulva ohnoi</i> (2%), dieta com probiótico <i>Lactobacillus plantarum</i> (1,7 x 10 <sup>8</sup> UFC mL <sup>-1</sup> por grama de ração) e uma dieta com a combinação de alga + probiótico. ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHPND - *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease* - Doença da necrose hepatopancreática aguda

AMPs - Peptídeos Antimicrobianos

BAL - Bactérias do Ácido Lático

CIM - concentração inibitória mínima

DHA - ácido docosahexaenóico

DL - Dose letal

FANs - fatores antinutricionais

PAMPs - *pathogen associated molecular patterns* - Padrões Moleculares Associados aos Patógenos

ProPO - pró-fenoloxidase

PRPs - *pattern recognition proteins* - Proteínas de Reconhecimento de Padrões

QS - *Quorum sensing*

THC - contagem total dos hemócitos

TL - Temperatura letal

UFC - unidades formadoras de colônias

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
1.1	ALTERNATIVAS sustentáveis ao uso de quimioterápicos na carcinicultura .....	17
1.1.1	<b>Carvacrol.....</b>	<b>17</b>
1.1.2	<b>Probiótico <i>Lactobacillus plantarum</i> .....</b>	<b>20</b>
1.1.3	<b>Macroalgas .....</b>	<b>24</b>
1.2	OBJETIVOS .....	27
1.2.1	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>27</b>
1.2.2	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>27</b>
1.3	FORMATAÇÃO DO TRABALHO .....	28
<b>2.</b>	<b>ARTIGOS CIENTÍFICOS .....</b>	<b>29</b>
2.1	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DO CARVACROL CONTRA PATÓGENOS DE CAMARÕES E SEU USO COMO ADITIVO ALIMENTAR NA DIETA DO CAMARÃO-BRANCO-DO-PACÍFICO.....	29
2.1.1	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>30</b>
2.1.2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
2.1.2.1	<i>Carvacrol.....</i>	32
2.1.2.2	<i>Cepas bacterianas .....</i>	32
2.1.2.3	<i>Preparo das suspensões bacterianas utilizadas in vitro .....</i>	32
2.1.2.4	<i>Efeitos in vitro do carvacrol contra diferentes microrganismos.....</i>	33
2.1.2.4.1	Análise da concentração inibitória mínima (CIM) .....	33
2.1.2.4.2	Análise por difusão em ágar .....	34
2.1.2.5	<i>Material biológico .....</i>	34
2.1.2.6	<i>Preparo das dietas experimentais .....</i>	34
2.1.2.7	<i>Delineamento experimental .....</i>	35
2.1.2.8	<i>Análise dos parâmetros imunológicos.....</i>	36
2.1.2.9	<i>Análise da microbiota do trato intestinal .....</i>	37
2.1.2.10	<i>Desafio experimental com <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....</i>	37
2.1.2.11	<i>Avaliação dos parâmetros zootécnicos .....</i>	37
2.1.2.12	<i>Análises estatísticas .....</i>	38
2.1.3	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
2.1.3.1	<i>Efeitos in vitro do carvacrol contra diferentes microrganismos.....</i>	38
2.1.3.1.1	Análise da concentração inibitória mínima (CIM) .....	38
2.1.3.1.2	Análise por difusão em ágar .....	39
2.1.3.2	<i>Parâmetros de qualidade de água.....</i>	39

2.1.3.3	<i>Análise dos parâmetros imunológicos</i> .....	40
2.1.3.4	<i>Análise da microbiota do trato intestinal</i> .....	40
2.1.3.5	<i>Desafio experimental com Vibrio parahaemolyticus</i> .....	41
2.1.3.6	<i>Avaliação dos parâmetros zootécnicos</i> .....	42
<b>2.1.4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>2.1.5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>
2.2	<b>AUMENTO DA RESISTÊNCIA AO CHOQUE TÉRMICO NO CAMARÃO-BRANCO-DO-PACÍFICO ALIMENTADO COM ALGA VERDE E O SEU EFEITO EM CONJUNTO COM PROBIÓTICO</b> .....	<b>49</b>
<b>2.2.1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>2.2.2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
2.2.2.1	<i>Preparo do probiótico</i> .....	52
2.2.2.2	<i>Biomassa seca da macroalga</i> .....	52
2.2.2.3	<i>Animais</i> .....	53
2.2.2.4	<i>Preparo das dietas experimentais</i> .....	53
2.2.2.5	<i>Delineamento experimental</i> .....	54
2.2.2.6	<i>Avaliação dos parâmetros zootécnicos</i> .....	55
2.2.2.7	<i>Análise dos parâmetros imunológicos</i> .....	55
2.2.2.8	<i>Contagem bacteriológica do trato intestinal</i> .....	56
2.2.2.9	<i>Desafio experimental com Vibrio parahaemolyticus</i> .....	56
2.2.2.10	<i>Choque térmico</i> .....	57
2.2.2.11	<i>Análises estatísticas</i> .....	57
<b>2.2.3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
2.2.3.1	<i>Parâmetros de qualidade de água</i> .....	57
2.2.3.2	<i>Avaliação dos parâmetros zootécnicos</i> .....	58
2.2.3.3	<i>Análise dos parâmetros imunológicos</i> .....	58
2.2.3.4	<i>Contagem bacteriológica do trato intestinal</i> .....	59
2.2.3.5	<i>Desafio experimental com Vibrio parahaemolyticus</i> .....	60
2.2.3.6	<i>Choque térmico</i> .....	60
<b>2.2.4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>2.2.5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>65</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A aquicultura desempenha um papel crescente e significativo na produção de alimentos de nutrição animal e humana, na geração de empregos e conseqüentemente no desenvolvimento econômico de muitos países (FAO, 2020). A produção mundial de animais aquáticos em 2018 foi constituída principalmente por peixes com 108,6 milhões de toneladas, seguido de moluscos com 17,7 milhões de toneladas e os crustáceos foram responsáveis por 9,4 milhões de toneladas (FAO, 2020).

Considerada uma das espécies mais cultivadas e importantes para a carcinicultura, o camarão-branco-do-pacífico, *Litopenaeus vannamei*, foi responsável por uma produção global de 4,9 milhões de toneladas em 2018 (FAO, 2020). Essa grande produção pode ser devido ao alto desempenho de crescimento, tolerância a várias condições ambientais, resistência às doenças e o alto valor econômico dessa espécie (TEPAAMORNDECH *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2015). Outro motivo para esse sucesso é que o consumo de camarão está se tornando popular em todo o mundo, pois estes apresentaram um bom perfil nutricional, contendo minerais (cálcio, zinco, iodo), vitaminas (D e B3), proteínas e ácidos graxos com baixo teor de gorduras saturadas que fornecem benefícios à saúde dos consumidores (IMARC, 2021).

Nos últimos anos, a carcinicultura alcançou uma alta produção, seja pela intensificação ou expansão da área de produção, entretanto foi seguida de surtos de doenças causadas por vírus e bactérias patogênicas (JIAO *et al.*, 2021; KLONKLAEW *et al.*, 2020). Entre as infecções microbianas estão as vibrioses, causadas por bactérias Gram-negativas do gênero *Vibrio*. Considerados comensais em animais marinhos e descrito como o gênero dominante na microbiota intestinal dos camarões, onze espécies de *Vibrio* spp. são relatados como patogênicos (KLONKLAEW *et al.*, 2020; TEPAAMORNDECH *et al.*, 2019). Um destes é o *Vibrio parahaemolyticus*, conhecido por ser o agente etiológico da doença da necrose hepatopancreática aguda (AHPND, *acute hepatopancreatic necrosis disease*) que pode levar a mortalidade de até 100% em camarões cultivados em 20-30 dias após a estocagem no tanque (BOYD; PHU, 2018; SANTOS *et al.*, 2020; SCHRYVER; DEFOIRDT; SORGELOOS, 2014). Desde o seu aparecimento na China, em 2009, o AHPND tem se propagado para outros países como Vietnã, Malásia, Tailândia, Filipinas, México e assim tem causado perdas econômicas significativas na carcinicultura em todo o mundo (GOMEZ-GIL *et al.*, 2014; JIAO *et al.*, 2021; NUNAN *et al.*, 2014; PEÑA *et al.*, 2015).

Para enfrentar essas enfermidades os crustáceos contam com um sistema imune inato regulado por reações celulares e humorais (TASSANAKAJON *et al.*, 2013). As células dos

camarões podem reconhecer os microrganismos invasores através das interações entre as proteínas de reconhecimento de padrões do hospedeiro (PRPs, *pattern recognition proteins*) com os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Após este reconhecimento a via de sinalização intracelular é desencadeada e visa neutralizar ou destruir os patógenos através de vários mecanismos como a fagocitose, a formação de nódulos e encapsulação pelas células (XU *et al.*, 2014). Além destas, possuem respostas humorais, como a liberação de peptídeos antimicrobianos (AMPs, *antimicrobial peptides*), síntese de melanina pelo sistema pró-fenoloxidase (proPO), o sistema de coagulação da hemolinfa e entre outros (TASSANAKAJON *et al.*, 2018). Consideradas células imunocompetentes, os hemócitos desempenham um papel importante na homeostase dos camarões ao estresse, por isso a atividade do sistema imunológico induzida por este último fator pode ser avaliada através da contagem total dos hemócitos (THC) (KHANOBDEE *et al.*, 2002; MANFRIN *et al.*, 2016; SAELEE *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2019).

Como exemplo de estresse, destaca-se a variação de temperatura que constitui um dos fatores físicos mais importantes que podem afetar os organismos ectotérmicos aquáticos, como os camarões (REN *et al.*, 2021). Quando ocorrem oscilações de temperatura nos cultivos, como as que ocorrem com as chegadas de frentes frias no sul do Brasil durante o período de inverno, os animais cultivados podem sofrer alterações no seu metabolismo em geral. Dentre estas estão as alterações no sistema imunológico, antioxidante, na osmorregulação, bem como mudanças comportamentais e de crescimento (REN *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2019). Dessa forma, as alterações nos fatores ambientais podem contribuir para a imunossupressão dos animais cultivados e assim aumentar a suscetibilidade destes a enfermidades (REVERTER *et al.*, 2014).

Uma estratégia para controlar as infecções microbianas nos cultivos é o uso de quimioterápicos, como os antibióticos. Entretanto, o uso indiscriminado destes pode induzir uma forte pressão seletiva sobre os patógenos dos animais aquáticos e resultar no aparecimento de cepas multirresistentes (VATSOS; REBOURS, 2015). Além disso, essa resistência aos agentes antimicrobianos também pode ser transferida para os patógenos humanos (MARTINEZ, 2009). Dessa forma, a utilização de antibióticos e outros quimioterápicos com elevada toxicidade na aquicultura não é recomendado, uma vez que eles podem ser acumulados nos tecidos dos animais e assim aumentar os riscos à saúde destes, como dos humanos e causar sérios impactos ao meio ambiente (BURRIDGE *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2021).

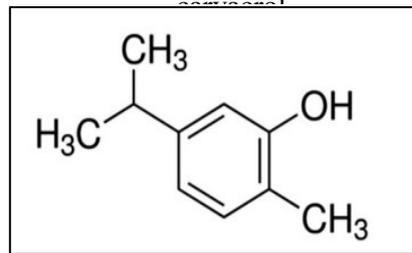
De acordo com o exposto acima, fica evidente a urgência para minimizar o uso de quimioterápicos nos cultivos, aumentar a imunocompetência dos animais para enfrentar as condições climáticas adversas e a necessidade de buscar estratégias para combater os agentes patogênicos com produtos que não sejam baseados nas drogas sintéticas existentes. Além disso, é importante que estas estratégias visem não só o crescimento econômico, mas também as práticas sustentáveis que incluam abordagens ecológicas.

## 1.1 ALTERNATIVAS SUSTENTÁVEIS AO USO DE QUIMIOTERÁPICOS NA CARCINICULTURA

### 1.1.1 Carvacrol

Nos últimos anos, diferentes estudos têm testado a eficácia de fitoterápicos na aquicultura, pois estes contêm compostos orgânicos naturais com propriedades antimicrobianas, nutricionais e imunoestimulantes (CITARASU, 2010). Entre os compostos naturais estão os óleos essenciais, definidos como misturas de compostos voláteis, lípidos, com forte odor e que podem ser sintetizados em todos os órgãos vegetais (BAKKALI *et al.*, 2008). Geralmente são extraídos das plantas através do processo de destilação por arraste de vapor da água e apresentam como componentes principais os hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas, álcoois, fenóis, éteres, ésteres de origem terpênica e fenólica (NIETO, 2017; THOMPSON; CHA; TRUSH, 1989). Dentre os compostos fenólicos está o carvacrol (Figura 1), conhecido como 5-isopropil-2-metilfenol, um monoterpene, abundante nas plantas pertencentes à família Lamiaceae, como orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) (NABAVI *et al.*, 2015; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010). Este composto fenólico tem atraído muita atenção por suas propriedades biológicas, com ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante e anticancerígenas (CHAVAN; TUPE, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2010; NOSTRO *et al.*, 2004; SÁNCHEZ; AZNAR; SÁNCHEZ, 2015; YIN *et al.*, 2012).

Figura 1. Estrutura química do



Fonte: Baruah *et al.*, (2017).

O carvacrol foi aprovado pela FDA, (do inglês, *Food and Drug Administration*, 2017) como um composto seguro do ponto de vista toxicológico para uso como aditivo alimentar e atualmente é usado em baixas concentrações como aromatizante e conservante de alimentos (KACHUR; SUNTRES, 2019). Entretanto, este composto apresenta propriedades físico-químicas não desejáveis para indústria como alta volatilidade, baixa solubilidade em água e estabilidade química, o que dificulta seus potenciais usos (MARINELLI *et al.*, 2019).

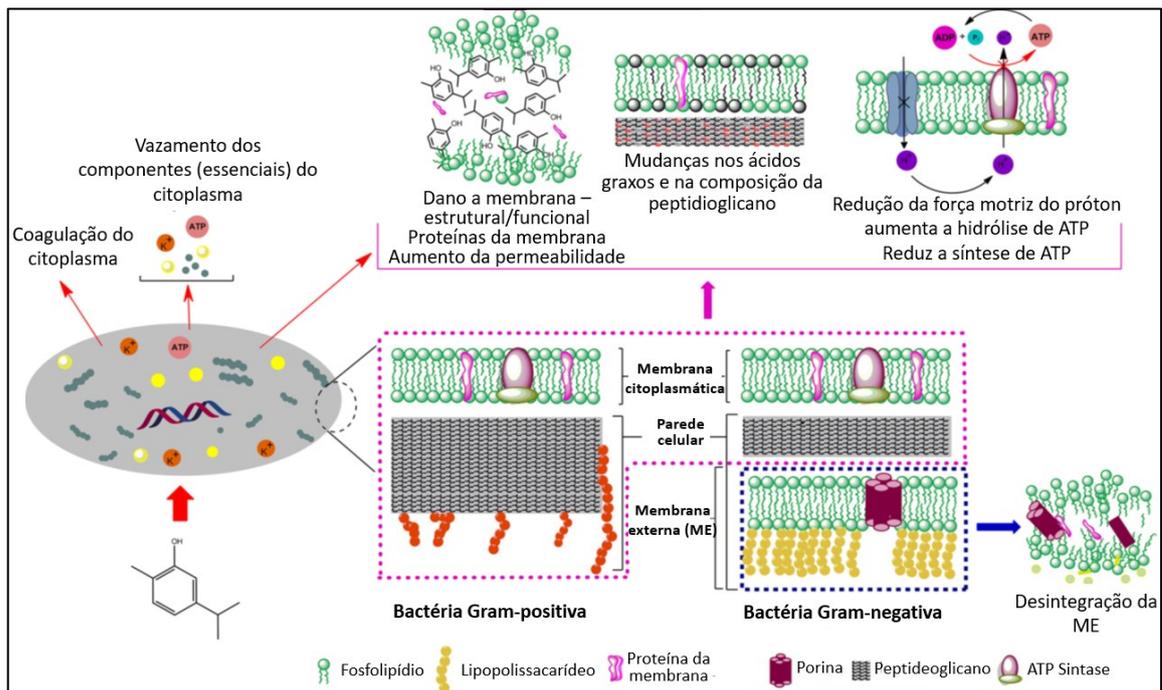
Estudos *in vitro*, têm demonstrado a forte atividade antimicrobiana dos componentes fenólicos, derivados dos óleos essenciais, como o carvacrol, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (COSENTINO *et al.*, 1999; STRATAKOS *et al.*, 2018). Esse fato já foi investigado contra microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Edwardsiella tarda* e algumas vibriônicas que causam impactos na carcinicultura (FANG *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2017; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010; SNOUSSI *et al.*, 2008).

Na piscicultura diversas plantas ou seus subprodutos, estão sendo utilizados como imunostimulantes na alimentação (SKALLI *et al.*, 2013). O uso do óleo de orégano, *Origanum heracleoticum*, como aditivo alimentar para *Ictalurus punctatus* atuou como promotor de crescimento, aumentou a atividade antioxidante e os tornou mais resistentes à infecção por *Aeromonas hydrophila* (ZHENG *et al.*, 2009). Já a utilização do carvacrol em conjunto com timol na alimentação de *Oncorhynchus mykiss* demonstrou maior desempenho de crescimento, melhora na taxa de conversão alimentar e dos índices hematológicos (AHMADIFAR; FALAHATKAR; AKRAMI, 2011). Resultados distintos, foram encontrados com diferentes concentrações de carvacrol adicionados na dieta dos peixes *Dicentrarchus labrax* e *Oreochromis niloticus*, as quais causaram a redução da mortalidade dos animais infectados por *Vibrio anguillarum* e *E. tarda*, respectivamente, entretanto não afetaram o desempenho zootécnico e a resposta imune dos peixes (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010; VOLPATTI *et al.*, 2013).

Em crustáceos, o carvacrol foi testado no camarão *L. vannamei* por meio da adição dietética de óleos essenciais de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) com diferentes níveis de timol e carvacrol. A quantificação bacteriana no músculo e no hepatopâncreas dos animais foi avaliada após a infecção com *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* e *V. parahaemolyticus* e houve inibição significativa do crescimento das vibrionáceas, independente do óleo essencial utilizado (GRACIA-VALENZUELA *et al.*, 2014). Além deste, Baruah *et al.*, (2017) demonstraram que as larvas de artêmias tratadas, por imersão, com carvacrol exibiram uma melhora significativa em sua sobrevivência em comparação ao controle, porém essa sobrevivência diminuiu com o aumento da concentração do composto fenólico. Com base nisso, acredita-se que este composto pode exercer efeito tóxico nos animais dependente das doses utilizadas (BARUAH *et al.*, 2017).

Os efeitos antibacterianos encontrados em algumas plantas, como por exemplo o orégano, são devidos ao seu alto conteúdo de compostos fenólicos (ZHENG *et al.*, 2009). Contudo, os óleos essenciais destas plantas, contém uma variedade de componentes químicos com diversas concentrações. Em conjunto, estes podem apresentar maior eficácia do que os seus compostos puros e isolados, como por exemplo, o carvacrol, pois existe um sinergismo entre todos os componentes presentes no óleo, como já demonstrado na literatura (LEMOS *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2009). Além disso, o efeito antibacteriano pode ser mais efetivo na presença de ácidos orgânicos ou quando o pH do meio é ácido, provavelmente devido à maior hidrofobicidade que resulta em uma melhor fragmentação dos lipídios da membrana (NOSTRO *et al.*, 2012). Esse mecanismo de ação foi evidenciado por Marinelli *et al.* (2018) os quais relataram que a membrana externa e a citoplasmática das bactérias são consideradas os principais locais de ação do carvacrol levando a alterações funcionais e estruturais das membranas, interferência na síntese e função dos ácidos nucleicos, coagulação do citoplasma, vazamento dos seus constituintes, desequilíbrio do metabolismo e inibição do *Quorum sensing* (QS) (KNOBLOCH *et al.*, 1989; SIKKEMA; JAN; POOLMAN, 1995), como demonstrado na Figura 2.

Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação do carvacrol.



Fonte: Adaptado de Marinelli *et al.*, 2018.

Pesquisas que compreendam os efeitos do uso desse composto fenólico em crustáceos, especificamente em camarões marinhos são escassos. Contudo, são de suma importância, uma vez que as doenças são consideradas um dos fatores limitantes para o sucesso do cultivo destes animais e abordagens preventivas com o uso de compostos orgânicos naturais podem ser efetivos quando aplicados em concentrações e períodos adequados.

### 1.1.2 Probiótico *Lactobacillus plantarum*

A implementação de estratégias de biossegurança, a melhora da imunocompetência dos animais e o controle das enfermidades com métodos biológicos são opções conhecidas e eficazes na carcinicultura (NAIEL *et al.*, 2021). Dentre estes, está o uso de probióticos, na qual são descritos como microrganismos vivos que ao serem ministrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; HILL *et al.*, 2014).

Os probióticos podem ser classificados em três categorias incluindo as espécies que pertencem ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que são mais utilizados como aditivos alimentares, e algumas espécies que pertencem ao gênero *Bacillus* (VIEIRA; PEREIRA, 2016; WANG *et al.*, 2020). Geralmente, estas cepas são suplementadas na ração ou inseridas

na água do cultivo e visam atuar como agentes preventivos contra as doenças, bem como reduzir o uso de antibióticos nos cultivos (HUERTA-RÁBAGO *et al.*, 2019). Contudo, quando aplicado por via oral, na alimentação dos animais, os probióticos podem ser mais efetivos, pois essas cepas modulam diretamente a digestão e a absorção dos nutrientes no intestino do hospedeiro e a administração contínua na dieta favorece a sua colonização (CHAI *et al.*, 2016; JAVADI; KHATIBI, 2017; SHA *et al.*, 2016; VAN HAI; BULLER; FOTEDAR, 2009). Uma vez inserido em seu sítio de ação, os probióticos podem impedir o estabelecimento de cepas patogênicas através da competição por locais de adesão, produtos químicos, nutrientes ou energia disponível e conseguem produzir compostos inibidores contra estes microrganismos (KNIPE *et al.*, 2021; RINGØ *et al.*, 2020; VERSCHUERE *et al.*, 2000)

As cepas do gênero *Lactobacillus* são encontrados em diversos habitats, como nas plantas, leite fermentado, associados à mucosa em humanos e nos animais (VRESE; SCHREZENMEIR, 2008; NAIEL *et al.*, 2020). Quando empregados como probióticos, estas estimulam as respostas imunológicas dos camarões, exercem atividade antimicrobiana, enzimática e podem estar associados com o trato intestinal dos animais (FARZANFAR, 2006; KONGNUM; HONGPATTARAKERE, 2012; NGUYEN; NGUYEN, 2017). Além disso, esta associação com o trato intestinal, os tornam bons candidatos para serem utilizados como probióticos, pois podem resistir às condições do trato digestório do hospedeiro e ao ambiente aquático (NGUYEN; LE; TRANG, 2013).

No grupo de Bactérias do Ácido Lático (BAL) estão as bactérias do gênero *Lactobacillus* que além de possuírem propriedades imunomoduladoras, produzem várias substâncias antibacterianas, como o ácido lático, ácido acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas que inibem o crescimento das bactérias patogênicas, como as vibriônicas (MAEDA *et al.*, 2014; MOKOENA, 2017; NAIEL *et al.*, 2021; REIS *et al.*, 2012; RINGØ, 2020). *Lactobacillus plantarum* é um exemplo de BAL, Gram-positiva, anaeróbia facultativa, em forma de bastonete e não formadora de esporos (ZHENG *et al.*, 2018). Este probiótico quando adicionado na alimentação dos peixes, como *Pagrus major*, *Labeo rohita*, *Cyprinus carpio*, *Acipenser baerii* e *O. niloticus* aumentou o desempenho de crescimento, eficiência alimentar, atividade imunológica e a resistência dos animais contra a infecção por *A. hydrophila* (AMIT *et al.*, 2021; BECKER *et al.*, 2021; DAWOOD *et al.*, 2015; GIRI; SUKUMARAN; OVIYA, 2013; HAMDAN; EL-SAYED; MAHMOUD, 2016; POURGHOLAM *et al.*, 2016). Além destes, Amit *et al.* (2021) revelaram que o probiótico melhorou a qualidade da água em que os animais foram cultivados.

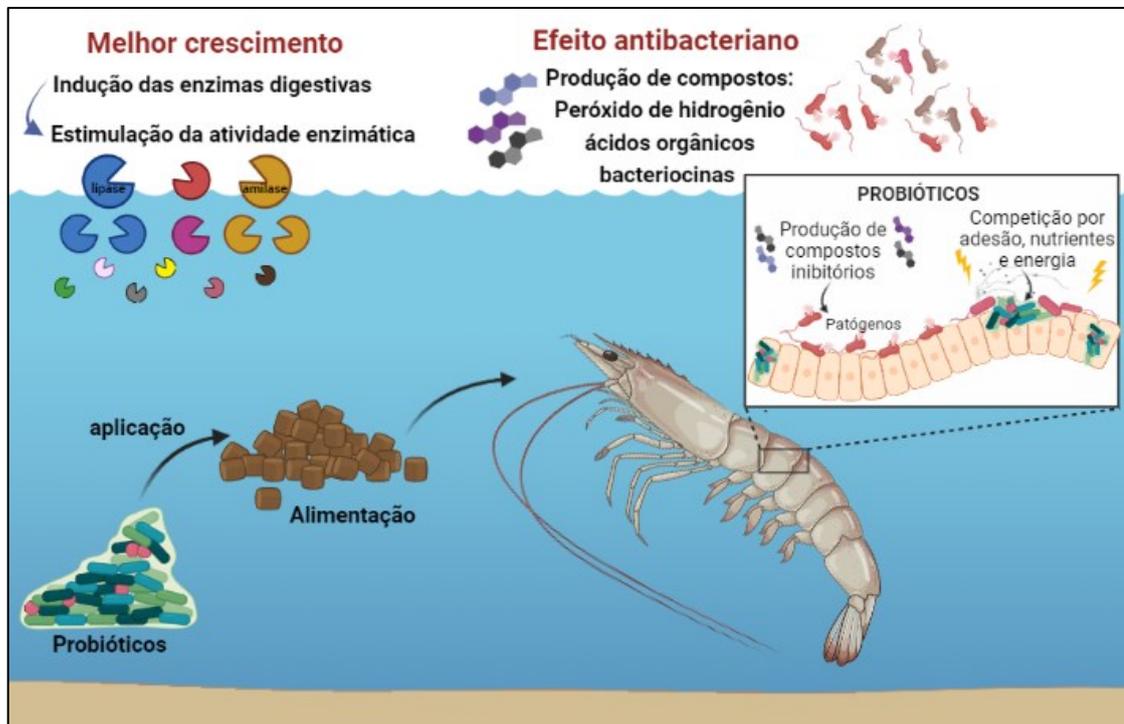
No camarão-branco-do-pacífico, a administração dietética com *L. plantarum* diminuiu a contagem de vibrionáceas no trato intestinal, melhorou o desempenho de crescimento, eficiência alimentar, atividade enzimática e a sobrevivência dos animais desafiados com vibrionáceas (KONGNUM; HONGPATTARAKERE, 2012; LI *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2016). Resultados positivos também foram encontrados por Zheng *et al.* (2018) que ao incluírem o mesmo probiótico na dieta de *L. vannamei* observaram aumento da altura e densidade dos enterócitos dos camarões, o que indica uma melhora na capacidade de absorção dos nutrientes.

Diversos estudos em animais aquáticos demonstraram resultados favoráveis da suplementação de probióticos, entretanto alguns apresentam resultados divergentes. Utilizando *L. plantarum* na ração do camarão-branco-do-pacífico Junior *et al.*, (2016) não observaram diferença nos índices zootécnicos, enquanto Chiu *et al.* (2007) apontaram que os camarões alimentados com o probiótico não apresentaram diferença significativa na resistência ao desafio com *V. alginolyticus* por 48 h. Em peixes, a suplementação dietética da mesma cepa probiótica não alterou o desempenho de crescimento e a eficiência alimentar de *O. niloticus*, *Centropomus parallelus* e no *Salmo salar* não foi observado proteção contra a infecção causada por *Aeromonas salmonicida* (GILDBERG; JOHANSEN; JAR, 1995; RUIZ *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2018). Uma explicação para os resultados conflitantes observados nos estudos é que os efeitos benéficos dos probióticos são influenciados por alguns fatores, como as condições de cultivo, o método de administração, a dosagem, a cepa probiótica e a espécie de peixe ou camarão utilizado (TOLEDO *et al.*, 2019). Além disso, essas bactérias são sensíveis à temperatura durante o processo de peletização da ração, o que exige cautela no momento da sua inclusão (MIRANDA *et al.*, 2014; SOSA *et al.*, 2016).

Embora a literatura sobre o uso dos probióticos na aquicultura seja extensa, o mecanismo de ação exato destes ainda não foi totalmente estabelecido em peneídeos (ZHENG *et al.*, 2018). Sugere-se que as cepas probióticas induzem as enzimas digestivas, como amilase e lipase e em consequência estimulam a capacidade digestiva natural dos animais, o que resulta no melhor desempenho de crescimento (LIU *et al.*, 2009; WANG, 2007). Já o efeito antibacteriano demonstrado por *L. plantarum* pode ser devido à produção de peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e bacteriocinas (KONGNUM; HONGPATTARAKERE, 2012; TODOROV, 2009). Estes foram descritos como os responsáveis pela dissipação da força próton motriz e interrompem o potencial de transmembrana e/ou gradiente de pH nas células sensíveis (TODOROV, 2009). Além disso, como já mencionado, os probióticos podem

competir com as cepas patogênicas por locais de adesão, produtos químicos, nutrientes ou energia disponível, Figura 3.

Figura 3. Mecanismos de ação dos probióticos em *Litopenaeus vannamei*.



Fonte: autora.

*L. plantarum* é uma espécie comercialmente importante que tem sido usada há séculos como probióticos para humanos e animais e tem alto potencial para ser aplicado nos cultivos (NGUYEN *et al.*, 2018). Muitas vezes essas cepas demonstram efeitos benéficos à saúde do hospedeiro e diferente dos antibióticos, não deixam resíduos nos animais e no meio ambiente. Contudo, seu uso deve ser rigorosamente monitorado, visto que genes resistentes a antibióticos já foram identificados em suplementos probióticos, incluindo aqueles frequentemente aplicados na aquicultura (HOLT *et al.*, 2020; UDDIN; LARSEN; CHRISTENSEN, 2015; WONG *et al.*, 2015). Uma vez controlado, a utilização de cepas probióticas no cultivo de camarões marinhos aliado as boas práticas de higiene e manejo se tornam importantes para mitigar as doenças infecciosas que acometem a carcinicultura mundial (NGUYEN *et al.*, 2018).

### 1.1.3 Macroalgas

Na aquicultura a utilização de produtos naturais de origem marinha tem recebido muita atenção nos últimos anos como medida profilática na redução das enfermidades e do uso de quimioterápicos (ROMERO; GLORIA; NAVARRETE, 2012). Dentre esses, estão as macroalgas que são organismos aquáticos, multicelulares, fotossintéticos que constituem uma parte importante da cadeia alimentar marinha, bem como da dieta humana (VATSOS; REBOURS, 2015). Elas possuem quantidades significativas não apenas de vitaminas, minerais, fibras alimentares, proteínas e polissacarídeos, mas também vários polifenóis, pigmentos e lipídeos (MAGDUGO *et al.*, 2020). Com isso, podem ser utilizadas na carcinicultura e além do valor nutricional, elas apresentam propriedades imunomoduladoras, promotoras de crescimento, antivirais e são fontes promissoras de compostos antimicrobianos (GUPTA; ABU-GHANNAM, 2011; SCHLEDER *et al.*, 2020). Ademais, sabe-se que as quedas bruscas de temperatura nos cultivos são prejudiciais aos camarões e pesquisas apontam que a adição de algas marinhas na alimentação destes crustáceos podem melhorar a sua resistência térmica (REZENDE *et al.*, 2021; SCHLEDER *et al.*, 2017). Outro fator relevante, é que as algas carecem de efeitos tóxicos para o metabolismo celular, possuem métodos de cultivo simples, crescem rápido e o custo da produção é consideravelmente baixo (VATSOS; REBOURS, 2015).

As macroalgas são classificadas em três grupos principais baseados na sua pigmentação, tipo de material de armazenamento e a composição dos seus polissacarídeos da parede celular, sendo: algas pardas (Phaeophyceae), algas vermelhas (Rhodophyceae) e algas verdes (Chlorophyceae) (BALBOA *et al.*, 2013; KATARZYNA; SE-KWON, 2015; XU; HUANG; CHEONG, 2017).

Na classe Chlorophyceae, na qual é composta pelas algas verdes, está o gênero *Ulva*. Dentro deste gênero, atualmente são descritos no banco de dados 409 espécies amplamente distribuídas em todos os continentes (GUIRY; GUIRY, 2021; MANTRI *et al.*, 2020). Devido a sua boa composição nutricional e com a presença de compostos bioativos e polissacarídeos este gênero têm mostrado potencial na melhora do sistema imunológico de organismos aquáticos (MANTRI *et al.*, 2020; TZIVELEKA; IOANNOU; ROUSSIS, 2019). Nos peixes, *D. labrax* e *O. niloticus* a inclusão de *Ulva lactuca* e *Ulva rigida* na dieta melhorou o desempenho de crescimento, eficiência alimentar, atividade antioxidante e a resposta imunológica inata dos animais (ERGUN *et al.*, 2009; PEIXOTO *et al.*, 2016; SÁEZ *et al.*, 2020; VALENTE *et al.*, 2016; VIZCAÍNO *et al.*, 2020; WASSEF; EL-SAYED; SAKR,

2013). No peixe marinho, *Seriola dorsalis* a suplementação alimentar com *Ulva fasciata* aumentou significativamente a porcentagem do hematócrito e do teor de ácido docosahexaenóico (DHA) no músculo (LEGARDA *et al.*, 2021). Além destes, a incorporação de *Ulva ohnoi* na alimentação de *Solea senegalensis* modulou a resposta imune dos peixes durante a infecção por *Photobacterium damsela*, mas as taxas de mortalidade não foram afetadas (FUMANAL *et al.*, 2020).

Em camarões, o extrato da *U. fasciata* adicionado na dieta de *Pennaeus monodon* atuou como agente profilático no controle das vibrionáceas (VATSOS; REBOURS, 2015). Já o extrato das espécies de *Ulva intestinalis*, *Ulva clathrata*, *U. rigida* e *U. lactuca* na dieta de *L. vannamei* melhoraram o desempenho de crescimento e os parâmetros imunológicos (AKBARY; AMINIKHOEI, 2018; ELIZONDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2018; KLONKLAEW *et al.*, 2021; PRATIWI; PRATIWI, 2021).

Apesar dos excelentes efeitos de *Ulva* spp. como aditivo alimentar é possível observar uma discrepância nos resultados listados na literatura. Como exemplo, em *C. carpio*, *D. labrax*, *S. senegalensis* e *O. mykiss* a utilização de espécies de *Ulva*, como *U. rigida*, *U. ohnoi* e *U. lactuca* na alimentação demonstrou menor desempenho de crescimento e redução na atividade de proteases (DILER *et al.*, 2007; TAPIA-PANIAGUA *et al.*, 2019; VALENTE *et al.*, 2006; VIZCAÍNO *et al.*, 2019; YILDIRIM *et al.*, 2009). Outro estudo demonstrou que além do déficit de crescimento em *S. senegalensis* a inclusão dietética com *U. ohnoi* aumentou significativamente a abundância de vibrionáceas no trato intestinal dos animais (TAPIA-PANIAGUA *et al.*, 2019). Em *L. vannamei* foi observado um menor crescimento nos animais alimentados com diferentes níveis de *U. lactuca* e *Ulva* sp., além de reduzir a sobrevivência e os níveis de lipídios no corpo dos camarões (CÁRDENAS *et al.*, 2015; QIU *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2014). Os resultados contraditórios encontrados na literatura podem ser atribuídos a variação da espécie consumidora e a sua fisiologia, a macroalga utilizada, o método e o seu local de cultivo, a estação do ano em que as algas foram colhidas e o nível de inclusão testado (ARAÚJO *et al.*, 2016; CRUZ-SUÁREZ *et al.*, 2009; VATSOS; REBOURS, 2015; VIZCAÍNO *et al.*, 2019). Além destes fatores, os diferentes métodos de secagem podem afetar a qualidade da alga e o seu uso como fonte de ingredientes funcionais e nutracêuticos (URIBE *et al.*, 2019).

Qiu *et al.* (2017) concluem em seu estudo que a suplementação de *Ulva* sp. na dieta dos camarões não indica totalmente um efeito benéfico e este problema pode estar relacionado com a qualidade da proteína na dieta ou com a presença de fatores antinutricionais (FANs). Porém, Mantri *et al.* (2020) citam que estas algas possuem notável teor de proteínas, 4 a 29%

do peso seco, e isso as tornam fontes proteicas promissoras para serem usadas nas dietas. Já os fatores antinutricionais, são definidos como substâncias que podem exercer efeitos negativos na alimentação e interferir no crescimento, reprodução e saúde dos animais cultivados (PRABU *et al.*, 2017; TAPIA-PANIAGUA *et al.*, 2019). Eles têm sido relacionados principalmente a alimentos derivados de plantas e compreendem uma variedade de compostos, como inibidores de proteases, fitohemaglutinina, lectinas, ácido fítico, saponinas, fitoestrogênios ou antivitaminas (HAJRA *et al.*, 2013; PRABU *et al.*, 2017). Dessa forma, a presença desses compostos nas dietas é responsável pelos efeitos deletérios na absorção de nutrientes e micronutrientes que podem interferir no funcionamento de alguns órgãos (THAKUR; SHARMA; THAKUR, 2019). De acordo com Vizcaíno *et al.* (2020) o tratamento térmico pode inativar os FANs das macroalgas, como *U. ohnoi* e consequentemente melhorar o seu valor nutricional. Contudo essa inativação depende de fatores como temperatura, tempo, tamanho do pellet e condições de umidade das dietas (THAKUR; SHARMA; THAKUR, 2019).

A ampla distribuição das macroalgas em conjunto com a sua composição química e nutricional fez do gênero *Ulva* um modelo favorável para vários estudos, incluindo os morfogênicos, de biorrefinaria e biorremediação, genômicos e alimentícios (MANTRI *et al.*, 2020). Portanto, contribuições neste sentido são importantes para elucidar com mais clareza os efeitos da utilização das macroalgas do gênero *Ulva*, principalmente *U. ohnoi* (Figura 4), na dieta dos camarões peneídeos, o que é inexistente na literatura.

Figura 4. Estrutura vegetativa de *Ulva*



Fonte: Jamilly Rocha, LCM.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso do carvacrol e da macroalga *Ulva ohnoi* isoladamente e em conjunto com o probiótico *Lactobacillus plantarum* como aditivos alimentares na fase de engorda do camarão-branco-do-pacífico.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar o efeito *in vitro* do carvacrol contra diferentes microrganismos de importância na carcinicultura;
- b) Avaliar o uso de diferentes concentrações de carvacrol na dieta de *Litopenaeus vannamei* e seu efeito no desempenho zootécnico, imunológico e microbiológico;
- c) Verificar a resistência dos camarões alimentados com diferentes concentrações de carvacrol e desafiados com *Vibrio parahaemolyticus*;
- d) Avaliar o desempenho zootécnico, imunológico e microbiológico de *L. vannamei* suplementados com macroalga *U. ohnoi* isoladamente e em conjunto com o probiótico *L. plantarum*;
- e) Verificar a resistência ao estresse térmico agudo (choque térmico) e a sobrevivência ao desafio com *Vibrio parahaemolyticus* em camarões suplementados com *U. ohnoi* isoladamente e em conjunto com *L. plantarum*.

### 1.3 FORMATAÇÃO DO TRABALHO

A presente tese está dividida em dois capítulos referentes aos artigos científicos: O primeiro artigo científico original está publicado no Boletim do Instituto de Pesca e o segundo será submetido ao mesmo periódico. Ambos os artigos estão apresentados nas normas da ABNT.

## 2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

### 2.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO CARVACROL CONTRA PATÓGENOS DE CAMARÕES E SEU USO COMO ADITIVO ALIMENTAR NA DIETA DO CAMARÃO-BRANCO-DO-PACÍFICO

DOI: 10.20950/1678-2305/bip.2021.47.e645

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* do carvacrol contra diferentes microrganismos de importância na carcinicultura e o seu efeito *in vivo* no desempenho zootécnico, imunológico, microbiológico e na resistência de *Litopenaeus vannamei* desafiados com *Vibrio parahaemolyticus*. A atividade antimicrobiana do carvacrol foi realizada *in vitro* pela análise da concentração inibitória mínima (CIM) e por difusão em ágar, com bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Para o experimento *in vivo* foram adicionadas diferentes concentrações do carvacrol (1, 3, 4 e 6 mg mL<sup>-1</sup>) na alimentação dos camarões e uma dieta controle. Após quatro semanas, foram avaliados parâmetros zootécnicos, imunológicos, microbiológicos e a resistência dos animais desafiados com *V. parahaemolyticus*. A CIM do carvacrol para *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio harveyi* foi de 0,078 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto nas demais bactérias foi de 0,156 mg mL<sup>-1</sup> de carvacrol. Os maiores halos de inibição foram observados em *V. parahaemolyticus* e *Vibrio harveyi* e demonstraram diferenças significativas em relação aos demais microrganismos, exceto *Escherichia coli*. Os resultados *in vivo* não demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos. Em conclusão, a atividade antimicrobiana do carvacrol foi confirmada contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e sugere-se que seu potencial antimicrobiano seja mais eficaz contra *Vibrio* spp. No entanto, as concentrações de carvacrol utilizadas *in vivo* não afetaram os parâmetros avaliados.

**Palavras-chave:** aquicultura; *Litopenaeus vannamei*; óleo essencial; aditivo alimentar; *Vibrio*.

#### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the *in vitro* effect of the phenolic compound carvacrol on different microorganisms of importance in shrimp farming, and its *in vivo* effect on zootechnical, immunological and microbiological performance, and resistance, of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. In particular, the antimicrobial activity of carvacrol was evaluated *in vitro* by analysis of the minimum inhibitory concentration (MIC) and by agar diffusion with Gram-negative and Gram-positive bacteria. The *in vivo* experiment was conducted using different concentrations of carvacrol (1, 3, 4 and 6 mg mL<sup>-1</sup>) added to shrimp feed, together with a control diet without carvacrol. After four weeks, zootechnical, immunological and microbiological parameters and resistance, of animals challenged with *V. parahaemolyticus* were evaluated. The MIC of carvacrol was 0.078 mg mL<sup>-1</sup> for *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio harveyi*, while for the other bacteria, it was 0.156 mg mL<sup>-1</sup> of carvacrol. The greatest halos of inhibition were observed in *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* with significant differences demonstrated for the other microorganisms, except *Escherichia coli*. The *in vivo* results showed no significant differences among treatments. In conclusion, the antimicrobial activity of carvacrol was confirmed with Gram-negative and

Gram-positive bacteria, and it is suggested that its antimicrobial potential is more effective against *Vibrio* spp. However, the concentrations of carvacrol used *in vivo* did not affect the parameters evaluated.

**Keywords:** aquaculture, *Litopenaeus vannamei*, essential oil, food additive, *Vibrio*.

### 2.1.1 INTRODUÇÃO

O camarão-branco-do-pacífico, *Litopenaeus vannamei*, é a espécie mais rentável e comercialmente importante na carcinicultura, com uma produção global de aproximadamente 5 milhões de toneladas em 2018 (ABCC, 2017; FAO, 2020). Entretanto, com a intensificação da produção, estes animais são afetados por doenças infecciosas virais e bacterianas que causam sérias perdas econômicas pela diminuição na produção (CHAKRABORTY; HANCZ, 2011). Dentre estas doenças, estão as causadas por bactérias Gram-negativas do gênero *Vibrio*. Estes microrganismos fazem parte da microbiota natural dos camarões peneídeos e em condições estressantes podem causar infecções. Como exemplo, destacam-se as infecções causadas por *Vibrio parahaemolyticus*, responsável pela doença da necrose hepatopancreática aguda (AHPND, *acute hepatopancreatic necrosis disease*), que afeta severamente o desenvolvimento de camarões aquícolas em todo o mundo (SANTOS *et al.*, 2020).

Para evitar enfermidades na aquicultura muitos produtores utilizam quimioterápicos, como os antibióticos. No entanto, o uso prolongado destes pode se acumular nos animais aquáticos e formar uma microbiota resistente aos antibióticos (ALDERMAN; HASTINGS, 1998). Além disso, os resíduos químicos podem afetar o meio ambiente e a saúde humana, por meio do desenvolvimento de bactérias resistentes a medicamentos (CHAKRABORTY; HANCZ, 2011).

Em busca de alternativas ao uso dos antibióticos, estudos têm testado a eficácia de vários fitoterápicos para a aquicultura, pois estes contêm compostos orgânicos naturais que não causam ameaças ao meio ambiente, à saúde dos animais ou à saúde humana (TALPUR; IKHWANUDDIN; AMBOK BOLONG, 2013). Dentre estes fitoterápicos está o carvacrol, um monoterpene fenólico abundante nas plantas pertencentes à família Lamiaceae, como orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010). Este composto fenólico tem atraído muita atenção por suas propriedades biológicas, com ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, entre outros (CHAVAN; TUPE, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2010; NOSTRO *et al.*, 2004; SÁNCHEZ; AZNAR; SÁNCHEZ, 2015). Além disso, o carvacrol foi aprovado pela FDA

(*Food and Drug Administration*, 2017) como um composto sem efeitos tóxicos para os humanos.

Estudos *in vitro*, vêm demonstrando a forte atividade antimicrobiana do carvacrol e esse fato já foi investigado contra microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Edwardsiella tarda*, entre outros (CARVALHO *et al.*, 2018; COSENTINO *et al.*, 1999; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010; STRATAKOS *et al.*, 2018). Já nos estudos *in vivo* em peixes, o uso do carvacrol demonstrou melhorar o desempenho zootécnico, índices hematológicos e reduzir a mortalidade causada pelo *Vibrio anguillarum* e *E. tarda* (AHMADIFAR; FALAHATKAR; AKRAMI, 2011; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010; VOLPATTI *et al.*, 2013).

Em crustáceos, o carvacrol já foi testado com o camarão *L. vannamei* alimentado com dietas contendo óleos essenciais de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) com diferentes níveis de timol e carvacrol e infectados com *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae*. A concentração bacteriana no músculo e no hepatopâncreas dos animais foram avaliados e houve inibição significativa do crescimento das vibrionáceas, independente do óleo essencial utilizado (GRACIA-VALENZUELA *et al.*, 2014). Além deste, Baruah *et al.* (2017) demonstraram que as larvas de artêmias tratadas, por imersão, com carvacrol mostraram aumento significativo em sua sobrevivência em comparação ao controle.

Os óleos essenciais, como o de orégano e de tomilho, são compostos por terpenos e diversos trabalhos relatam que estes são os responsáveis pelas ações antimicrobianas desses óleos (SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010). Sendo assim, é de grande relevância o estudo destes compostos isolados frente à microrganismos, pois estes podem minimizar as perdas causadas pelas enfermidades nos cultivos e representam uma alternativa ao uso dos antibióticos. Além disso, os compostos oriundos de plantas são ambientalmente amigáveis, sustentáveis e seguros. Neste contexto, a utilização do carvacrol revela ser uma alternativa promissora para melhorar a imunocompetência dos animais contra os agentes patogênicos, como as vibrionáceas. Sabendo disso, e com a escassez de trabalhos na literatura que demonstram o uso do carvacrol em camarões marinhos, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito *in vitro* do carvacrol contra diferentes microrganismos de importância na carcinicultura e o seu efeito *in vivo* no desempenho zootécnico, imunológico, microbiológico e na resistência de *L. vannamei* desafiados com *V. parahaemolyticus*.

## 2.1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM). A fabricação das dietas foi realizada no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI) e o desafio experimental com *V. parahaemolyticus* foi realizado no Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAQ). Todos os laboratórios pertencem à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Florianópolis (SC).

### 2.1.2.1 Carvacrol

O fitoterápico carvacrol, na concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>, foi disponibilizado em nanoemulsão pelo Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da UFSC. O composto foi preparado por emulsificação com Tween<sup>®</sup> 80 (1:1), acondicionado em frasco âmbar e armazenado a temperatura ambiente.

### 2.1.2.2 Cepas bacterianas

As cepas de vibrionáceas utilizadas nos testes *in vitro* foram: *V. harveyi* ATCC 14126, *V. alginolyticus* BCCM 2068 e *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. Além destes, foram utilizados *Escherichia coli* ATCC 25102 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, que serviram como microrganismos padrão Gram-negativo e Gram-positivo, respectivamente. Também foi utilizado a cepa probiótica *L. plantarum* (CPQBA 007 07 DRM01), com intuito de avaliar se o mesmo pode ser utilizado em conjunto com carvacrol para experimentos futuros. Para o teste *in vivo* foi escolhido o *V. parahaemolyticus* devido ao impacto deste microrganismo na carcinicultura.

### 2.1.2.3 Preparo das suspensões bacterianas utilizadas *in vitro*

Inicialmente as bactérias foram semeadas em meio de cultura, tipo caldo. Para *L. plantarum* o meio utilizado foi MRS (do inglês, *Man Rogosa Sharpe Agar*) acrescido com 3% de NaCl e incubados a 35°C por 24 h. Para as vibrionáceas o meio usado foi BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*) com 3% de NaCl e para as demais bactérias foi utilizado BHI 0% e todos incubados a 30°C por 24 h.

Para a metodologia da concentração inibitória mínima (CIM), item 2.2.4.1, as suspensões bacterianas foram centrifugadas (15 min a 1.800 *xg*) e diluídas em solução salina (0 e 3%, conforme a cepa bacteriana) até obtenção da concentração 0,5 na escala de McFarland, o que corresponde a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Já para a metodologia de inibição por difusão em ágar, item 2.2.4.2, as suspensões bacterianas foram diluídas em solução salina e utilizadas na concentração  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Todos os testes *in vitro* foram realizados de acordo com o NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2006) com algumas modificações.

#### 2.1.2.4 Efeitos *in vitro* do carvacrol contra diferentes microrganismos

##### 2.1.2.4.1 Análise da concentração inibitória mínima (CIM)

O efeito inibitório *in vitro* do carvacrol foi avaliado contra os microrganismos descritos no item 2.2.2. Para isso, foi realizada a metodologia da concentração inibitória mínima (CIM), utilizando microplacas de 96 poços, fundo em “U”. Nestas, foram adicionados 100 µL de meio de cultura em todos os poços, sendo: 1) PWS (do inglês, *Salt peptone water* - 1% de peptona, 3% de NaCl, pH 7.4) utilizado para vibrios; 2) PB (do inglês, *Poor Broth* - 1% de peptona, 0,5% de NaCl, pH 7.4) para *E. coli* e *S. aureus* e 3) MRS acrescido com 3% de NaCl para *L. plantarum*. Em seguida, foi adicionado 100 µL de carvacrol (concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>) no primeiro poço e realizado diluição seriada (5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039; 0,019; 0,0098; 0,0049; 0,0024 mg mL<sup>-1</sup> de carvacrol) até o 12º poço. Posteriormente, foram adicionados em todos os poços 20 µL da respectiva bactéria na concentração de 0,5 na escala de McFarland. Para os controles foram utilizados somente os meios de cultura, adicionando-se ou não a bactéria (controle positivo e negativo, respectivamente). As microplacas foram incubadas a 30°C ou 35°C (*L. plantarum*) por 24 h e o crescimento bacteriano foi analisado pelo método colorimétrico. Para este, foram adicionados 30 µL da solução de Resazurina sódica (0,01%, Sigma - Aldrich, MO – USA) e a leitura dos resultados foi realizada após 1 hora, considerando a concentração imediata ao aparecimento da cor (ARAUJO; LONGO, 2016). Os testes para cada bactéria foram realizados em triplicata.

#### 2.1.2.4.2 Análise por difusão em ágar

A inibição do carvacrol por difusão em ágar foi avaliada contra os microrganismos descritos no item 2.2.2. Após as suspensões bacterianas serem diluídas (conforme a metodologia descrita no item 2.2.3), estas foram semeadas em placas contendo meio de cultura em ágar, sendo MRS acrescido com 3% de NaCl para *L. plantarum* e para as demais bactérias TSA (do inglês, *Agar Tryptic Soy*). Em seguida foi realizado três poços de 0,8 milímetros (mm) de diâmetro no qual foi adicionado 50 µL de carvacrol, sendo que cada amostra foi realizada em triplicata. As placas foram incubadas por 24 h e os diâmetros dos halos de inibição ao redor de cada poço foram mensurados em mm.

#### 2.1.2.5 Material biológico

A pesquisa foi desenvolvida com camarões marinhos *L. vannamei* adquiridos da empresa Aquatec Aquicultura Ltda. (Rio Grande do Norte, Brasil). Os animais foram cultivados no LCM em sistema de bioflocos até atingirem o peso ideal para o início dos testes experimentais.

#### 2.1.2.6 Preparo das dietas experimentais

As dietas foram formuladas com o auxílio do software Optimal Fórmula 2000® versão 19102009, baseado nas recomendações e exigências nutricionais para *L. vannamei* (GONG *et al.*, 2000; NRC, 2011; ZHOU *et al.*, 2012). Os ingredientes secos foram previamente triturados e peneirados a 600 µm. Posteriormente, os microingredientes foram homogeneizados e em seguida adicionados aos macroingredientes. Sucessivamente foram acrescentados os óleos, a lecitina de soja e água (200 mL kg<sup>-1</sup> da dieta). A mistura resultante foi peletizada em uma microextrusora (Inbramaq MX-40), seca em estufa a 40°C e posteriormente a ração finalizada foi refrigerada a 4°C até a sua utilização. Para o experimento *in vivo* (item 2.2.7) foi testada uma dieta controle (sem carvacrol) e as outras dietas, contendo os mesmos ingredientes, foram acrescidas com diferentes concentrações de carvacrol, sendo 1, 3, 4 e 6 mg mL<sup>-1</sup>. Por ser um composto altamente volátil, o volume correspondente de cada concentração de carvacrol foi pipetado diretamente na ração 20 min antes das alimentações e acrescido com água, para todas as dietas ficarem com o mesmo volume de líquido. As concentrações utilizadas foram definidas de acordo com os resultados

obtidos nas análises *in vitro* do presente estudo. A composição centesimal da ração foi analisada de acordo com o descrito por AOAC (2005) pela empresa de análises laboratoriais CBO Ltda. (Valinhos, São Paulo, Brasil) e os ingredientes utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Formulação e composição centesimal da ração utilizada.

<b>Ingredientes</b>	<b>(g kg<sup>-1</sup>)</b>
Farelo de soja	324,63
Farinha de trigo	150,00
Resíduo de peixe	150,00
Farinha de vísceras	125,67
Carboximetilcelulose	5,00
Lecitina de soja	25,00
Fosfato monocálcico	25,00
Óleo de soja	10,00
Vitamina C	0,70
Premix vitamínico <sup>1</sup>	5,00
Premix mineral <sup>2</sup>	17,00
Sulfato de magnésio	15,00
Caulim	100,00
Cloreto de sódio	12,00
Cloreto de potássio	10,00
Metionina	5,00
Óleo de peixe	20,00
Carvacrol <sup>3</sup>	
Umidade	9,04
Proteína bruta	39,60
Extrato etéreo	8,71
Fibra bruta	1,87
Cinzas	17,65

<sup>1</sup>Premix vitamínico: vit. A - 900 mg kg<sup>-1</sup>; vit. D3 - 25 mg kg<sup>-1</sup>; vit. E - 46.900 mg kg<sup>-1</sup>; vit. K3 - 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>;

<sup>2</sup>Premix mineral: 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>3</sup>Carvacrol: O carvacrol foi pipetado diretamente na ração a cada alimentação obedecendo as concentrações definidas para os tratamentos (1, 3, 4 e 6 mg mL<sup>-1</sup>).

#### 2.1.2.7 Delineamento experimental

Após o período de aclimação de quinze dias o experimento iniciou e durou quatro semanas. Este experimento consistiu na avaliação do efeito *in vivo* do carvacrol no camarão *L. vannamei* mantidos em água clara. O delineamento foi inteiramente ao acaso, com cinco tratamentos referentes às dietas avaliadas (item 2.2.6) com três repetições cada, totalizando quinze tanques. As unidades experimentais consistiam de tanques de polietileno contendo 400 L de água que era renovada em dias alternados até a retirada de restos de alimentos, fezes e mudas.

As unidades experimentais continham aeração constante e aquecedores com termostato mantendo a temperatura em  $29 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Estas unidades foram povoadas com vinte e cinco camarões com peso médio inicial de  $4,96 \pm 0,14$  g. As alimentações ocorreram quatro vezes ao dia e foram ajustadas de acordo com biometrias quinzenais e a sobrevivência, seguindo uma conversão programada estimada (RAY *et al.*, 2010). Além disso, ao longo do experimento, foram monitorados os parâmetros de qualidade de água, como oxigênio dissolvido e temperatura uma vez ao dia (YSI 55, YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, EUA). Uma vez por semana foram realizadas análises de pH (pHmetro Tecnal®), salinidade (Eco-Sense YSI EC30), alcalinidade (APHA, 2005), nitrito e amônia total realizado de acordo com Strickland e Parsons (1972).

#### 2.1.2.8 Análise dos parâmetros imunológicos

Após o término do experimento a hemolinfa foi coletada do *sinus* ventral de dez camarões por tanque (três *pools* por tratamento). Para isso foram utilizadas seringas estéreis de 1 mL resfriadas a  $4^{\circ}\text{C}$ . A partir da hemolinfa coletada, 50  $\mu\text{L}$  foram fixados em solução anticoagulante Alsever modificado (MAS, do inglês *Modified Alsever Solution* - citrato de sódio 27 mM, EDTA 9 mM, glicose 115 mM, NaCl 336 mM, pH 7.2) com 4% de formaldeído para contagem total de hemócitos (THC). O restante foi coagulado a  $4^{\circ}\text{C}$ , macerado e centrifugado a 6.000  $\times g$  por 10 min para obtenção do soro, no qual foi aliquotado e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O número de hemócitos por mililitro de hemolinfa foi estimado por contagem direta em câmara de Neubauer. A concentração total da proteína do soro foi realizada em microplacas de 96 poços (fundo chato) e estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro-albumina bovina como padrão. Este e os próximos ensaios foram realizados em triplicatas. A atividade da enzima fenoloxidase (PO) foi determinada por espectrofotometria (490 nm) pela formação do pigmento DOPA-cromo, após a oxidação do substrato L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). As amostras do soro foram diluídas (1:15) em TBS-1 (Tris 50 mM, NaCl 330 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, pH 7,6). Desta solução, 50  $\mu\text{L}$  foram incubados em um volume igual de tripsina (Sigma, 1 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) indutor enzimático, em microplacas de 96 poços (fundo chato) por 5 min a temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de L-DOPA (Sigma, 3 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) em todos os poços e a formação do DOPA-cromo foi monitorada após 5, 10 e 15 min. Nos controles, a tripsina foi substituída por TBS. A atividade da PO foi expressa em unidades de atividade da enzima (U) através da variação de 0,001 na absorbância/minuto/miligramma de proteína (SÖDERHÄLL;

HÄLL, 1984). Para a análise da capacidade aglutinante do soro, inicialmente foram depositados 50 µL da solução TBS-2 (Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) em todos os poços da microplaca de fundo em “U”. Em seguida, foi adicionado no primeiro poço o soro diluído (1:15) em TBS-2 e realizado as diluições seriadas até o 12º poço. Ao final, 50 µL da solução de eritrócitos caninos a 2% foram adicionados em cada poço, misturados e incubados por 2 h em câmara úmida e a temperatura ambiente. Nos poços controle, o soro dos camarões foi substituído por TBS-2. O título aglutinante foi definido como o recíproco da última diluição capaz de aglutinar os eritrócitos (MAGGIONI *et al.*, 2004).

#### 2.1.2.9 *Análise da microbiota do trato intestinal*

Para esta análise foram amostrados intestinos de dez camarões de cada tanque (três *pools* por tratamento), totalizando trinta camarões por tratamento. Os tratos intestinais foram assepticamente extraídos, homogeneizados em um gral e diluídos serialmente (1/10) em solução salina estéril 3%. Após, foram semeados em meio de cultura TSA (do inglês, *Agar Tryptic Soy*) e TCBS (do inglês, *Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar*), para contagem de bactérias heterotróficas totais e *Vibrio* spp. respectivamente. Os intestinos semeados nas placas foram incubados em estufa a 30°C, por 24 h e posteriormente foi realizada as contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC).

#### 2.1.2.10 *Desafio experimental com Vibrio parahaemolyticus*

Ao final do cultivo, cento e cinquenta animais foram transferidos para o NEPAQ e distribuídos em quinze unidades experimentais de 100 L (dez animais por unidade), totalizando trinta animais por tratamento. Pela parte dorsal do primeiro segmento abdominal os camarões foram injetados com 100 µL de solução de *V. parahaemolyticus* em uma concentração de  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> segundo teste DL<sub>50</sub> realizado previamente. Os animais foram monitorados por 48 h e após esse período foi avaliada a mortalidade.

#### 2.1.2.11 *Avaliação dos parâmetros zootécnicos*

Ao término do experimento foi realizado a biometria final de todos os camarões cultivados em cada unidade experimental para obtenção dos parâmetros zootécnicos, conforme indicado abaixo:

- Ganho de Peso Semanal (g/s) = {[peso médio final (g) – peso médio inicial (g)] / dias de cultivo} \* 7;
- Peso final (g) dos animais ao final do experimento;
- Conversão Alimentar (CA) = ração consumida (kg)/biomassa de camarão produzida (kg);
- Sobrevivência (%) = (número final de camarões / número inicial de camarões) \* 100.

#### 2.1.2.12 Análises estatísticas

Os dados de contagem de bactérias do trato intestinal foram transformados para  $\log^{10}(x + 1)$ , e os de título aglutinante foram transformados em  $\log^2(x + 1)$  antes de serem submetidos a análise estatística. A homocedasticidade e normalidade de todos os dados foram avaliadas através dos testes de Bartlett e Shapiro-Wilk, respectivamente. Quando considerados paramétricos, estes dados foram submetidos à análise de variância unifatorial (ANOVA - *one way*) seguido pelo teste de Tukey, e quando considerados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa Statistica 13.5 (TIBCO Software Inc.), utilizando o nível de significância de 5%. Os dados de mortalidade após o desafio foram analisados por Kaplan-Meier no software GraphPad Prism 5.0.

### 2.1.3 RESULTADOS

#### 2.1.3.1 Efeitos *in vitro* do carvacrol contra diferentes microrganismos

##### 2.1.3.1.1 Análise da concentração inibitória mínima (CIM)

Os resultados da concentração inibitória mínima do carvacrol contra diferentes microrganismos estão descritos na Tabela 2. O carvacrol inibiu o *V. alginolyticus* e *V. harveyi* em uma concentração menor que os demais microrganismos. Para as vibriónáceas as concentrações de inibição foram de 0,078 mg mL<sup>-1</sup> de carvacrol, enquanto as demais bactérias obtiveram inibição apenas na concentração de 0,156 mg mL<sup>-1</sup> de carvacrol.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) do carvacrol contra diferentes microrganismos

<b>Microrganismos</b>	<b>CIM (mg mL<sup>-1</sup>)</b>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0,0781 ± 0,0
<i>Vibrio harveyi</i>	0,0781 ± 0,02
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0,1563 ± 0,04
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1563 ± 0,0
<i>Escherichia coli</i>	0,1563 ± 0,0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,1563 ± 0,04

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão das triplicatas.

#### 2.1.3.1.2 Análise por difusão em ágar

Os resultados da difusão em ágar do carvacrol contra diferentes microrganismos estão descritos na Tabela 3. Como observado, o carvacrol apresentou os maiores halos de inibição contra *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* com 13,75 mm e 12,92 mm, respectivamente. Além disso, estas vibriónáceas demonstraram diferenças significativas em relação aos demais microrganismos testados, com exceção de *E. coli*. Já os menores halos de inibição foram observados em *S. aureus*, seguido do *V. alginolyticus* e *E. coli* com 9,17 mm, 9,63 mm e 9,92 mm, respectivamente. Contudo, não foi possível observar crescimento bacteriano de *L. plantarum* e tão pouco a formação dos halos de inibição.

Tabela 3. Halos de inibição (em mm) pelo método de difusão em ágar com carvacrol contra diferentes microrganismos.

<b>Microrganismos (1 x 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Médias (mm)</b>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	9,63 ± 0,18 <sup>a</sup>
<i>Vibrio harveyi</i>	12,92 ± 0,82 <sup>b</sup>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	13,75 ± 0,12 <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,17 ± 0,47 <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i>	9,92 ± 2,0 <sup>ab</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Não houve crescimento bacteriano

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão das triplicatas. As letras distintas indicam diferença significativa obtidas por ANOVA - *one way*, seguido pelo teste de Tukey ( $p=0,0028$ ).

#### 2.1.3.2 Parâmetros de qualidade de água

A temperatura e o oxigênio dissolvido foram mantidos em 28,73 ± 0,75°C e 5,64 ± 0,40 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente e permaneceram constantes ao longo de todo o experimento.

Além destes, a média para salinidade foi de  $34,30 \pm 0,49 \text{ g L}^{-1}$ , pH de  $8,15 \pm 0,04$ , alcalinidade de  $121,12 \pm 15,17 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ , a amônia total de  $0,91 \pm 0,26 \text{ mg L}^{-1}$  e o nitrito  $0,39 \pm 0,26 \text{ mg L}^{-1}$ . De acordo com Van Wyk e Scarpa (1999), os parâmetros se mantiveram dentro dos padrões apropriados para a espécie e nenhum dos parâmetros descritos acima apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos.

### 2.1.3.3 Análise dos parâmetros imunológicos

Como descrito na Tabela 4 não foi possível observar diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos parâmetros imunológicos analisados, como Contagem Total de Hemócitos (THC), concentração total de proteínas do soro, Atividade da Fenoloxidase (PO) e capacidade aglutinante do soro entre os tratamentos.

Tabela 4. Parâmetros imunológicos de *Litopenaeus vannamei* alimentados com carvacrol nas concentrações de 1, 3, 4 e 6  $\text{mg mL}^{-1}$  e uma dieta controle, sem a adição de carvacrol.

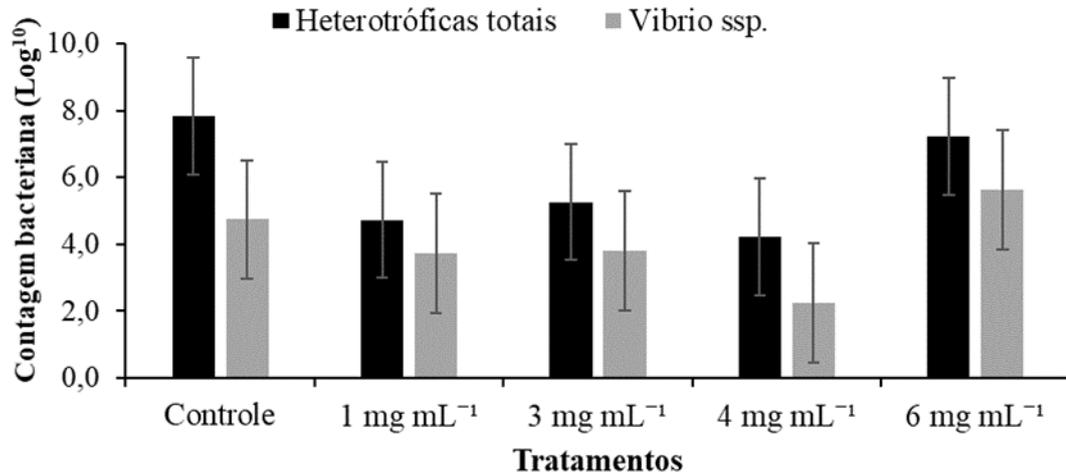
Tratamentos	THC ( $\times 10^6$ Cels $\text{mL}^{-1}$ )	Concentração Proteica ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Atividade da PO ( $\text{unit min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Proteína)	Título de Aglutinação ( $\log^2 x + 1$ )
Controle	$51,28 \pm 0,63$	$212,12 \pm 0,42$	$11,06 \pm 1,76$	$9,33 \pm 0,57$
1 $\text{mg mL}^{-1}$	$24,95 \pm 0,80$	$213,75 \pm 3,54$	$5,19 \pm 2,84$	$10,05 \pm 0,83$
3 $\text{mg mL}^{-1}$	$56,03 \pm 0,20$	$212,07 \pm 0,45$	$8,14 \pm 4,96$	$9,80 \pm 0,33$
4 $\text{mg mL}^{-1}$	$77,96 \pm 0,16$	$214,25 \pm 4,57$	$7,13 \pm 2,56$	$9,24 \pm 0,66$
6 $\text{mg mL}^{-1}$	$41,44 \pm 0,66$	$213,71 \pm 1,49$	$7,26 \pm 2,02$	$10 \pm 0$
Valor $p$	0,391	0,751	0,281	0,354

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão das triplicatas. THC: Contagem Total de Hemócitos; PO: Fenoloxidase.

### 2.1.3.4 Análise da microbiota do trato intestinal

A contagem de bactérias do trato intestinal de *L. vannamei* alimentados com diferentes concentrações carvacrol não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), conforme demonstrado na Figura 5.

Figura 5. Contagem de bactérias do trato intestinal de *Litopenaeus vannamei* alimentados com carvacrol nas concentrações de 1, 3, 4 e 6 mg mL<sup>-1</sup> e uma dieta controle, sem a adição de carvacrol.

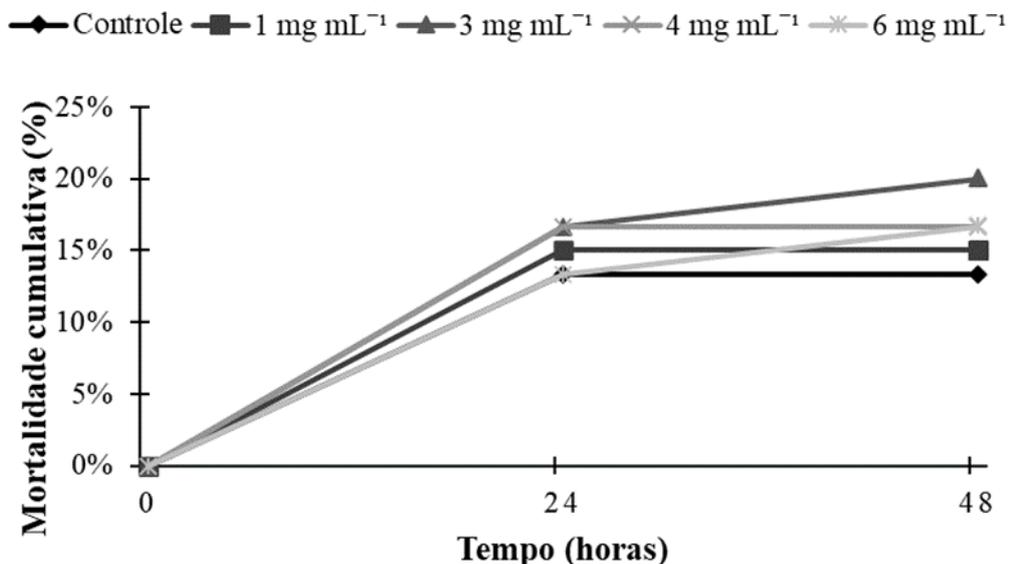


Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão das triplicatas e as barras indicam o desvio padrão da média. Heterotróficas totais  $p = 0,655$ . *Vibrio* spp.  $p = 0,785$ .

#### 2.1.3.5 Desafio experimental com *Vibrio parahaemolyticus*

Após 48 h, os animais desafiados com *V. parahaemolyticus* não demonstraram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos (Figura 6). Contudo, foi possível observar que os animais tratados com 3 mg mL<sup>-1</sup> de carvacrol obtiveram a porcentagem de mortalidade mais elevada, com 20%, seguido dos tratamentos com 4 e 6 mg mL<sup>-1</sup> com 16,67%, 1 mg mL<sup>-1</sup> com 15% e o controle com 13,3%.

Figura 6. Mortalidade cumulativa de *Litopenaeus vannamei* alimentados com carvacrol nas concentrações de 1, 3, 4 e 6 mg mL<sup>-1</sup> e uma dieta controle, sem a adição de carvacrol.



Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão das triplicatas.  $p = 0,978$ .

### 2.1.3.6 Avaliação dos parâmetros zootécnicos

Após o período de quatro semanas, não foram observadas diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos parâmetros zootécnicos analisados, como ganho de peso semanal (GPS), peso final, fator de conversão alimentar (FCA) e sobrevivência, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros zootécnicos de *Litopenaeus vannamei* alimentados com carvacrol nas concentrações de 1, 3, 4 e 6 mg mL<sup>-1</sup> e uma dieta controle, sem a adição de carvacrol.

Tratamentos	GPS (g)	Peso final (g)	FCA	Sobrevivência (%)
Controle	1,74 ± 0,08	11,87 ± 0,02	1,40 ± 0,02	100 ± 0,0
1 mg mL <sup>-1</sup>	1,69 ± 0,06	11,83 ± 0,32	1,33 ± 0,07	100 ± 0,0
3 mg mL <sup>-1</sup>	1,63 ± 0,10	12,12 ± 0,59	1,37 ± 0,08	98,7 ± 2,31
4 mg mL <sup>-1</sup>	1,78 ± 0,17	11,83 ± 0,38	1,45 ± 0,06	98,6 ± 2,41
6 mg mL <sup>-1</sup>	1,67 ± 0,03	11,25 ± 0,28	1,43 ± 0,02	100 ± 0
Valor <i>p</i>	0,458	0,126	0,231	0,518

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão das triplicatas. GPS: ganho de peso semanal; FCA: fator de conversão alimentar.

## 2.1.4 DISCUSSÃO

Nos últimos anos o uso de compostos antimicrobianos derivados de plantas tem atraído crescente interesse na aquicultura, pois podem representar uma alternativa promissora ao uso dos antibióticos nos cultivos (ABUTBUL *et al.*, 2004; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2009). Neste sentido, o carvacrol, por apresentar forte atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias, surgiu como um composto bioativo para fins terapêuticos e tem sido muito testado (MARINELLI; DI STEFANO; CACCIATORE, 2018).

Estudos *in vitro* demonstraram ação antimicrobiana, do carvacrol contra *V. parahaemolyticus*, *S. aureus* e *Pseudomonas fluorescens* e apresentou CIM de 0,5; 0,125 e 0,5 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (FANG *et al.*, 2019). Em outro estudo, o carvacrol também foi avaliado contra outros microrganismos, tais como *E. coli* apresentando CIM de 0,064 mg mL<sup>-1</sup> e *S. typhimurium* com CIM de carvacrol de 0,12 mg mL<sup>-1</sup> (LEMOS *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2017). Além destes, o óleo essencial de tomilho (*T. vulgaris*), contendo 60% de carvacrol, foi avaliado contra *V. vulnificus*, *Vibrio fluvialis* e *V. parahaemolyticus* com CIM de carvacrol de 0,156 mg mL<sup>-1</sup> e para *V. alginolyticus* foi de 0,078 mg mL<sup>-1</sup> (HAJLAOUI *et al.*, 2010; SNOUSSI *et al.*, 2008). Estas últimas concentrações estão condizentes com os achados no

presente estudo, no qual *V. alginolyticus* e *V. harveyi* demonstraram inibição do crescimento até a concentração de 0,078 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto as demais bactérias obtiveram inibição apenas na concentração de 0,156 mg mL<sup>-1</sup> de carvacrol. Com isso, foi possível verificar que o composto fenólico demonstrou potencial ação antimicrobiana contra todas as bactérias testadas no presente estudo, inclusive a bactéria probiótica.

Entretanto, no teste de difusão em ágar, não foi possível observar crescimento bacteriano de *L. plantarum* e tão pouco a formação dos halos de inibição, mesmo utilizando carvacrol diluído. Uma sugestão para isso, é que devido a velocidade de crescimento da bactéria probiótica ser mais lenta que as demais bactérias testadas acredita-se que o carvacrol possa ter se incorporado no ágar e isso impediu o crescimento do probiótico. Estudos relatam que o tipo bacteriano pode influenciar na eficácia dos óleos essenciais e poderia ser explicado pela diferença na estrutura das suas membranas (GILLES *et al.*, 2010; NEVAS *et al.*, 2004) porém, isso não foi confirmado no presente estudo.

Para os demais microrganismos, no teste de difusão em ágar *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi*, apresentaram os maiores halos de inibição e foram estatisticamente diferentes em relação aos demais microrganismos testados, com exceção para *E. coli*. Estes resultados corroboram os estudos de Snoussi *et al.* (2008) no qual utilizaram o óleo essencial de tomilho (*T. vulgaris*), contendo 60% de carvacrol, e o halo de inibição obtido para *V. alginolyticus* foi de 13,3 mm, *V. parahaemolyticus* de 14,66 mm, *V. vulnificus* de 12,66 mm e *V. fluvialis* de 13 mm. Além destes, Guarda *et al.* (2011) obtiveram halos de inibição para *E. coli* de 9,0 mm e para *S. aureus* 11 mm e estes dados estão condizentes com os resultados obtidos no presente trabalho.

A partir dos resultados promissores obtidos pelos testes *in vitro* neste estudo, foram definidos as diferentes concentrações de carvacrol para adicionar nas dietas do camarão-branco-do-pacífico. O bom desempenho dos animais aquáticos já foi demonstrado por Ahmadifar *et al.* (2011) no qual utilizando carvacrol e timol na alimentação para *Oncorhynchus mykiss* observaram que os peixes alimentados com dietas contendo 2 e 3 g kg<sup>-1</sup> dos compostos exibiram maior ganho de peso, comprimento e peso final, além de influenciar os parâmetros imunológicos. Entretanto, estudos utilizando diferentes concentrações de carvacrol (0,025% e 0,05%) como aditivo alimentar para o peixe *Dicentrarchus labrax*, indicaram que a inclusão deste composto não afetou o desempenho de crescimento dos animais e a resposta imune (VOLPATTI *et al.*, 2013). Isso também foi observado neste estudo, em que diferentes concentrações de carvacrol (1, 3, 4 e 6 mg mL<sup>-1</sup>) não afetaram o desempenho de *L. vannamei* e a resposta imunológica referente aos parâmetros avaliados.

Sabe-se que o intestino dos animais desempenha um papel vital na absorção e metabolismo de nutrientes e atua como uma das primeiras linhas de defesa contra patógenos e estresse ambiental (GARRETT; GORDON; GLIMCHER, 2010; ROMBOUT JAN *et al.*, 2011). Neste contexto, observou-se que a microbiota intestinal de *L. vannamei* alimentados com diferentes concentrações de carvacrol, e mesmo com a aparente abundância de bactérias no tratamento de 6 mg mL<sup>-1</sup> em comparação com os demais tratamentos, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

Apesar dos excelentes resultados obtidos nos testes *in vitro* do presente trabalho, no teste *in vivo* as diferentes concentrações de carvacrol não afetaram o desempenho zootécnico, imunológico, microbiota intestinal e a resistência dos animais desafiados com *V. parahaemolyticus*. Uma hipótese para isso é que o uso do óleo essencial pode apresentar maior eficácia do que os seus compostos puros e isolados, como por exemplo, o carvacrol, pois existe um sinergismo entre todos os componentes presentes no óleo essencial, como já demonstrado na literatura (LEMOS *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2009). Ademais, Nostro *et al.* (2012) demonstraram que o carvacrol pode ser mais efetivo quando o pH do meio é ácido, provavelmente devido à maior hidrofobicidade que resulta em uma melhor fragmentação dos lipídios da membrana. Esse mecanismo de ação foi evidenciado por Marinelli *et al.* (2018) na qual relatam que a membrana externa e a citoplasmática das bactérias são considerados os principais locais de ação do carvacrol ocorrendo alterações funcionais e estruturais das membranas, interferência na síntese e função dos ácidos nucleicos, coagulação do citoplasma e vazamento dos seus constituintes, desequilíbrio do metabolismo e inibição do *Quorum sensing* (QS) (KNOBLOCH *et al.*, 1989; SIKKEMA; JAN; POOLMAN, 1995). Além disso, de acordo com Astashkina *et al.* (2012) os modelos *in vitro* não representam completamente a fisiologia *in vivo* e, portanto, estes podem não fornecer informações suficientes para entender com precisão a propriedade biológica do composto estudado.

### 2.1.5 CONCLUSÃO

A atividade antimicrobiana do carvacrol foi confirmada no presente estudo com bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e sugere-se que sua possível ação antimicrobiana seja mais eficaz contra *Vibrio* spp. No entanto, as concentrações de carvacrol utilizadas nas dietas não afetaram o desempenho zootécnico, imunológico, a microbiota intestinal e a resistência dos camarões ao desafio com *V. parahaemolyticus*. Estes resultados podem servir

como base para estudos futuros que visam os mecanismos de ação do carvacrol no trato intestinal dos camarões marinhos.

## REFERÊNCIAS

- ABCC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO. Vamos reforçar a defesa sanitária do Brasil ou vamos permitir a importação de camarão do Equador? **ano XIX nº 1**, p. 26–29, 2017. Disponível em: <https://abccam.com.br/wp-content/uploads/2017/06/REVISTA-ABCCEDI%C3%87%C3%83O-JUNHO-2017.pdf>. Acesso em: Set. 2020.
- ABUTBUL, S. *et al.* Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis sp.*). **Aquaculture**, v. 238, n. 1–4, p. 97–105, 2004.
- AHMADIFAR, E.; FALAHATKAR, B.; AKRAMI, R. Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, n. 4, p. 1057–1060, 2011.
- ALDERMAN, D. J.; HASTINGS, T. S. Antibiotic use in aquaculture: Development of antibiotic resistance - Potential for consumer health risks. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 139–155, 1998.
- AOAC – Association of Official Agricultural Chemists. 2005. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18th ed. Maryland, USA: AOAC International. 1094p, 2005.
- APHA – American Public Health Association, AWWA – American Water Works Association, WEF – Water Environment Federation. 2005. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21<sup>st</sup> ed. Washington, DC: APHA. 541p, 2005.
- ARAÚJO, M. M. DE; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana *in vitro* de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, n. 0, p. 1–7, 2016.
- ASTASHKINA, A.; MANN, B.; GRAINGER, D. W. A critical evaluation of *in vitro* cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 134, n. 1, p. 82–106, 2012.
- BARUAH, K. *et al.* Enhanced resistance against *Vibrio harveyi* infection by carvacrol and its association with the induction of heat shock protein 72 in gnotobiotic *Artemia franciscana*. **Cell Stress and Chaperones**, v. 22, n. 3, p. 377–387, 2017.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CARVALHO, R. I. *et al.* Lipids, pH, and their interaction affect the inhibitory effects of carvacrol against *Salmonella Typhimurium* PT4 and *Escherichia coli* O157:H7. **Frontiers in**

**Microbiology**, v. 8, n. Jan, 2018.

CHAKRABORTY, S. B.; HANCZ, C. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. **Reviews in Aquaculture**, v. 3, n. 3, p. 103–119, 2011.

CHAVAN, P. S.; TUPE, S. G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control**, v. 46, p. 115–120, 2014.

COSENTINO, S. *et al.* *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 130–135, 1999.

FANG, S. *et al.* Antimicrobial carvacrol incorporated in flaxseed gum-sodium alginate active films to improve the quality attributes of Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) during cold storage. **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 1–17, 2019.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. **The state of world fisheries and aquaculture 2020: sustainability in action**. Rome: SOFIA. Disponível em: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en/>. Acesso em: Nov. 2020.

FDA - Food and Drug Administration. **CRF - Code of federal regulations - Title 21**. v. 3. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.515&SearchTerm=carvacrol>. Acesso em: 10 Dez. 2020.

GARRETT, W. S.; GORDON, J. I.; GLIMCHER, L. H. Homeostasis and Inflammation in the Intestine. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 859–870, 2010.

GILLES, M. *et al.* Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 731–737, 2010.

GONG, H. *et al.* Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* I. Dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction. **Aquaculture**, v. 190, n. 3–4, p. 305–324, 2000.

GRACIA-VALENZUELA, M. H. *et al.* Antimicrobial effect of dietary oregano essential oil against *Vibrio* bacteria in shrimps. **Archives of Biological Sciences**, v. 66, n. 4, p. 1367–1370, 2014.

GUARDA, A. *et al.* The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 144–150, 2011.

GUIMARÃES, A. G. *et al.* Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949–957, 2010.

HAJLAOUI, H. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils of five Tunisian aromatic plants. **Italian Journal of Food Science**, v. 22, n. 3, p. 320–329, 2010.

KNOBLOCH, K. *et al.* Journal of Essential Oil Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components. v. 1, n. 3, September 2013, p. 37–41, 1989.

LEMOS, M. F. *et al.* Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 543–548, 2017.

LIMA, D. S. DE *et al.* Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpenos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de  $\beta$ -lactamases de amplo espectro. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 1, p. 17–21, 2017.

MAGGIONI, D. S. *et al.* 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**, v. 241, n. 1–4, p. 501–515, 2004.

MARINELLI, L.; DI STEFANO, A.; CACCIATORE, I. Carvacrol and its derivatives as antibacterial agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 4, p. 903–921, 2018.

NCCLS - National Committee For Clinical Laboratory Standards. Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Approved Guideline. Wayne, Pennsylvania, U.S.A: NCCLS. **NCCLS document M49-A**, v. 26, 2006.

NEVAS, M. *et al.* Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. **Journal of food protection**, v. 67, n. 1, p. 199–202, 2004.

NOSTRO, A. *et al.* Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191–195, 2004.

NOSTRO, A. *et al.* Enhanced activity of carvacrol against biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in an acidic environment. **Apmis**, v. 120, n. 12, p. 967–973, 2012.

NRC - National Research Council. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington, D. C.: The National Academies Press, 2011.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Prophylactic effect of *Andrographis paniculata* extracts against *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 5, p. 579–582, 2009.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Assessment of synergistic efficacy of carvacrol and cymene against *Edwardsiella tarda* in vitro and in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 5, p. 420–425, 2010.

RAY, A. J. *et al.* Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. **Aquaculture**, v. 299, n. 1–4, p. 89–98, 2010.

ROMBOUT JAN, J. H. W. M. *et al.* Teleost intestinal immunology. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, n. 5, p. 616–626, 2011.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 283–294, 2010.

SANTOS, H. M. *et al.* Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): a review. **Aquaculture International**, v. 28, p. 169–185, 2020.

SÁNCHEZ, C.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. The effect of carvacrol on enteric viruses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 192, p. 72–76, 2015.

SIKKEMA, J. A. N.; JAN, A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. v. 59, n. 2, p. 201–222, 1995.

SNOUSSI, M. *et al.* *In-vitro* anti-*Vibrio* spp. activity and chemical composition of some Tunisian aromatic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 3071–3076, 2008.

SÖDERHÄLL, K.; HÄLL, L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. **BBA - General Subjects**, v. 797, n. 1, p. 99–104, 1984.

STRATAKOS, A. C. *et al.* The *in vitro* effect of carvacrol, a food additive, on the pathogenicity of O157 and non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 84, p. 290–296, 2018.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. A Practical Handbook of Seawater Analysis. **A practical handbook of seawater analysis**, v. 167, p. 185, 1972.

TALPUR, A. D.; IKHWANUDDIN, M.; AMBOK BOLONG, A. M. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. **Aquaculture**, v. 400–401, p. 46–52, 2013.

VAN WYK, P.; SCARPA, J. Water Quality Requirements and Management. In: Van Wyk, P. *et al.* (Eds.). **Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems**. Florida: Department of Agriculture and Consumer Services, 1999. p. 141–162.

VOLPATTI, D. *et al.* Growth parameters, innate immune response and resistance to *Listonella (Vibrio) anguillarum* of *Dicentrarchus labrax* fed carvacrol supplemented diets. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 1, p. 31–44, 2013.

ZHENG, Z. L. *et al.* Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 292, n. 3–4, p. 214–218, 2009.

ZHOU, Q. C. *et al.* Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 364–365, p. 252–258, 2012.

## 2.2 AUMENTO DA RESISTÊNCIA AO CHOQUE TÉRMICO NO CAMARÃO-BRANCO-DO-PACÍFICO ALIMENTADO COM ALGA VERDE E O SEU EFEITO EM CONJUNTO COM PROBIÓTICO

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da macroalga *Ulva ohnoi* isoladamente e em conjunto com o probiótico *Lactobacillus plantarum* no desempenho zootécnico, imunológico, microbiológico, na resistência ao choque térmico e na sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* desafiados com *Vibrio parahaemolyticus*. Para isso, os camarões foram alimentados com quatro dietas: a) Controle (sem aditivos); b) Alga a 2%; c) Probiótico na concentração de  $1,7 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> por grama de ração; d) Combinação de Alga + Probiótico. Após seis semanas, foram avaliados os parâmetros zootécnicos, imunológicos, microbiológicos, a sobrevivência dos animais desafiados com *V. parahaemolyticus* ( $3 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) por 48 h e a resistência térmica dos camarões a temperatura de  $11,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Os camarões desafiados com *Vibrio* demonstraram diferença significativa entre os tratamentos controle e probiótico e controle e alga, sendo que os animais suplementados apenas com alga apresentaram maior taxa de mortalidade (92,5%), seguidos dos suplementados com probiótico (90%), alga + probiótico (87,5%) e controle (65%). Os tratamentos controle e alga também demonstraram diferença significativa na resistência ao choque térmico, sendo que os animais tratados com a dieta controle apresentaram maior taxa de mortalidade (37,5%), seguido dos tratamentos com alga + probiótico (32,5%), probiótico (27,5%) e alga (22,5%). Já os parâmetros zootécnicos, imunológicos e microbiológicos não demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos. Em conclusão, a utilização de *U. ohnoi* isoladamente demonstrou um efeito positivo na resistência ao choque térmico, mas não demonstrou proteção contra a infecção causada pelo *V. parahaemolyticus*. Já o seu uso combinado com *L. plantarum* nas dietas não exerceu nenhum efeito sinérgico ou antagônico nos demais parâmetros avaliados.

**Palavras-chave:** *Litopenaeus vannamei*; *Ulva ohnoi*; *Lactobacillus plantarum*; *Vibrio*; Choque térmico.

### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the in vivo effect of the macroalgae *Ulva ohnoi* alone and combined with the probiotic *Lactobacillus plantarum* on the performance of zootechnical, immunological, microbiological, thermal resistance and survival of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. For this, the shrimp were fed with four diets: a) Control (without additives); b) 2% seaweed; c) Probiotic at a concentration of  $1.7 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>; d) Combination of Alga + Probiotic. After six weeks, the zootechnical, immunological, microbiological parameters, the survival of animals challenged with *V. parahaemolyticus* ( $3 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>) for 48 h, and the thermal resistance of the shrimp at a temperature of  $11.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$  were evaluated. The shrimp challenged with *Vibrio* showed a significant difference between the control and probiotic and control and seaweed treatments, with the highest percentage of mortality being observed in the group fed only with seaweed, which was 92.5%, followed by treatments with probiotic with 90%, seaweed + probiotic with 87.5% and control with 65%. The control and seaweed treatments also showed a significant difference in resistance to heat shock, and the animals treated with the control diet had the highest mortality rate, with 37.5%, followed by treatments with seaweed + probiotic with 32.5%, probiotic with 27.5% and seaweed with 22.5%. The zootechnical, immunological and microbiological parameters did not show significant differences between treatments. In conclusion, the use of

*U. ohnoi* alone demonstrated a positive effect on heat shock resistance, but did not demonstrate protection against infection caused by *V. parahaemolyticus*. On the other hand, its combined use with *L. plantarum* in the diets did not have any synergistic or antagonistic effect on the parameters evaluated.

**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*. *Ulva ohnoi*. *Lactobacillus plantarum*. *Vibrio*. Thermal shock.

### 2.2.1 INTRODUÇÃO

O camarão *Litopenaeus vannamei* é considerado uma das espécies mais importantes para a carcinicultura e nos últimos anos esta atividade alcançou uma alta produção. Contudo, camarões marinhos são organismos ectotérmicos e podem sofrer estresse devido as oscilações de temperatura nos cultivos. Quando estas ficam baixas, o metabolismo em geral, como o sistema imunológico, antioxidante, a osmorregulação, comportamento e o crescimento destes animais podem ser afetados negativamente (REN *et al.*, 2021; XU *et al.*, 2019).

Além disso, as alterações nos fatores ambientais contribuem para a imunossupressão dos animais cultivados e podem aumentar sua suscetibilidade as enfermidades causadas por vírus e bactérias patogênicas (JIAO *et al.*, 2021; KLONKLAEW *et al.*, 2020; REVERTER *et al.*, 2014). Entre as infecções, estão as causadas por bactérias do gênero *Vibrio*, como o *Vibrio parahaemolyticus*, conhecido por ser o agente etiológico da Doença da necrose hepatopancreática aguda (AHPND, *acute hepatopancreatic necrosis disease*) que causou enormes perdas econômicas na carcinicultura global (BOYD; PHU, 2018; SANTOS *et al.*, 2020).

Para controlar estas infecções microbianas nos cultivos, uma das estratégias é o uso de antibióticos. Entretanto, o seu uso indiscriminado não é recomendado, uma vez que eles podem ser acumulados nos tecidos dos animais e assim aumentar os riscos à saúde destes, como dos humanos e causar sérios impactos ao meio ambiente (BURRIDGE *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2021). Por estes motivos, é de suma importância buscar alternativas com métodos biológicos que visam melhorar a imunidade dos animais, controlar as infecções nos cultivos e ainda auxiliá-los na resistência as quedas na temperaturas (NAIEL *et al.*, 2021). Dentre estes, está o uso de probióticos, na qual são descritos como microrganismos vivos que ao serem ministrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; HILL *et al.*, 2014). Um exemplo de probiótico, é o *Lactobacillus plantarum*, que pertence ao grupo das Bactérias do Ácido Lático (BAL) (ZHENG *et al.*, 2018). Quando suplementada na alimentação dos camarões esta cepa diminuiu a contagem

de vibriónáceas no trato intestinal, melhorou o desempenho de crescimento, eficiência alimentar, atividade enzimática e a sobrevivência dos animais desafiados com vibriónáceas (KONGNUM; HONGPATTARAKERE, 2012; LI *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2016). No entanto, estudos relacionando o uso de probióticos na alimentação de *L. vannamei* e o seu efeito na resistência ao choque térmico ainda são escassos.

Outra medida profilática que auxilia na mitigação das enfermidades, reduz o uso de quimioterápicos nos cultivos e melhora a resistência ao estresse térmico dos animais é o uso de produtos naturais de origem marinha (REZENDE *et al.*, 2021; ROMERO; GLORIA; NAVARRETE, 2012). Dentre estes estão as algas verdes, que fazem parte do gênero *Ulva*. Elas possuem ampla distribuição mundial e apresentam quantidades significativas de compostos bioativos que tem mostrado potencial na melhora do sistema imunológico em organismos cultivados (MANTRI *et al.*, 2020; TZIVELEKA; IOANNOU; ROUSSIS, 2019). Dessa forma, vários estudos empregam macroalgas na alimentação dos animais cultivados, pois estas carecem de efeitos tóxicos para o metabolismo celular, possuem métodos de cultivo simples, crescem rápido e o custo da produção é consideravelmente baixo (VATSOS; REBOURS, 2015). Em camarões, o extrato da *Ulva fasciata* adicionado na dieta de *Pennaeus monodon* atuou como agente profilático no controle das vibrioses (VATSOS; REBOURS, 2015). Já o extrato das espécies de *Ulva intestinalis*, *Ulva clathrata*, *Ulva rigida* e *Ulva lactuta* na dieta de *L. vannamei* melhoraram o desempenho de crescimento e os parâmetros imunológicos (AKBARY; AMINIKHOEI, 2018; ELIZONDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2018; KLONKLAEW *et al.*, 2021; PRATIWI; PRATIWI, 2021). Além destes, pesquisas apontam que camarões marinhos alimentados com dietas contendo algas pardas obtiveram efeito positivo na resistência ao choque térmico e isso poderia estar relacionado aos seus compostos bioativos (REZENDE *et al.*, 2021; SCHLEDER *et al.*, 2017a). Contudo, essa resistência ainda não foi comprovada em *L. vannamei* alimentados com a alga *U. ohnoi*.

Devido aos efeitos negativos que as temperaturas baixas causam no metabolismo dos crustáceos, somado à necessidade de buscar abordagens mais sustentáveis que reduzam o uso de quimioterápicos na carcinicultura, a utilização da biomassa seca de *U. ohnoi* em conjunto com o probiótico *L. plantarum* na suplementação dietética dos peneídeos revelam ser alternativas promissoras. Estes, além de servirem como fontes de nutrientes podem atuar em sinergismo e auxiliar na imunocompetência dos animais contra os patógenos, como os do gênero *Vibrio*. Com isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito *in vivo* da biomassa seca de *U. ohnoi* isoladamente e em conjunto com *L. plantarum* no desempenho

zootécnico, imunológico, microbiológico, na resistência ao choque térmico e na sobrevivência de *L. vannamei* desafiados com *V. parahaemolyticus*.

## 2.2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM). A fabricação da dieta foi realizada no Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI) e a dieta acrescida com alga foi preparada no LCM, assim como o choque térmico e o desafio experimental com *Vibrio parahaemolyticus*. A coleta da macroalga *U. ohnoi* foi realizada nos tanques do Laboratório de Piscicultura marinha (LAPMAR). Todos os laboratórios pertencem à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Florianópolis (SC).

### 2.2.2.1 Preparo do probiótico

Inicialmente *L. plantarum* foi semeado em meio de cultura caldo MRS, acrescido com 3% de NaCl e incubados a 35°C. Após 24 h, 10 ml dessa suspensão probiótica foi inserida em 100 ml de soro de leite (contendo 3% de NaCl e 2% de açúcar) e incubados em estufa a 35°C por 24 h. Após esse período, o pH do probiótico foi medido para confirmar o crescimento bacteriano, no qual pH abaixo de 4 indica um bom crescimento. Em seguida o probiótico foi armazenado na geladeira e utilizado por no máximo 48 h.

Para a contagem de *L. plantarum* na dieta a suspensão probiótica foi realizada conforme descrita acima e inserida na ração. Em seguida, esta foi macerada e diluída serialmente (1/10) em solução salina estéril 3%. Após, foi semeado em meio de cultura ágar MRS e incubados em estufa a 35°C por 48 h. Ao final, as contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC) obtidas foram de  $1,7 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

### 2.2.2.2 Biomassa seca da macroalga

A macroalga *U. ohnoi* foi coletada no mês de março e estava inserida nos tanques de cultivo de peixes (*Mugil liza*) no LAPMAR. Após a coleta, as algas foram transportadas até o LCM, onde foi retirado qualquer material incrustado, em seguida limpas rapidamente com água doce e secas a temperatura ambiente por aproximadamente 3 h. Posteriormente, estas

foram colocadas em estufa, com circulação de ar, e secas por 24 h a 38,5°C. Em seguida a biomassa seca foi moída, peneirada e armazenada no freezer -20°C até a sua utilização.

#### 2.2.2.3 Animais

A pesquisa foi desenvolvida com camarões marinhos *L. vannamei* adquiridos da empresa Aquatec Aquacultura Ltda. (Rio Grande do Norte, Brasil). Os animais foram cultivados no LCM em sistema de bioflocos até atingirem o peso ideal para o início dos testes experimentais.

#### 2.2.2.4 Preparo das dietas experimentais

As dietas foram formuladas com o auxílio do software Optimal Fórmula 2000® versão 19102009, baseado nas recomendações e exigências nutricionais para *L. vannamei* (GONG *et al.*, 2000; NRC, 2011; ZHOU *et al.*, 2012). Os ingredientes secos foram previamente triturados e peneirados a 600 µm. Posteriormente, os microingredientes foram homogeneizados e em seguida adicionados aos macroingredientes. Sucessivamente foram acrescentados os óleos, a lecitina de soja e água (200 mL kg<sup>-1</sup> da dieta). A mistura resultante foi peletizada em uma microextrusora (Inbramaq MX-40), seca em estufa a 40°C e posteriormente a ração finalizada foi refrigerada até a sua utilização. Para o experimento foram testadas quatro dietas, sendo: a) Dieta controle (sem aditivos); b) Dieta acrescida com alga; c) Dieta contendo probiótico e d) Dieta com a combinação de alga + probiótico. A biomassa seca de *U. ohnoi* foi adicionada durante o preparo da ração na concentração de 2%, conforme descrito no estudo de Legarda *et al.* (2021). Já *L. plantarum* (preparado conforme o item 3.2.1) foi pipetado na ração 30 minutos antes das alimentações com volume de 100 mL de probiótico por quilograma na dieta, de acordo com a metodologia descrita por Vieira *et al.*, (2008), sendo que cada grama de ração continha probiótico na concentração de 1,7 x 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. A composição centesimal da ração foi analisada de acordo com o descrito por AOAC (2005) e os ingredientes utilizados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Formulação e composição centesimal da ração utilizada.

<b>Ingredientes (g kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Controle</b>	<b>Alga</b>	<b>Probiótico</b>	<b>Alga + Probiótico</b>
Farelo de soja	324,63	324,63	324,63	324,63
Farinha de trigo	150,00	150,00	150,00	150,00
Resíduo de peixe	150,00	150,00	150,00	150,00
Farinha de vísceras	125,67	125,67	125,67	125,67
Carboximetilcelulose	5,00	5,00	5,00	5,00
Lecitina de soja	25,00	25,00	25,00	25,00
Fosfato monocálcico	25,00	25,00	25,00	25,00
Óleo de soja	10,00	10,00	10,00	10,00
Vitamina C	0,70	0,70	0,70	0,70
Premix vitamínico <sup>1</sup>	5,00	5,00	5,00	5,00
Premix mineral <sup>2</sup>	17,00	17,00	17,00	17,00
Sulfato de magnésio	15,00	15,00	15,00	15,00
Caulim	100,00	100,00	100,00	100,00
Cloreto de sódio	12,00	12,00	12,00	12,00
Cloreto de potássio	10,00	10,00	10,00	10,00
Metionina	5,00	5,00	5,00	5,00
Óleo de peixe	20,00	20,00	20,00	20,00
<i>Ulva ohnoi</i>	0%	2%	0%	2%
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	0	1,7x10 <sup>8</sup> UFC mL <sup>-1</sup> por grama de ração	1,7x10 <sup>8</sup> UFC mL <sup>-1</sup> por grama de ração
Umidade	9,04			
Proteína bruta	39,60			
Extrato etéreo	8,71			
Fibra bruta	1,87			
Cinzas	17,65			

Premix vitamínico<sup>1</sup>: vit. A - 900 mg kg<sup>-1</sup>; vit. D3 - 25 mg kg<sup>-1</sup>; vit. E - 46.900 mg kg<sup>-1</sup>; vit. K3 - 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>;

Premix mineral<sup>2</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>.

#### 2.2.2.5 Delineamento experimental

O experimento teve duração de seis semanas e avaliou o efeito das dietas descritas no item anterior para o camarão *L. vannamei* mantidos em água clara. O delineamento foi inteiramente ao acaso, com quatro repetições, totalizando dezesseis tanques. As unidades experimentais consistiam em tanques de polietileno, contendo 400 L de água, que era renovada até a completa retirada de restos de alimentos, fezes e mudas, em dias alternados.

As unidades experimentais possuíam aeração constante e aquecedores com termostato mantendo a temperatura em  $28,3 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ . Estas unidades foram povoadas com

trinta e cinco camarões com peso médio inicial de  $4,5 \pm 0,13$  gramas. As alimentações ocorreram quatro vezes ao dia e foram ajustadas de acordo com as biometrias semanais e a sobrevivência, seguindo uma conversão programada estimada (RAY *et al.*, 2010). Além disso, ao longo do experimento, foram monitorados os parâmetros de qualidade de água, como oxigênio dissolvido e temperatura uma vez ao dia (YSI 55, YSI Incorporated, Yellow Springs, OH, EUA). Uma vez por semana foram realizadas análises de pH (pHmetro Tecnal®), salinidade (Eco-Sense YSI EC30), alcalinidade (APHA, 2005), nitrito e amônia total realizado de acordo com Strickland e Parsons (1972).

#### 2.2.2.6 Avaliação dos parâmetros zootécnicos

Ao término do experimento foi realizado a biometria final de todos os camarões cultivados em cada unidade experimental para obtenção dos parâmetros zootécnicos, conforme indicado abaixo:

- Ganho de Peso Semanal (g/s) = {[peso médio final (g) – peso médio inicial (g)] / dias de cultivo} \* 7;
- Peso Final (g) dos animais ao final do experimento;
- Conversão Alimentar (CA) = ração consumida (kg)/biomassa de camarão produzida (kg);
- Sobrevivência (%) = (número final de camarões / número inicial de camarões) \* 100.

#### 2.2.2.7 Análise dos parâmetros imunológicos

Após o término do experimento a hemolinfa foi coletada do *sinus* ventral de dez camarões por tanque (quatro *pools* por tratamento). Para isso foram utilizadas seringas estéreis de 1 mL resfriadas a 4°C. A partir da hemolinfa coletada, 50 µL foram fixados em solução anticoagulante Alsever modificado (MAS, do inglês *Modified Alsever Solution* - citrato de sódio 27 mM, EDTA 9 mM, glicose 115 mM, NaCl 336 mM, pH 7.2) com 4% de formaldeído para contagem total de hemócitos (THC). O restante foi coagulado a 4°C, macerado e centrifugado a 6.000 *xg* por 10 min para obtenção do soro, no qual foi aliqotado e estocado a -20°C. O número de hemócitos por mililitro de hemolinfa foi estimado por contagem direta em câmara de Neubauer. A concentração total da proteína do soro foi realizada em microplacas de 96 poços (fundo chato) e estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro-albumina bovina como padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. A atividade da enzima fenoloxidase (PO) foi determinada por espectrofotometria

(490 nm) pela formação do pigmento DOPA-cromo, após a oxidação do substrato L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). As amostras do soro foram diluídas (1:15) em TBS-1 (Tris 1 mM, NaCl 336 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.6). Desta solução, 50 µL foram incubados em um volume igual de tripsina (Sigma, 1 mg mL<sup>-1</sup>) indutor enzimático, em microplacas de 96 poços (fundo chato) por 5 min a temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 50 µL de L-DOPA (Sigma, 3 mg mL<sup>-1</sup>) em todos os poços e a formação do DOPA-cromo foi monitorada após 5, 10 e 15 min. Nos controles, a tripsina foi substituída por TBS. A atividade da PO foi expressa em unidades de atividade da enzima (U) através da variação de 0,001 na absorbância/minuto/miligrama de proteína (SÖDERHÄLL; HÄLL, 1984). Para a análise da capacidade aglutinante do soro, inicialmente foram depositados 50 µL da solução TBS-2 (Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) em todos os poços da microplaca de fundo em “U”. Em seguida, foi adicionado no primeiro poço o soro diluído (1:15) em TBS-2 e realizado as diluições seriadas até o 12º poço. Ao final, 50 µL da solução de eritrócitos caninos a 2% foram adicionados em cada poço, misturados e incubados por 2 h em câmara úmida e a temperatura ambiente. Nos poços controle, o soro dos camarões foi substituído por TBS-2. O título aglutinante foi definido como o recíproco da última diluição capaz de aglutinar os eritrócitos (MAGGIONI *et al.*, 2004).

#### 2.2.2.8 Contagem bacteriológica do trato intestinal

Para esta análise foram amostrados intestinos de dez camarões de cada tanque (quatro *pools* por tratamento), totalizando quarenta camarões por tratamento. Os tratos intestinais foram assepticamente extraídos, homogeneizados em um gral e diluídos serialmente (1/10) em solução salina estéril 3%. Após, foram semeados em meio de cultura TSA (do inglês, *Agar Tryptic Soy*), TCBS (do inglês, *Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar*) e ágar MRS para contagem de bactérias heterotróficas totais, *Vibrio* spp. totais e bactérias lácticas, respectivamente. Os intestinos semeados nas placas de TSA e TCBS foram incubados em estufa a 30°C, por 24 h, as placas de MRS incubadas em estufa a 35°C, por 48 h e posteriormente foi realizada as contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC).

#### 2.2.2.9 Desafio experimental com *Vibrio parahaemolyticus*

Ao final do cultivo, quarenta camarões de cada tratamento foram transferidos para outra sala experimental e distribuídos em dezesseis unidades experimentais de 70 L com

aeração constante. Pela parte dorsal do primeiro segmento abdominal os camarões foram inoculados com 100  $\mu\text{L}$  de solução de *V. parahaemolyticus* em uma concentração de  $3 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  segundo teste  $\text{DL}_{50}$  realizado previamente. Os animais foram mantidos por 48 h, sem alimentação e durante esse período foi avaliada a mortalidade.

#### 2.2.2.10 Choque térmico

Após seis semanas de experimento, quarenta camarões de cada tratamento foram transferidos dos tanques com água na temperatura de  $28,3 \pm 0,6^\circ\text{C}$  para uma outra sala experimental contendo aquários de 60 L com água salgada na temperatura de  $11,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$  (segundo teste  $\text{TL}_{50}$  realizado previamente) e com aeração constante. Os animais foram mantidos nessa temperatura por 1 h e em seguida transferidos para os tanques com água salgada na temperatura de  $28,7 \pm 0,3^\circ\text{C}$ . Os camarões foram monitorados por 48 h, sem alimentação e durante esse período foi avaliada a mortalidade.

#### 2.2.2.11 Análises estatísticas

Os dados de contagem de bactérias do trato intestinal foram transformados para  $\log^{10}(x + 1)$ , e os de título aglutinante foram transformados em  $\log^2(x + 1)$  antes de serem submetidos a análise estatística. A homoscedasticidade e normalidade de todos os dados foram avaliadas através dos testes de Bartlett e Shapiro-Wilk, respectivamente. Em seguida, estes foram submetidos à análise de variância fatorial (ANOVA) (Probiótico x Alga), seguido pelo teste de Tukey. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa Statistica 13.5 (TIBCO Software Inc.), utilizando o nível de significância de 5%.

### 2.2.3 RESULTADOS

#### 2.2.3.1 Parâmetros de qualidade de água

A temperatura e o oxigênio dissolvido foram mantidos em  $28,3 \pm 0,63$  e  $5,69 \pm 0,57$ , respectivamente e permaneceram constantes ao longo de todo o experimento. Além destes, a média para salinidade foi de  $32,51 \pm 0,74 \text{ g L}^{-1}$ , pH de  $8 \pm 0,14$ , alcalinidade de  $123,06 \pm 4,47 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ , a amônia total de  $1,02 \pm 0,6 \text{ mg L}^{-1}$  e o nitrito  $0,03 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$ . De acordo

com Van wyk and Scarpa (1999), os parâmetros se mantiveram dentro dos padrões apropriados para a espécie.

### 2.2.3.2 Avaliação dos parâmetros zootécnicos

Após o período de seis semanas, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos parâmetros zootécnicos analisados, como ganho de peso semanal (GPS), peso inicial, peso final, fator de conversão alimentar (FCA) e sobrevivência, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros zootécnicos de *Litopenaeus vannamei* alimentados por seis semanas com uma dieta controle (sem aditivos), dieta contendo alga *Ulva ohnoi* (2%), dieta com probiótico *Lactobacillus plantarum* ( $1,7 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> por grama de ração) e uma dieta com a combinação de alga + probiótico.

Tratamentos	GPS (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)	FCA	Sobrevivência (%)
<b>Controle</b>	1,63 ± 0,33	4,57 ± 0,10	14,34 ± 0,14	1,47 ± 0,06	96,43 ± 2,74
<b>Alga</b>	1,47 ± 0,30	4,41 ± 0,21	13,22 ± 0,24	1,56 ± 0,08	99,29 ± 1,43
<b>Probiótico</b>	1,64 ± 0,29	4,47 ± 0,11	14,29 ± 0,25	1,43 ± 0,07	99,29 ± 1,43
<b>Alga + Probiótico</b>	1,48 ± 0,34	4,56 ± 0,15	13,46 ± 0,16	1,56 ± 0,04	99,29 ± 1,43
<b>Valor p</b>	0,976	0,120	0,178	0,589	0,147

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão das quadruplicatas. GPS: ganho de peso semanal; FCA: fator de conversão alimentar. O valor de  $p$  é referente a interação entre os tratamentos Probiótico x Alga.

### 2.2.3.3 Análise dos parâmetros imunológicos

Não foi possível observar diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos parâmetros imunológicos analisados, como Contagem Total de Hemócitos (THC), concentração total de proteínas do soro, Atividade da Fenoloxidase (PO) e capacidade aglutinante do soro entre os tratamentos, conforme descrito na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros imunológicos de *Litopenaeus vannamei* alimentados por seis semanas com uma dieta controle (sem aditivos), dieta contendo alga *Ulva ohnoi* (2%), dieta com probiótico *Lactobacillus plantarum* ( $1,7 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> por grama de ração) e uma dieta com a combinação de alga + probiótico.

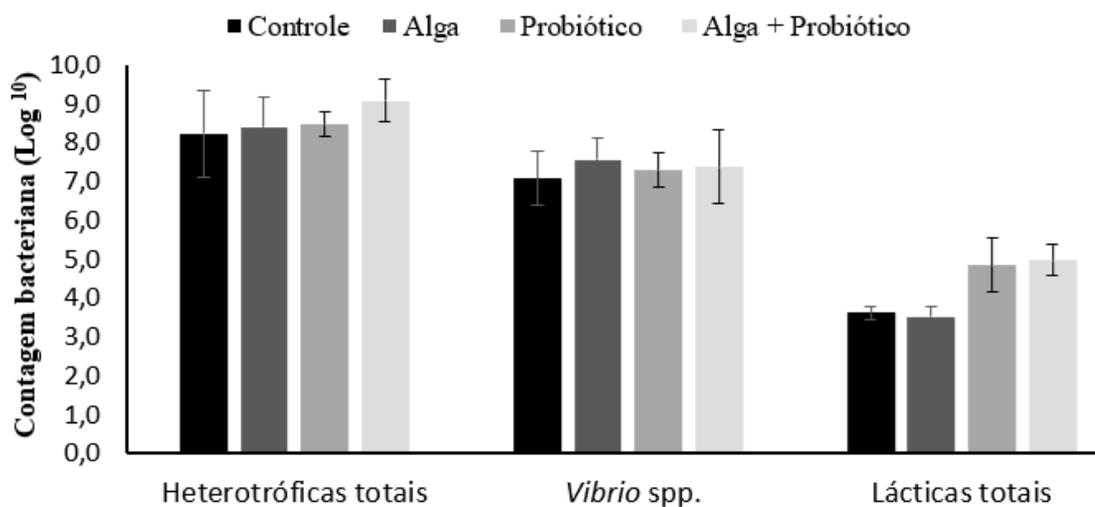
Tratamentos	THC (x10 <sup>6</sup> )	Concentração proteica (mg ml <sup>-1</sup> )	Atividade da PO (Unit min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> Protein)	Título de aglutinação (log <sup>2</sup> )
Controle	279,65 ± 0,75	484,81 ± 4,39	5,26 ± 0,96	10,93 ± 0,13
Alga	217 ± 0,47	484,94 ± 3,99	4,76 ± 0,43	10,39 ± 1,02
Probiótico	205,68 ± 0,76	484,21 ± 2,65	3,57 ± 0,87	10,18 ± 0,90
Alga + Probiótico	371 ± 0,11	482,05 ± 0,75	3,37 ± 0,73	10,43 ± 0,66
Valor <i>p</i>	0,329	0,496	0,691	0,315

Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão das quadruplicatas. THC: Contagem Total de Hemócitos; PO: Fenoloxidase. O valor de *p* é referente a interação entre os tratamentos Probiótico x Alga.

#### 2.2.3.4 Contagem bacteriológica do trato intestinal

A contagem de bactérias do trato intestinal de *L. vannamei* alimentados com dietas suplementadas e uma dieta controle não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), conforme demonstrado na Figura 7.

Figura 7. Contagem de bactérias do trato intestinal de *Litopenaeus vannamei* alimentados por seis semanas com uma dieta controle (sem aditivos), dieta contendo alga *Ulva ohnoi* (2%), dieta com probiótico *Lactobacillus plantarum* ( $1,7 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> por grama de ração) e uma dieta com a combinação de alga + probiótico.

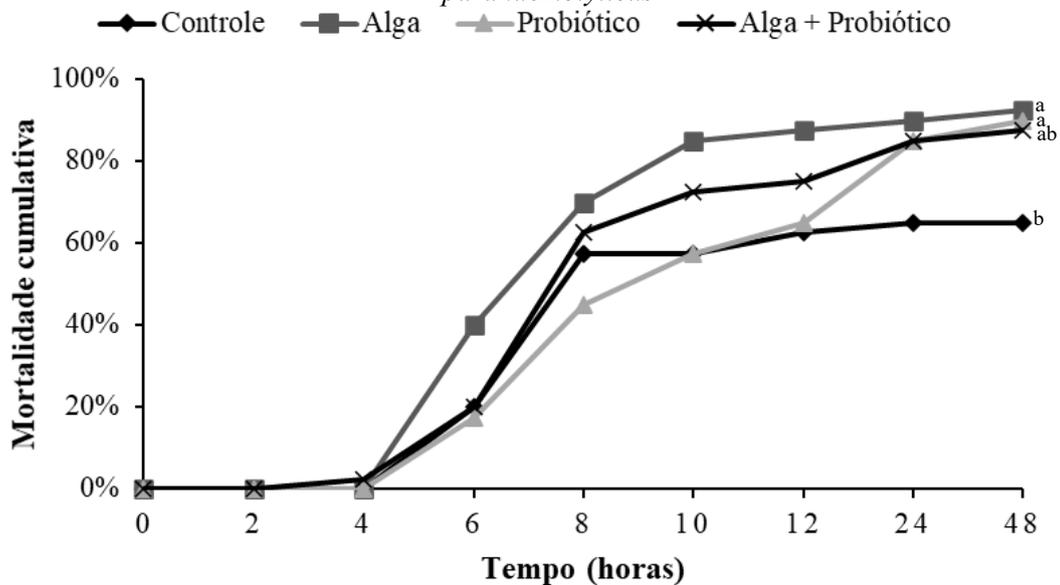


Os resultados estão apresentados como média ± desvio padrão das quadruplicatas e as barras indicam o desvio padrão da média. O valor de *p* é referente a interação entre os tratamentos Probiótico x Alga: Heterotróficas totais  $p = 0,563$ . *Vibrio* spp.  $p = 0,575$ . Láticas totais  $p = 0,635$ .

### 2.2.3.5 Desafio experimental com *Vibrio parahaemolyticus*

Após 48 h, os animais desafiados com *V. parahaemolyticus* demonstraram diferença significativa entre os tratamentos controle e alga ( $p= 0,014579$ ) e controle e probiótico ( $p= 0,0262$ ). Observou-se que os animais tratados com a dieta com alga apresentaram maior taxa de mortalidade, com 92,5%, seguido dos tratamentos com probiótico com 90%, alga + probiótico com 87,5% e controle com 65% (Figura 8).

Figura 15. Mortalidade cumulativa de *Litopenaeus vannamei* alimentados por seis semanas com uma dieta controle (sem aditivos), dieta contendo alga *Ulva ohnoi* (2%), dieta com probiótico *Lactobacillus plantarum* ( $1,7 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> por grama de ração) e uma dieta com a combinação de alga + probiótico após o desafio com *V. parahaemolyticus*.

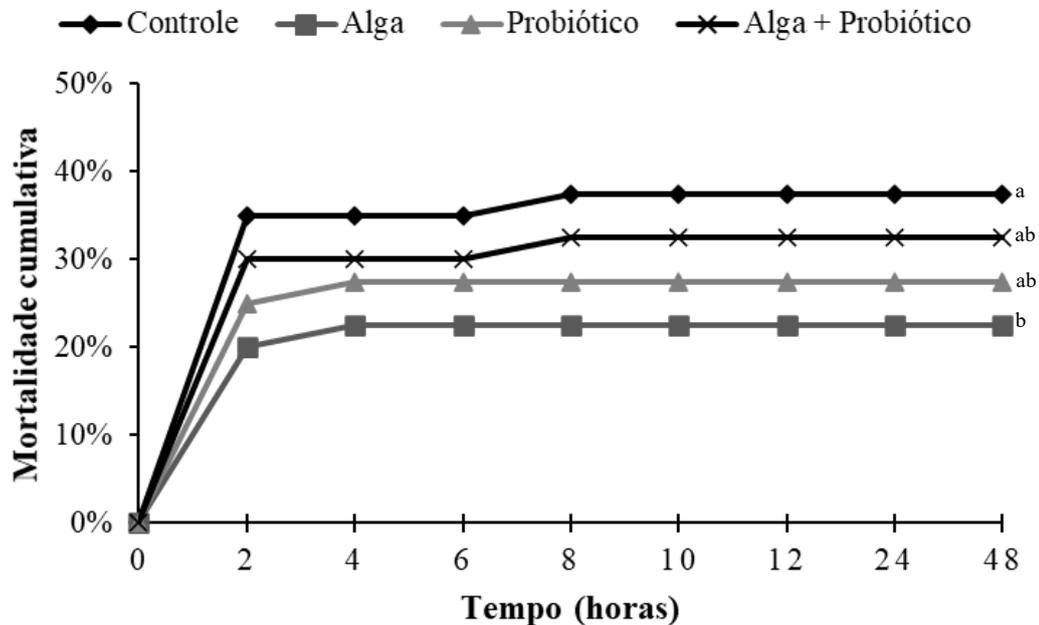


Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão das quadruplicatas. O valor de  $p$  é referente a interação entre os tratamentos Probiótico x Alga. As diferenças estatísticas estão indicadas por letras diferentes (<sup>ab</sup>) ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.3.6 Choque térmico

Ao final do monitoramento, os animais do choque térmico demonstraram diferença significativa entre os tratamentos controle e alga ( $p= 0,0485$ ), conforme demonstrado na Figura 9. Observou-se que os animais tratados com a dieta controle apresentaram maior taxa de mortalidade, com 37,5%, seguido dos tratamentos com alga + probiótico com 32,5%, probiótico com 27,5% e alga com 22,5% (Figura 9).

Figura 19. Mortalidade cumulativa de *Litopenaeus vannamei* alimentados por seis semanas com uma dieta controle (sem aditivos), dieta contendo alga *Ulva ohnoi* (2%), dieta com probiótico *Lactobacillus plantarum* ( $1,7 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> por grama de ração) e uma dieta com a combinação de alga + probiótico após o choque térmico.



Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão das quadruplicatas. O valor de  $p$  é referente a interação entre os tratamentos Probiótico x Alga. As diferenças estatísticas estão indicadas por letras diferentes (ab) ( $p < 0,05$ ).

## 2.2.4 DISCUSSÃO

A suplementação alimentar com macroalgas e probióticos tem gerado crescente interesse nos últimos anos como promotores de crescimento, imunomoduladores e reduzem o uso dos quimioterápicos nos cultivos (VIDHYA HINDU *et al.*, 2019). Entre os motivos para esse interesse é que as algas marinhas possuem quantidades significativas de vitaminas, minerais, fibras alimentares, proteínas, polifenóis, pigmentos, lipídeos e polissacarídeos (MAGDUGO *et al.*, 2020). Dentre os polissacarídeos, a ulvana, presente nas algas verdes pode atuar como prebióticos, estimulando o crescimento de bactérias benéficas no trato intestinal dos animais (VIDHYA HINDU *et al.*, 2019; WIJESEKARA; PANGESTUTI; KIM, 2011). Além disso, alguns trabalhos vêm demonstrando que o uso de algas marinhas como aditivo alimentar podem auxiliar os animais a resistir as condições climáticas adversas. Neste sentido, avaliou-se a mortalidade após o choque térmico e foi possível observar que os camarões alimentados com *U. ohnoi* apresentaram significativamente menor taxa na mortalidade, quando comparado com o grupo controle. Estes achados estão condizentes ao encontrado em outros trabalhos que confirmaram que o uso da biomassa seca (0,5 e 2%) da alga *Sargassum filipendula* (S) isoladamente e o uso desta em combinação (1%S:2%U) com

*Undaria pinnatifida* (U) melhoraram significativamente a resistência dos camarões ao choque térmico (REZENDE *et al.*, 2021; SCHLEDER *et al.*, 2017a). Com isso, sugere-se que os compostos bioativos presentes na alga utilizada neste estudo possam ter contribuído para a melhora da resistência térmica dos animais, porém, não foram realizadas análises para confirmar esta hipótese.

As oscilações de temperatura que ocorrem nos cultivos, como por exemplo as encontradas na região sul do Brasil no período de inverno, são consideradas um fator limitante para o crescimento e desenvolvimento dos animais (SHIELDS, 2019). Conforme a revisão de Ren *et al.* (2021) o camarão *L. vannamei* possui uma faixa de tolerância de temperatura entre 16 e 38°C, mas o seu melhor crescimento é de 28 a 32°C (PONCE-PALAFOX; MARTINEZ-PALACIOS; ROSS, 1997; VAN WYK; SCARPA, 1999). No entanto, quando a temperatura da água excede a capacidade regulatória do camarão as temperaturas baixas retardam a sua taxa de crescimento e podem até causar mortalidades (REN *et al.*, 2021). Em vista desta problemática, vários estudos tem avaliado a tolerância destes crustáceos ao frio e explorando os efeitos que estas causam (PONTINHA; VIEIRA; HAYASHI, 2018; XU *et al.*, 2019).

Dentre os inúmeros efeitos, estão as alterações na resposta neuroendócrina e em suas moléculas sinalizadoras, como a dopamina e norepinefrina, além de respostas oxidativas e antioxidantes em camarões (MAPANAO *et al.*, 2018; PAN *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2018). As temperaturas baixas também podem causar alterações imunológicas, como a redução do THC encontrado em *L. vannamei* quando a temperatura diminuiu de 28 para 13°C, além de suprimir a atividade antibacteriana, tornando os animais mais suscetíveis aos patógenos (FAN; WANG; WU, 2013; POWELL; WATTS, 2006; XU *et al.*, 2019). Mudanças no metabolismo energético dos crustáceos também são encontradas, pois o consumo de energia aumenta e a atividade das enzimas digestivas diminuem, causando nestes um distúrbio metabólico com alterações comportamentais e físicas (ANESTIS *et al.*, 2008). Outro efeito é sobre o metabolismo dos ácidos graxos dos crustáceos que são sensíveis ao frio e podem modificar a sua composição nas células, diminuindo a proporção de ácidos graxos saturados e levando a um rápido aumento na proporção de ácidos graxos insaturados, o que poderia afetar a fluidez da membrana celular (AZRA *et al.*, 2020a, b; FAN; WANG; WANG, 2019; MENG *et al.*, 2019; REN *et al.*, 2020).

A alteração na membrana celular causada pelo frio já foi apontada por Schleder *et al.* (2017b) que ao utilizarem a alga parda *Sargassum filipendula* (0,5%) na dieta de *L. vannamei* observaram que houve um aumento dos fosfolipídios poli-insaturados e estes estão relacionados a uma maior fluidez de membrana e de proteínas relacionadas a defesas

microbianas. Além disso, Legarda *et al.* (2021) ao suplementarem *U. fasciata* (10 g kg<sup>-1</sup>) na dieta de *S. dorsalis* encontraram um aumento de aproximadamente 49% do ácido docosahexaenóico (DHA) no tecido muscular dos peixes. Com base nestes estudos, sugere-se que o aumento dos ácidos graxos insaturados pode ser devido a incorporação destes na membrana celular, podendo assim aumentar a fluidez desta e isso poderia explicar, em parte, a maior resistência ao choque térmico nos animais alimentados com dietas suplementadas com algas.

As algas marinhas, quando usadas em baixos níveis de inclusão na alimentação, podem se comportar como fontes imunoestimulantes e melhorar a resposta imunológica dos animais às doenças, o que também já foi demonstrado com o emprego de probióticos. (VIDHYA HINDU *et al.*, 2019). Entretanto, quando avaliado a sobrevivência dos camarões alimentados com dietas suplementadas e desafiados com *Vibrio parahaemolyticus* não foi possível observar um efeito positivo na resistência destes. Inclusive, os animais alimentados com a dieta contendo apenas *U. ohnoi* obtiveram a maior taxa de mortalidade, demonstrando diferença significativa com o grupo controle. Além destes, os animais suplementados com probiótico também demonstraram maior taxa de mortalidade quando comparado com o grupo controle. Em contraste a estes resultados, Akbary & Aminikhoie, (2018) observaram que o uso do extrato de *U. rigida* nas dietas de *L. vannamei* melhoraram a resistência dos animais após o desafio bacteriano com *Photobacterium damsela* e o mesmo foi verificado no peixe *Pagrus major* alimentados com *Ulva pertusa* e infectados com *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* (SATO; NAGAGAWA; KASAHARA, 1987). Resultados divergentes aos obtidos no presente estudo também foram relatados por vários trabalhos nos quais apontaram que a utilização de *Lactobacillus* sp. incrementou a resistência dos camarões quando desafiados com *V. harveyi* (KONGNUM; HONGPATTARAKERE, 2012; LI *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2010). Uma explicação para estes resultados contraditórios é que os probióticos são influenciados por alguns fatores, como as condições de cultivo, o método de administração e a concentração, a cepa probiótica e a espécie de peixe ou camarão utilizado (TOLEDO *et al.*, 2019). E em relação aos trabalhos com algas, alguns autores, como Fumanal *et al.* (2020), revelaram que a proporção das algas pode influenciar no resultado final, sendo necessário testar os seus efeitos específicos para cada espécie de animal e formulação da dieta, sempre considerando que os seus compostos podem variar nas diferentes espécies de algas (MARTÍNEZ-ANTEQUERA *et al.*, 2021). Ademais, os resultados obtidos no presente estudo, sugerem que o inóculo de *V. parahaemolyticus*, utilizado na concentração de  $3 \times 10^8$

UFC mL<sup>-1</sup> (obtida em teste prévio de DL<sub>50</sub>), possa ter sido muito alto, sendo que o grupo controle obteve 65% de mortalidade, um pouco acima do esperado que seria 50%.

A adição de 2% da biomassa seca da alga isoladamente e em conjunto com o probiótico nas dietas não demonstrou diferenças significativas nas contagens de bactérias do trato intestinal, como BAL, o que indica que não houve um efeito prebiótico como esperado. Também não foi observado diferenças estatísticas nos parâmetros imunológicos avaliados, o que é condizente ao encontrado em outros estudos (FUMANAL *et al.*, 2020; LOBO *et al.*, 2018). Além disso, os parâmetros zootécnicos dos animais alimentados com as dietas suplementadas não foram afetados, sugerindo que não houve interferência de possíveis fatores antinutricionais presentes na alga, conforme demonstrado em outros trabalhos (BANDARA, 2018; SÁEZ *et al.*, 2020; VIZCAÍNO *et al.*, 2019, 2020).

Apesar de vários estudos apontarem que as algas marinhas e os probióticos exercem muitos benefícios para a saúde dos animais cultivados, existe divergências nos resultados encontrados na literatura. Estas diferenças podem ser devido a variação da espécie consumidora e a sua fisiologia, a macroalga e a cepa probiótica utilizada, o método de inclusão, a dosagem de administração, o local e a estação do ano em que as algas foram colhidas e a forma de secagem das mesmas (ARAÚJO *et al.*, 2016; URIBE *et al.*, 2019; VATSOS; REBOURS, 2015; VIZCAÍNO *et al.*, 2019). Nesse contexto, os resultados obtidos no presente estudo revelam a importância de avaliar os efeitos do uso das diferentes espécies de *Ulva* na alimentação dos camarões, sua combinação com probióticos e pelo que se sabe, este é o primeiro relato sobre a inclusão de *U. ohnoi* isoladamente e em conjunto com *L. plantarum* nas dietas de *L. vannamei*.

## 2.2.5 CONCLUSÃO

A inclusão de *U. ohnoi* na dieta de *L. vannamei* demonstrou um efeito positivo na resistência ao choque térmico, mas não demonstrou proteção contra a infecção causada pelo *V. parahaemolyticus*. O uso desta macroalga em conjunto com *L. plantarum* nas dietas não exerceu nenhum efeito sinérgico ou antagônico no desempenho zootécnico, imunológico e microbiológico dos animais. Com base nesses resultados, destaca-se a importância de avaliar futuramente os efeitos e os mecanismos das diferentes espécies de *Ulva* em camarões marinhos.

## REFERÊNCIAS

- AKBARY, P.; AMINIKHOEI, Z. Effect of polysaccharides extracts of algae *Ulva rigida* on growth, antioxidant, immune response and resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei* against *Photobacterium damsela*. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 7, p. 2503–2510, 2018.
- ANESTIS, A. *et al.* Metabolic and molecular stress responses of sublittoral bearded horse mussel *Modiolus barbatus* to warming sea water: Implications for vertical zonation. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 17, p. 2889–2898, 2008.
- AOAC – Association of Official Agricultural Chemists. 2005. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18th ed. Maryland, USA: AOAC International. 1094p, 2005.
- APHA – American Public Health Association, AWWA – American Water Works Association, WEF – Water Environment Federation. 2005. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21<sup>st</sup> ed. Washington, DC: APHA. 541p, 2005.
- ARAÚJO, M. *et al.* Dietary inclusion of IMTA-cultivated *Gracilaria vermiculophylla* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: effects on growth, intestinal morphology, tissue pigmentation, and immunological response. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 679–689, 2016.
- AZRA, M. N. *et al.* Effects of climate-induced water temperature changes on the life history of brachyuran crabs. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 1211–1216, 2020a.
- AZRA, M. N. *et al.* Growth rate and fatty acid composition of orange mud crab instars, *Scylla olivacea*, reared at different temperatures. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 46, n. 1, p. 97–102, 2020b.
- BANDARA, T. Alternative feed ingredients in aquaculture: Opportunities and challenges. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 6, p. 3087–3094, 2018.
- BOYD, C. E.; PHU, T. Q. Environmental factors and acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp ponds in Viet Nam: Practices for reducing risks. **Asian Fisheries Science**, v. 31, p. 121–136, 2018.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BURRIDGE, L. *et al.* Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**, v. 306, n. 1–4, p. 7–23, 2010.
- ELIZONDO-GONZÁLEZ, R. *et al.* Use of seaweed *Ulva lactuca* for water bioremediation and as feed additive for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **PeerJ**, v. 2018, n. 3, 2018.
- FAN, L.; WANG, A.; WU, Y. Comparative proteomic identification of the hemocyte response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Proteomics**, v. 80, p. 196–206, 2013.

FAN, L.; WANG, L.; WANG, Z. Proteomic characterization of the hepatopancreas in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* under cold stress: Revealing the organism homeostasis mechanism. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 92, p. 438–449, 2019.

FAO/WHO. Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. p. 413–426, 2001.

FUMANAL, M. *et al.* Inclusion of dietary *Ulva ohnoi* 5% modulates *Solea senegalensis* immune response during *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 100, p. 186–197, 2020.

GONG, H. *et al.* Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* I. Dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction. **Aquaculture**, v. 190, n. 3–4, p. 305–324, 2000.

HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

JIAO, L. *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* Infection Influenced Trace Element Homeostasis, Impaired Antioxidant Function, and Induced Inflammation Response in *Litopenaeus vannamei*. **Biological Trace Element Research**, v. 199, n. 1, p. 329–337, 2021.

KLONGKLAEW, N. *et al.* Antibacterial and antiviral activities of local Thai green macroalgae crude extracts in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Marine Drugs**, v. 18, n. 3, p. 140, 2020.

KLONGKLAEW, N. *et al.* Chemical composition of a hot water crude extract (HWCE) from *Ulva intestinalis* and its potential effects on growth performance, immune responses, and resistance to white spot syndrome virus and yellowhead virus in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 112, p. 8–22, 2021.

KONGNUM, K.; HONGPATTARAKERE, T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 32, n. 1, p. 170–177, 2012.

LI, E. *et al.* Gut Microbiota and its Modulation for Healthy Farming of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, v. 26, n. 3, p. 381–399, 2018.

LOBO, G. *et al.* Effect of dietary seaweed supplementation on growth performance, antioxidant and immune responses in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) subjected to rearing temperature and salinity oscillations. **International Aquatic Research**, v. 10, n. 4, p. 321–331, 2018.

MAGDUGO, R. P. *et al.* *An analysis of the nutritional and health values of Caulerpa*

*racemosa* (Forsskål) and *Ulva fasciata* (Delile)—Two chlorophyta collected from the Philippines. **Molecules**, v. 25, n. 12, 2020.

MAGGIONI, D. S. *et al.* 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**, v. 241, n. 1–4, p. 501–515, 2004.

MANTRI, V. A. *et al.* Concise review of green algal genus *Ulva* Linnaeus. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 5, p. 2725–2741, 2020.

MAPANAO, R. *et al.* Silencing tyrosine hydroxylase retards depression of immunocompetence of *Litopenaeus vannamei* under hypothermal stress. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 72, p. 519–527, 2018.

MARTÍNEZ-ANTEQUERA, F. P. *et al.* Evaluation of the inclusion of the green seaweed *Ulva ohnoi* as an ingredient in feeds for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and european Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **Animals**, v. 11, n. 6, p. 1–19, 2021.

MENG, X. *et al.* Screening of the candidate genes related to low-temperature tolerance of *Fenneropenaeus chinensis* based on high-throughput transcriptome sequencing. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–13, 2019.

NAIEL, M. A. E. *et al.* Using lactic acid bacteria as an immunostimulants in cultured shrimp with special reference to *Lactobacillus* spp. **Aquaculture International**, v. 29, n. 1, p. 219–231, 2021.

NGUYEN, T. T. G. *et al.* Promotion of *Lactobacillus plantarum* on growth and resistance against acute hepatopancreatic necrosis disease pathogens in white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 48, n. 1, p. 19–28, 2018.

NRC - National Research Council. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington, D. C.: The National Academies Press, 2011.

PAN, L. Q. *et al.* The effect of different acclimation temperatures on the prophenoloxidase system and other defence parameters in *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1–2, p. 137–142, 2008.

PONCE-PALAFOX, J.; MARTINEZ-PALACIOS, C. A.; ROSS, L. G. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. **Aquaculture**, v. 157, n. 1–2, p. 107–115, 1997.

PONTINHA, V. DE A.; VIEIRA, F. DO N.; HAYASHI, L. Mortality of pacific white shrimp submitted to hypothermic and hyposalinic stress. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 2, 2018.

POWELL, M. L.; WATTS, S. A. Effect of temperature acclimation on metabolism and hemocyanin binding affinities in two crayfish, *Procambarus clarkii* and *Procambarus zonangulus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 144, n. 2, p. 211–217, 2006.

PRATIWI, D. Y.; PRATIWI, F. M. Comparison of *Ulva lactuca* and *Ulva clathrata* as ingredients in *Litopenaeus vannamei* feeds. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 9, n. 1, p. 192–194, 2021.

RAY, A. J. *et al.* Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. **Aquaculture**, v. 299, n. 1–4, p. 89–98, 2010.

REN, X. *et al.* Integrated transcriptomic and metabolomic responses in the hepatopancreas of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) under cold stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 111360, 2020.

REN, X. *et al.* Effects of Low Temperature on Shrimp and Crab Physiology, Behavior, and Growth: A Review. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, 2021.

REVERTER, M. *et al.* Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. **Aquaculture**, v. 433, p. 50–61, 2014.

REZENDE, P. C. *et al.* Brown seaweeds added in the diet improved the response to thermal shock and reduced *Vibrio* spp. in pacific white shrimp post-larvae reared in a biofloc system. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 6, p. 2852–2861, 2021.

ROMERO, J.; GLORIA, C.; NAVARRETE, P. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. In: CARVALHO ED, DAVID GS, S. R. (Ed.). **Health and Environment in Aquaculture**. Croatia: InTech, 2012. p. 159–198.

SÁEZ, M. I. *et al.* Assessment of long-term effects of the macroalgae *Ulva ohnoi* included in diets on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fillet quality. **Algal Research**, v. 47, p. 101885, 2020.

SANTOS, H. M. *et al.* Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): a review. **Aquaculture International**. Springer, 2020.

SATOH, K.; NAGAGAWA, H.; KASAHARA, S. Effect of *Ulva* meal supplementation on disease resistance of red sea bream. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 53, n. 7, p. 1115–1120, 1987.

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**, p. 2471–2477, 2017a.

SCHLEDER, D. D. *et al.* Thermal resistance of Pacific white shrimp fed *Sargassum filipendula*: A MALDI-TOF mass spectrometry approach. **Aquaculture**, v. 481, p. 103–111, 2017b.

SHIELDS, J. D. Climate change enhances disease processes in crustaceans: Case studies in lobsters, crabs, and shrimps. **Journal of Crustacean Biology**, v. 39, n. 6, p. 673–683, 2019.

SÖDERHÄLL, K.; HÄLL, L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. **BBA - General Subjects**, v. 797, n. 1, p. 99–

104, 1984.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. A Practical Handbook of Seawater Analysis. **A practical handbook of seawater analysis**, v. 167, p. 185, 1972.

TOLEDO, A. *et al.* Impact of probiotics on growth performance and shrimp survival: A meta-analysis. **Aquaculture**, v. 500, p. 196–205, 2019.

TZIVELEKA, L. A.; IOANNOU, E.; ROUSSIS, V. Ulvan, a bioactive marine sulphated polysaccharide as a key constituent of hybrid biomaterials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 218, p. 355–370, 2019.

URIBE, E. *et al.* Effect of different drying methods on phytochemical content and amino acid and fatty acid profiles of the green seaweed, *Ulva* spp. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 3, p. 1967–1979, 2019.

VAN WYK, P.; SCARPA, J. Journal Water Quality Requirements and Management. **Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems**, n. 4520, p. 141–162, 1999.

VATSOS, I. N.; REBOURS, C. Seaweed extracts as antimicrobial agents in aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 2017–2035, 2015.

VIDHYA HINDU, S. *et al.* A review on the impact of seaweed polysaccharide on the growth of probiotic bacteria and its application in aquaculture. **Aquaculture International**, v. 27, n. 1, p. 227–238, 2019.

VIEIRA, F. DO N. *et al.* Effect of probiotic supplemented diet on marine shrimp survival after challenge with *Vibrio harveyi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1–12, 2010.

VIEIRA, F. DO N. *et al.* Use of probiotic-supplemented diet on a Pacific white shrimp farm. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 5, p. 203–207, 2016.

VIZCAÍNO, A. J. *et al.* Evaluation of *Ulva ohnoi* as functional dietary ingredient in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Effects on the structure and functionality of the intestinal mucosa. **Algal Research**, v. 42, p. 101608, 2019.

VIZCAÍNO, A. J. *et al.* Partial characterization of protease inhibitors of *Ulva ohnoi* and their effect on digestive proteases of marine fish. **Marine Drugs**, v. 18, n. 6, 2020.

WANG, Q. *et al.* One health pathogen surveillance demonstrated the dissemination of gut pathogens within the two coastal regions associated with intensive farming. **Gut Pathogens**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2021.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 14–21, 2011.

XU, Z. *et al.* The oxidative stress and antioxidant responses of *Litopenaeus vannamei* to low

temperature and air exposure. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 72, p. 564–571, 2018.

XU, Z. *et al.* Evaluation of immunological response in shrimp *Penaeus vannamei* submitted to low temperature and air exposure. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 100, p. 103413, 2019.

ZHENG, X. *et al.* Effects of Dietary *Lactobacillus plantarum* on Growth Performance, Digestive Enzymes and Gut Morphology of *Litopenaeus vannamei*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 3, p. 504–510, 2018.

ZHOU, Q. C. *et al.* Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 364–365, p. 252–258, 2012.

### 3 CONCLUSÕES GERAIS

- O carvacrol apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas;
- A possível ação antimicrobiana do carvacrol foi mais eficaz contra *Vibrio* spp.;
- O uso do carvacrol nas concentrações (1, 3, 4 e 6 mg mL<sup>-1</sup>) na alimentação de *L. vannamei* não afetou o desempenho zootécnico, imunológico e microbiológico dos animais;
- A adição dietética de carvacrol não prejudicou os animais desafiados com *V. parahaemolyticus*;
- A inclusão de *U. ohnoi* na dieta de *L. vannamei* demonstrou efeito positivo na resistência ao choque térmico, mas não demonstrou proteção contra a infecção causada por *V. parahaemolyticus*;
- O uso da macroalga em conjunto com o probiótico nas dietas não exerceu nenhum efeito sinérgico ou antagônico no desempenho zootécnico, imunológico e microbiológico dos animais.

## REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- AHMADIFAR, E.; FALAHATKAR, B.; AKRAMI, R. Effects of dietary thymol-carvacrol on growth performance, hematological parameters and tissue composition of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 27, n. 4, p. 1057–1060, 2011.
- AKBARY, P.; AMINIKHOEI, Z. Effect of polysaccharides extracts of algae *Ulva rigida* on growth, antioxidant, immune response and resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei* against *Photobacterium damsela*. **Aquaculture Research**, v. 49, n. 7, p. 2503–2510, 2018.
- AMIT *et al.* Effect of Dietary Supplementation of Probiotic Bacteria (*Lactobacillus plantarum*) on Growth and Proximate Composition of *Cyprinus carpio* Fingerlings. **National Academy Science Letters**, 2021.
- ARAÚJO, M. *et al.* Dietary inclusion of IMTA-cultivated *Gracilaria vermiculophylla* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: effects on growth, intestinal morphology, tissue pigmentation, and immunological response. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 679–689, 2016.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.
- BALBOA, E. M. *et al.* *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1764–1785, 2013.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la Inmunología del Camarón. In: Morales, V.; Cuéllar-Anjel, J. (Eds.). **Guía Práctica - Patología e Inmología de Camarones Penaeidos**. Panamá: OIRSA, 2014. p. 237–304.
- BARUAH, K. *et al.* Enhanced resistance against *Vibrio harveyi* infection by carvacrol and its association with the induction of heat shock protein 72 in gnotobiotic *Artemia franciscana*. **Cell Stress and Chaperones**, v. 22, n. 3, p. 377–387, 2017.
- BECKER, A. J. *et al.* Anesthetic potential of different essential oils for two shrimp species, *Farfantepenaeus paulensis* and *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Crustacea). **Ciência Rural**, v. 51, n. 12, 2021.
- BOYD, C. E.; PHU, T. Q. Environmental factors and acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp ponds in Viet Nam: Practices for reducing risks. **Asian Fisheries Science**, v. 31, p. 121–136, 2018.
- BURRIDGE, L. *et al.* Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. **Aquaculture**, v. 306, n. 1–4, p. 7–23, 2010.
- CÁRDENAS, J. V. *et al.* Assessment of different levels of green and brown seaweed meal in experimental diets for whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone) in recirculating aquaculture system. **Aquaculture International**, v. 23, n. 6, p. 1491–1504, 2015.
- CHAI, P. C. *et al.* Dietary supplementation of probiotic Bacillus PC465 isolated from the gut

of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 54, p. 602–611, 2016.

CHAVAN, P. S.; TUPE, S. G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control**, v. 46, p. 115–120, 2014.

CHIU, C. H. *et al.* Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish and Shellfish Immunology**, 2007.

CITARASU, T. Herbal biomedicines: A new opportunity for aquaculture industry. **Aquaculture International**, v. 18, n. 3, p. 403–414, 2010.

COSENTINO, S. *et al.* *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 130–135, 1999.

CRUZ-SUÁREZ, L. E. *et al.* Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. **Aquaculture Nutrition**, v. 15, n. 4, p. 421–430, 2009.

DAWOOD, M. A. O. *et al.* Interaction effects of dietary supplementation of heat-killed *Lactobacillus plantarum* and  $\beta$ -glucan on growth performance, digestibility and immune response of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 45, n. 1, p. 33–42, 2015.

DILER, I. *et al.* Effects of *Ulva rigida* on the Growth, Feed Intake and Body Composition of Common Carp, *Cyprinus carpio* L. **Biological Science**, v. 7, n. 2, p. 305–308, 2007.

ELIZONDO-GONZÁLEZ, R. *et al.* Use of seaweed *Ulva lactuca* for water bioremediation and as feed additive for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **PeerJ**, v. 2018, n. 3, 2018.

ERGUN, S. *et al.* Influence of *Ulva* meal on growth, feed utilization, and body composition of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at two levels of dietary lipid. p. 355–361, 2009.

FANG, S. *et al.* Antimicrobial carvacrol incorporated in flaxseed gum-sodium alginate active films to improve the quality attributes of Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) during cold storage. **Molecules**, v. 24, n. 18, p. 1–17, 2019.

FAO/WHO. Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. p. 413–426, 2001.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. **The state of world fisheries and aquaculture 2020: sustainability in action**. Rome: SOFIA. Disponível em: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ca9229en/>. Acesso em: Nov. 2020.

FARZANFAR, A. The use of probiotics in shrimp aquaculture: minireview. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 149-158, 2006.

FDA. **CRF - Code of federal regulations** - Title 21. Disponível em:

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.515&SearchTerm=carvacrol>. Acesso em: 8 set. 2021.

FUMANAL, M. *et al.* Inclusion of dietary *Ulva ohnoi* 5% modulates *Solea senegalensis* immune response during *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 100, p. 186–197, 2020.

GILDBERG, A.; JOHANSEN, A.; JAR, B. Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. **Aquaculture**, v. 138, p. 23–34, 1995.

GIRI, S. S.; SUKUMARAN, V.; OVIYA, M. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, n. 2, p. 660–666, 2013.

GOMEZ-GIL, B. *et al.* Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. **Genome announcements**, v. 2, n. 2, p. 2104, 2014.

GRACIA-VALENZUELA, M. H. *et al.* Antimicrobial effect of dietary oregano essential oil against *Vibrio* bacteria in shrimps. **Archives of Biological Sciences**, v. 66, n. 4, p. 1367–1370, 2014.

GUIMARÃES, A. G. *et al.* Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949–957, 2010.

GUIRY, M.; GUIRY, G. **Alga e Base**. Publicação eletrônica mundial, National University of Ireland, Galway. Disponível em: [https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus\\_id=33&sk=0](https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=33&sk=0). Acesso em: 14 set. 2021.

GUPTA, S.; ABU-GHANNAM, N. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 4, p. 600–609, 2011.

HAJRA, A. *et al.* Antinutritional factors in plant origin fish feed ingredients: the problems and probable remedies. In: Goswami, U.C (Ed.). **Advances in Fish Research**. v. 5. p. 193–202. 2013.

HAMDAN, A. M.; EL-SAYED, A. F. M.; MAHMOUD, M. M. Effects of a novel marine probiotic, *Lactobacillus plantarum* AH 78, on growth performance and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 1061–1073, 2016.

HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HOLT, C. C. *et al.* Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, p. 107387, 2020.

HUERTA-RÁBAGO, J. A. *et al.* Addition of commercial probiotic in a biofloc shrimp farm of *Litopenaeus vannamei* during the nursery phase: Effect on bacterial diversity using massive sequencing 16S rRNA. **Aquaculture**, v. 502, p. 391–399, 2019.

IMARC. **Shrimp Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2021-2026**. Disponível em: <https://www.imarcgroup.com/shrimp-feed-market>. Acesso em: 8 set. 2021.

JAVADI, A.; KHATIBI, S. A. Effect of commercial probiotic (Protexin®) on growth, survival and microbial quality of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Nutrition and Food Science**, v. 47, n. 2, p. 204–216, 2017.

JIAO, L. *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* Infection Influenced Trace Element Homeostasis, Impaired Antioxidant Function, and Induced Inflammation Response in *Litopenaeus vannamei*. **Biological Trace Element Research**, v. 199, n. 1, p. 329–337, 2021.

JUNIOR, M. M. DOS S. *et al.* Utilização comparativa de enrofloxacino. **Arquivos de ciências veterinárias e zoologia da Unipar**, v. 19, p. 131–135, 2016.

KACHUR, K.; SUNTRES, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2019.

KATARZYNA, C.; SE-KWON, K. Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications. In: Katarzyna, C.; Se-Kwon, K. (Eds.). **Marine Algae Extracts**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015. p. 1–13.

KHANOBDEE, K. *et al.* Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 48, n. 2, p. 79–90, 2002.

KLONGKLAEW, N. *et al.* Antibacterial and antiviral activities of local Thai green macroalgae crude extracts in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Marine Drugs**, v. 18, n. 3, p. 1–23, 2020.

KLONGKLAEW, N. *et al.* Chemical composition of a hot water crude extract (HWCE) from *Ulva intestinalis* and its potential effects on growth performance, immune responses, and resistance to white spot syndrome virus and yellowhead virus in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 112, p. 8–22, 2021.

KNIPE, H. *et al.* Probiotics and competitive exclusion of pathogens in shrimp aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 324–352, 2021.

KNOBLOCH, K. *et al.* Journal of Essential Oil Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components. p. 37–41, 1989.

KONGNUM, K.; HONGPATTARAKERE, T. Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus*

*vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 32, n. 1, p. 170–177, 2012.

LEGARDA, E. C. *et al.* Effects on fatty acids profile of *Seriola dorsalis* muscle tissue fed diets supplemented with different levels of *Ulva fasciata* from an Integration Multi-Trophic Aquaculture system. **Aquaculture**, v. 535, 2021.

LEMOS, M. F. *et al.* Seasonal variation affects the composition and antibacterial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris*. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 543–548, 2017.

LI, E. *et al.* Gut Microbiota and its Modulation for Healthy Farming of Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, v. 26, n. 3, p. 381–399, 2018.

LIMA, D. S. DE *et al.* Estudo da atividade antibacteriana dos monoterpênos timol e carvacrol contra cepas de *Escherichia coli* produtoras de  $\beta$ -lactamases de amplo espectro. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 1, p. 17–21, 2017.

LIU, C. *et al.* Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. v. 107, p. 1031–1041, 2009.

MAEDA, M. *et al.* Isolation of Lactic Acid Bacteria from Kuruma Shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) Intestine and Assessment of Immunomodulatory Role of a Selected Strain as Probiotic. **Marine Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 181–192, 2014.

MAGDUGO, R. P. *et al.* An analysis of the nutritional and health values of *Caulerpa racemosa* (Forsskål) and *Ulva fasciata* (Delile)—Two chlorophyta collected from the Philippines. **Molecules**, v. 25, n. 12, 2020.

MANFRIN, C. *et al.* Crustacean Immunity: The Modulation of Stress Responses. In: **Lessons in Immunity: From Single-cell Organisms to Mammals**. Elsevier Inc., 2016. p. 107–116.

MANTRI, V. A. *et al.* Concise review of green algal genus *Ulva* Linnaeus. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 5, p. 2725–2741, 2020.

MARINELLI, L. *et al.* Carvacrol prodrugs as novel antimicrobial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, p. 515–529, 2019.

MARINELLI, L.; DI STEFANO, A.; CACCIATORE, I. Carvacrol and its derivatives as antibacterial agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 4, p. 903–921, 2018.

MARTINEZ, J. L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1667, p. 2521–2530, 2009.

MIRANDA, R. O. *et al.* Development of a selective culture medium for bifidobacteria, Raffinose-Propionate Lithium Mupirocin (RP-MUP) and assessment of its usage with Petrifilm Aerobic Count plates. v. 39, p. 96–102, 2014.

- MOKOENA, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. **Molecules**, v. 22, n. 8, 2017.
- NABAVI, S. M. *et al.* Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. **Food Chemistry**, v. 173, p. 339–347, 2015.
- NAIEL, M. A. E. *et al.* Rosemary leaf powder–supplemented diet enhances performance, antioxidant properties, immune status, and resistance against bacterial diseases in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 526, p. 735370, 2020.
- NAIEL, M. A. E. *et al.* Using lactic acid bacteria as an immunostimulants in cultured shrimp with special reference to *Lactobacillus* spp. **Aquaculture International**, v. 29, n. 1, p. 219–231, 2021.
- NGUYEN, T. H.; NGUYEN, V. D. Characterization and Applications of Marine Microbial Enzymes in Biotechnology and Probiotics for Animal Health. In: **Advances in Food and Nutrition Research**. 1. ed. Elsevier Inc., 2017. v. 80, p. 37–74.
- NGUYEN, T. T. G. *et al.* Promotion of *Lactobacillus plantarum* on growth and resistance against acute hepatopancreatic necrosis disease pathogens in white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 48, n. 1, p. 19–28, 2018.
- NGUYEN, V. D.; LE, M. H.; TRANG, S. T. Application of Probiotics from Marine Microbes for Sustainable Marine Aquaculture Development. In: Kim, S.-K. (Ed.). **Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications**. First Edit ed. Weinheim: Wiley-VCH. 2013. p. 307–349.
- NIETO, G. Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 63, 2017.
- NOSTRO, A. *et al.* Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191–195, 2004.
- NOSTRO, A. *et al.* Enhanced activity of carvacrol against biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in an acidic environment. **Apmis**, v. 120, n. 12, p. 967–973, 2012.
- NUNAN, L. *et al.* Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 111, n. 1, p. 81–86, 2014.
- PEIXOTO, M. J. *et al.* Role of dietary seaweed supplementation on growth performance, digestive capacity and immune and stress responsiveness in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture Reports**, v. 3, p. 189–197, 2016.
- PEÑA, L. D. D. LA *et al.* Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 116, n. 3, p. 251–254, 2015.
- POURGHOLAM, M. A. *et al.* Dietary Administration of *Lactobacillus plantarum* Enhanced Growth Performance and Innate Immune Response of Siberian Sturgeon, *Acipenser baerii*.

**Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 8, n. 1, p. 15–21, 2016.

PRABU, E. *et al.* An overview of anti-nutritional factors in fish feed ingredients and their effects in fish. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 32, p. 2017, 2017.

PRATIWI, D. Y.; PRATIWI, F. M. Comparison of *Ulva lactuca* and *Ulva clathrata* as ingredients in *Litopenaeus vannamei* feeds. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 9, n. 1, p. 192–194, 2021.

QIU, X. *et al.* Green seaweed *Ulva* sp. as an alternative ingredient in plant-based practical diets for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 2, p. 1317–1333, 2017.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Assessment of synergistic efficacy of carvacrol and cymene against *Edwardsiella tarda* in vitro and in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 5, p. 420–425, 2010.

REIS, J. A. *et al.* Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. **Food Engineering Reviews**, v. 4, n. 2, p. 124–140, 2012.

REN, X. *et al.* Effects of Low Temperature on Shrimp and Crab Physiology, Behavior, and Growth: A Review. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, 2021.

REVERTER, M. *et al.* Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. **Aquaculture**, v. 433, p. 50–61, 2014.

REZENDE, P. C. *et al.* Brown seaweeds added in the diet improved the response to thermal shock and reduced *Vibrio* spp. in pacific white shrimp post-larvae reared in a biofloc system. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 6, p. 2852–2861, 2021.

RINGØ, E. *et al.* Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 116–136, 2020.

RINGØ, E. Probiotics in shellfish aquaculture. **Aquaculture and Fisheries**, v. 5, n. 1, p. 1–27, 2020.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, H. *et al.* Partial inclusion of *Ulva lactuca* and *Gracilaria parvispora* meal in balanced diets for white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 6, p. 2453–2459, 2014.

ROMERO, J.; GLORIA, C.; NAVARRETE, P. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. In: Carvalho E. D. (Ed.). **Health and Environment in Aquaculture**. Croatia: InTech, 2012. p. 159–198.

RUIZ, M. L. *et al.* Histological effects on the kidney, spleen, and liver of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed different concentrations of probiotic *Lactobacillus plantarum*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 1, p. 167–176, 2020.

SAELEE, N. *et al.*  $\beta$ -Thymosins and Hemocyte Homeostasis in a Crustacean. **PLoS ONE**, v.

8, n. 4, 2013.

SÁEZ, M. I. *et al.* Assessment of long-term effects of the macroalgae *Ulva ohnoi* included in diets on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fillet quality. **Algal Research**, v. 47, p. 101885, 2020.

SÁNCHEZ, C.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. The effect of carvacrol on enteric viruses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 192, p. 72–76, 2015.

SANTOS, H. M. *et al.* Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): a review. **Aquaculture International**. Springer, 2020.

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**. p. 2471–2477, 2017.

SCHLEDER, D. D. *et al.* Impact of combinations of brown seaweeds on shrimp gut microbiota and response to thermal shock and white spot disease. **Aquaculture**, v. 519, p. 734779, 2020.

SCHRYVER, P.; DEFOIRDT, T.; SORGELOOS, P. Early Mortality Syndrome Outbreaks: A Microbial Management Issue in Shrimp Farming?. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 4, p. 10–11, 2014.

SHA, Y. *et al.* Bacterial population in intestines of *Litopenaeus vannamei* fed different probiotics or probiotic supernatant. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1736–1745, 2016.

SIKKEMA, J. A. N.; JAN, A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. v. 59, n. 2, p. 201–222, 1995.

SKALLI, A. *et al.* The LPS derived from the cell walls of the Gram-negative bacteria *Pantoea agglomerans* stimulates growth and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. **Aquaculture**, v. 416–417, p. 272–279, 2013.

SNOUSSI, M. *et al.* *In-vitro* anti-*Vibrio* spp. activity and chemical composition of some Tunisian aromatic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 3071–3076, 2008.

SOSA, N. *et al.* Effect of Galacto-Oligosaccharides: Maltodextrin Matrices on the Recovery of *Lactobacillus plantarum* after Spray-Drying. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–8, 2016.

SOUZA, R. M. DE *et al.* *Lactobacillus plantarum* como probiótico no desenvolvimento inicial de juvenis do Robalo-peva. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 50, n. 2, p. 72, 2018.

STRATAKOS, A. C. *et al.* The *in vitro* effect of carvacrol, a food additive, on the pathogenicity of O157 and non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 84, p. 290–296, 2018.

TAPIA-PANIAGUA, S. T. *et al.* Modulation of intestinal microbiota in *Solea senegalensis* fed low dietary level of *Ulva ohnoi*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–16, 2019.

TASSANAKAJON, A. *et al.* Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p. 954–967, 2013.

TASSANAKAJON, A. *et al.* Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 80, p. 81–93, 2018.

TEPAAMORNDECH, S. *et al.* Effects of *Bacillus aryabhatai* TBRC8450 on vibriosis resistance and immune enhancement in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 86, p. 4–13, 2019.

THAKUR, A.; SHARMA, V.; THAKUR, A. An overview of anti-nutritional factors in food. **International Journal of Chemical Studies**, p. 2472–2479, 2019.

THOMPSON, D. C.; CHA, Y. N.; TRUSH, M. A. The peroxidase-dependent activation of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene (BHT) to reactive intermediates. Formation of BHT-quinone methide via a chemical-chemical interaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 7, p. 3957–3965, 1989.

TODOROV, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - production, genetic organization and mode of action. **Brazilian journal of microbiology**, v. 40, n. 2, p. 209–20921, 2009.

TOLEDO, A. *et al.* Impact of probiotics on growth performance and shrimp survival: A meta-analysis. **Aquaculture**, v. 500, p. 196–205, 2019.

TZIVELEKA, L. A.; IOANNOU, E.; ROUSSIS, V. Ulvan, a bioactive marine sulphated polysaccharide as a key constituent of hybrid biomaterials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 218, p. 355–370, 2019.

UDDIN, G. N.; LARSEN, M. H.; CHRISTENSEN, H. Identification and Antimicrobial Resistance of Bacteria Isolated from Probiotic Products Used in Shrimp Culture. p. 1–21, 2015.

URIBE, E. *et al.* Effect of different drying methods on phytochemical content and amino acid and fatty acid profiles of the green seaweed, *Ulva* spp. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 3, p. 1967–1979, 2019.

VALENTE, L. M. P. *et al.* Evaluation of three seaweeds *Gracilaria bursa-pastoris*, *Ulva rigida* and *Gracilaria cornea* as dietary ingredients in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v. 252, n. 1, p. 85–91, 2006.

VALENTE, L. M. P. *et al.* Carotenoid deposition, flesh quality and immunological response of Nile tilapia fed increasing levels of IMTA-cultivated *Ulva* spp. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 691–701, 2016.

VAN HAI, N.; BULLER, N.; FOTEDAR, R. The use of customised probiotics in the

cultivation of western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 100–104, 2009.

VATSOS, I. N.; REBOURS, C. Seaweed extracts as antimicrobial agents in aquaculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 2017–2035, 2015.

VERSCHUERE, L. *et al.* Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 655–671, 2000.

VIEIRA, B. B.; PEREIRA, E. L. Potential probiotics for use in aquaculture. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 1223–1241, 2016.

VIEIRA, F. DO N. *et al.* Use of probiotic-supplemented diet on a Pacific white shrimp farm. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 5, p. 203–207, 2016.

VIZCAÍNO, A. J. *et al.* Evaluation of *Ulva ohnoi* as functional dietary ingredient in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Effects on the structure and functionality of the intestinal mucosa. **Algal Research**, v. 42, p. 101608, 2019.

VIZCAÍNO, A. J. *et al.* Partial characterization of protease inhibitors of *Ulva ohnoi* and their effect on digestive proteases of marine fish. **Marine Drugs**, v. 18, n. 6, 2020.

VOLPATTI, D. *et al.* Growth parameters, innate immune response and resistance to *Listonella (Vibrio) anguillarum* of *Dicentrarchus labrax* fed carvacrol supplemented diets. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 1, p. 31–44, 2013.

VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. In: Stahl, U.; Donalies, U. E. ; Nevoigt, E. (Eds.). **Food Biotechnology**. Springer, Berlin, Heidelberg: Heidelberg, 2008. p. 1–66.

WANG, Q. *et al.* One health pathogen surveillance demonstrated the dissemination of gut pathogens within the two coastal regions associated with intensive farming. **Gut Pathogens**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2021.

WANG, R. *et al.* Effects on development and microbial community of shrimp *Litopenaeus vannamei* larvae with probiotics treatment. **AMB Express**, v. 10, n. 1, 2020.

WANG, Y. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. v. 269, p. 259–264, 2007.

WANG, Y. *et al.* Effects of dietary chlorogenic acid on growth performance, antioxidant capacity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under normal condition and combined stress of low-salinity and nitrite. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 43, n. 2, p. 337–345, 2015.

WASSEF, E. A.; EL-SAYED, A. F. M.; SAKR, E. M. *Pterocladia* (Rhodophyta) and *Ulva* (Chlorophyta) as feed supplements for European seabass, *Dicentrarchus labrax* L., fry. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 5, p. 1369–1376, 2013.

WONG, A. *et al.* Detection of antibiotic resistance in probiotics of dietary supplements. **Nutrition Journal**, p. 12–17, 2015.

XU, D. *et al.* Cellular immune responses against viral pathogens in shrimp. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 47, n. 2, p. 287–297, 2014.

XU, S. Y.; HUANG, X.; CHEONG, K. L. Recent advances in marine algae polysaccharides: Isolation, structure, and activities. **Marine Drugs**, v. 15, n. 12, p. 1–16, 2017.

XU, Z. *et al.* Evaluation of immunological response in shrimp *Penaeus vannamei* submitted to low temperature and air exposure. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 100, p. 103413, 2019.

YILDIRIM, Ö. *et al.* Effects of Two Seaweeds (*Ulva lactuca* and *Enteromorpha linza*) as a Feed Additive in Diets on Growth Performance, Feed Utilization, and Body Composition of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 15, n. 3, p. 455–460, 2009.

YIN, Q. H. *et al.* Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. **Cytotechnology**, v. 64, n. 1, p. 43–51, 2012.

ZHENG, X. *et al.* Effects of Dietary *Lactobacillus plantarum* on Growth Performance, Digestive Enzymes and Gut Morphology of *Litopenaeus vannamei*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 3, p. 504–510, 2018.

ZHENG, Z. L. *et al.* Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, v. 292, n. 3–4, p. 214–218, 2009.